

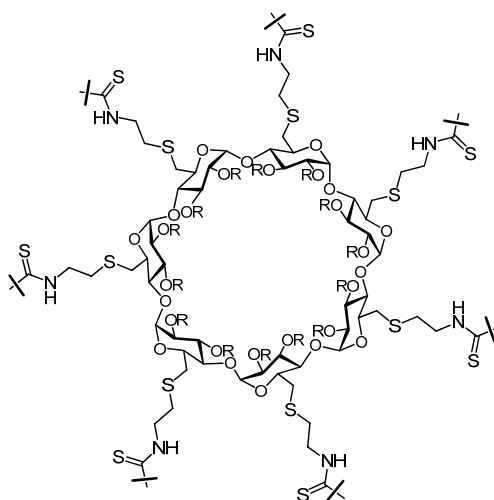


Departamento de Química
Orgánica



Instituto de Investigaciones
Químicas

Plataformas Multifuncionales Basadas en Ciclodextrinas: Diseño de Antitoxinas del Ántrax y Vectores de Genes



Alejandro Díaz Moscoso

Sevilla, 2010



**Departamento de Química
Orgánica**



**Instituto de Investigaciones
Químicas**

**Plataformas Multifuncionales Basadas en Ciclodextrinas:
Diseño de Antitoxinas del Ántrax y Vectores de Genes**

Memoria presentada por el
Licenciado Alejandro Díaz Moscoso
para optar al grado de Doctor en Química

El presente trabajo ha sido realizado por el Lcdo. Alejandro Díaz Moscoso en el Instituto de Investigaciones Químicas del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (CSIC – Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Drs. Carmen Ortiz Mellet, Catedrática de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla, José Manuel García Fernández y Juan Manuel Benito Hernández, Profesor de Investigación y Científico Titular, respectivamente, del Instituto de Investigaciones Químicas del CSIC.

Los directores del trabajo

Fdo.: Dra. Carmen Ortiz Mellet

Fdo: Dr. José Manuel García Fernández

Fdo.: Dr. Juan Manuel Benito Hernández

Una tesis doctoral es el resultado del trabajo de una persona que ha dedicado varios años de su vida a enriquecer alguno de los campos del conocimiento humano mediante una investigación original. Sin embargo, es un trabajo que una persona sola difícilmente podría abarcar. Gran parte del éxito de dicho trabajo se debe a la ayuda y el apoyo recibido por muchas otras personas del entorno del doctorando que, en mayor o menor medida, ponen su granito de arena a la construcción de semejante montaña. Por ello me gustaría dedicar aquí unas palabras a toda esa gente que a lo largo de estos años me han tendido su mano, han arrimado su hombro, me han dado ánimo o, simplemente, me han sacado una sonrisa cuando más lo necesitaba.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores Carmen y José Manuel que me descubriesen el mundo de la investigación de alto nivel, que confiaran en mí y me diesen la oportunidad de participar en los interesantes proyectos que más adelante se expondrán. Muy especialmente me gustaría agradecer a Juanma toda su inestimable ayuda y asesoramiento desde que empezamos a trabajar juntos compartiendo vitrina.

En el apartado más formal quiero agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación (y al anterior Ministerio de Educación y Ciencia) de España y al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) la concesión de una beca I3P predoctoral para el desarrollo de este trabajo, así como las ayudas para las estancias y los proyectos con los que se ha financiado la investigación.

Tengo que agradecer también a todos los miembros de nuestro grupo de investigación, mi familia química, toda su ayuda y, más aún, su amistad a lo largo de todos estos años. Empezando por los que tuvieron tanta paciencia conmigo cuando me incorporé al grupo sin ser todavía licenciado y compartieron toda su experiencia y su buen hacer en el laboratorio: Carlos, Paula y especialmente Maribel, a la que le tocó la parte más dura y sin cuyas enseñanzas estoy seguro que no habría llegado hasta aquí. A todos los que han trabajado en el “subgrupo” de ciclodextrinas, pues el trabajo es fruto

del esfuerzo de todos y siempre han estado dispuestos echar una mano con su propio conocimiento: José Luís, Fernando, David, Ale Méndez, Ale de Amores, Jose y Álvaro. Mención a parte merecen Marta y Patri, por haberse “peleado” tan duramente con estas dichas macromoléculas, haber allanado el camino de los que veníamos detrás, haberme enseñado que no hay que tenerles miedo por muy grandes que sean y por haberme escuchado, animado y ayudado siempre incondicionalmente en todo lo posible, sin vosotras este libro estaría casi vacío. Y a todos los demás componentes del grupo, con los que tanto he compartido a lo largo de estos años: Enrique, Elena Sánchez, Iris, Puri, Elena Suárez, Rocío Rísquez, Rocío Valderrama, Tere, Eva Aguilar, Eva Bernal, Lourdes, Laura y Paola.

A todos con los que he compartido laboratorio alguna vez en todo este tiempo y que han hecho mucho más llevaderas todas las horas de trabajo que hay detrás de estas líneas, sobre todo al “equipo NK” que, sin ser directamente el mismo grupo, me “adoptaron” cuando estaba solo y me han acogido siempre como a uno más: Belén, Manuel, Vicky, Raquel, Siham, Rocío, Mohye y Juanfran. Sin olvidarme de las técnicas Cari, Cristina, Elena y Araceli y de los que han estado tan solo unos meses de estancia.

Muchas gracias a todo el personal del Instituto de Investigaciones Químicas porque su trabajo es fundamental para que todos sigamos adelante, por haber mantenido siempre unas estupendas relaciones y porque un simple saludo o una sonrisa al cruzarse por los pasillos sirve para mucho más de lo que parece. Desde la administración, eficazmente llevada por Mónica, hasta las comisiones y órganos rectores que velan por el correcto funcionamiento del centro, pasando por los investigadores y técnicos encargados de los distintos servicios. Especialmente me gustaría agradecer a Gloria el enorme esfuerzo y su gran dedicación en el servicio de espectrometría de masas que de tanta ayuda ha sido desde el principio de la tesis; a Pablo por atender pacientemente y ayudarnos con los caprichos de la informática y a Sonia por echar una mano en todo lo posible sin perder la sonrisa. Mención especial también para todos los becarios,

doctorandos y similares de este centro por formar una gran piña y estar siempre dispuestos a ayudarse, gracias a todos por vuestra amistad, que espero que dure mucho más, y por todos los grandes momentos que hemos compartido, no solo en lo que a la química se refiere, sino a las excursiones, los partidillos de fútbol y baloncesto, las celebraciones y especialmente las conversaciones en “la cocina” durante la comida o la sobremesa. Me gustaría nombraros a todos pero tendría que hacer otro volumen de la tesis, sabed que a todo el que se haya sentido identificado en alguna de las líneas anteriores se lo agradeceré y os recordaré siempre.

Igualmente, gracias a todos los servicios generales del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja: gerencia, informática, mantenimiento, almacén, biblioteca, cafetería, limpieza y seguridad, por hacer más confortable y funcional este centro que es la segunda casa de casi todos nosotros.

Este trabajo también me ha permitido conocer muchos lugares y a mucha gente que no podré olvidar nunca y que, por supuesto, merecen un lugar aquí. Gracias a todos aquellos con los que hemos tenido colaboraciones a lo largo de este tiempo y cuyo trabajo en el estudio de los compuestos sintetizados ha sido de gran valor para esta investigación, especialmente los grupos del Dr. Pierre Vierling en Niza y el Dr. Vladimir A. Karginov en Virginia. Siempre estaré agradecido a todos los que han hecho de mis estancias períodos fructíferos en el tema laboral, enseñándome nuevas técnicas y consiguiendo interesantes resultados, e inolvidables en el tema personal, acogiéndome y ayudándome como si me conocieran de toda la vida. En Messina me gustaría destacar a los Drs. Antonino Mazzaglia, Norberto Micali y Valentina Villari, a los compañeros de laboratorio Giovanna, Chiara y Emmanuela, a Nino Busà, Luca y Alessandro, Grazie a tutti! En Gante al Dr. Stefaan C. de Smedt, a todos los compañeros del grupo, sobre todo a Dries, y muy especialmente a las Dras. Joanna Rejman y Zanna Hyvonen, con las que formaba el “Club de Extranjeros Comunitarios del Laboratorio” ya que, además de

ofrecerme una ayuda que excedió lo imaginable, forjamos una gran amistad, I wish you all the best for your future, both you deserve it.

Tengo que agradecer también a todos los profesores que he tenido durante la formación que culmina con esta tesis. Especialmente a los del I.E.S. Al-Guadaira, por haberme enseñado mucho más de lo que su deber les obligaba, haber despertado mi vocación científica y haberme animado siempre a llegar hasta aquí, sobre todo Gerardo, Eugenio, Paqui, Pepe Águila, Ana Puerta, Ramón, Matilde, Manolo y Maru, que pasaron la frontera de las relaciones profesionales y convertirse en buenos amigos.

Quizá la parte más dura de todo esto se la hayan llevado mis amigos y familiares, especialmente mis padres, Maribel y Ricardo, y mis hermanas, Cristina y Carmen, a los que eternamente les agradeceré su apoyo y ayuda incondicionales, muchas veces a pesar de las largas ausencias a las que obliga este trabajo y al mal genio que les ha tocado aguantar derivados de asuntos que nada tenían que ver con ellos. Os quiero.

Y finalmente, pero ni mucho menos menos importante sino todo lo contrario, muchas gracias Mati por haber estado siempre a mi lado todos estos años, por estar incluida en la mayoría de los párrafos anteriores, por compartir todos los buenos y, más importante, los malos momentos, sacándome siempre una sonrisa y siendo la tabla a la que aferrarme en todas las tempestades. Te quiero.

A todos a los que se hace referencia en estas líneas: sabed que me llevo un poco de cada uno, que siempre os recordaré y que podréis contar conmigo. Muchas gracias por todo.

A ti.

ÍNDICE GENERAL

Principales abreviaturas

1. Introducción general	3
2. Funcionalización de ciclodextrinas asistida por soportes sólidos	35
2.1. Plataformas multifuncionales con carbohidratos	35
2.2. Estrategias para la funcionalización selectiva de ciclodextrinas	38
2.3. Estrategias de síntesis basadas en el empleo de soportes sólidos	40
2.3.1. <i>Síntesis en fase sólida y asistida por polímeros</i>	40
2.3.2. <i>Concepto de anclaje de seguridad o de liberación controlada</i>	43
2.4. Resultados y discusión	48
2.4.1. <i>Síntesis de elementos de base</i>	49
2.4.2. <i>Ensamblaje de elementos de base en el soporte sólido</i>	50
2.4.3. <i>Liberación del soporte y transferencia de glicoconjugados a nucleófilos en disolución</i>	52
2.4.4. <i>Liberación del soporte y transferencia sobre plataformas multivalentes</i>	57
3. Diseño de ciclodextrinas policatiónicas como antitoxinas del ántrax	67
3.1. El ántrax	67
3.2. La toxina del ántrax: estructura y modo de acción	69
3.2.1. <i>Estrategias frente a la toxina del ántrax</i>	72
3.2.2. <i>La toxina del ántrax como modelo en el diseño de agentes terapéuticos polivalentes</i>	75
3.2.3. <i>Diseño de inhibidores multivalentes de la toxina del ántrax</i>	77
3.3. Resultados y discusión	81
3.3.1. <i>Conjugados moleculares de CDs policatiónicas</i>	81
3.3.2. <i>Conjugados supramoleculares de CDs policatiónicas</i>	88

4. Diseño de vectores de genes para transfección celular basados en ciclodextrinas	97
4.1. La terapia génica	97
4.1.1. <i>La administración de fármacos basados en ácidos nucleicos</i>	99
4.2. Técnicas físicas de transfección celular	101
4.3. Técnicas de transfección celular asistida por vectores	102
4.4. Vectores virales de genes para transfección celular	103
4.5. Vectores sintéticos de genes para transfección celular	106
4.5.1. <i>Sistemas lipídicos</i>	109
4.5.2. <i>Sistemas poliméricos</i>	113
4.6. Ciclodextrinas en terapia génica	118
4.7. Resultados y discusión	124
4.7.1. <i>Criterios de diseño y síntesis</i>	127
4.7.2. <i>Complejación del pADN y caracterización de los CDplejos</i>	136
4.7.3. <i>Transporte del pDNA y transfección celular</i>	144
5. Estudio del mecanismo de internalización celular de CDplejos	155
5.1. La endocitosis como mecanismo de internalización celular	156
5.1.1. <i>Endocitosis y transfección</i>	161
5.1.2. <i>El estudio de los mecanismos de endocitosis</i>	163
5.2. Resultados y discusión	165
5.2.1. <i>Síntesis y caracterización física de candidatos</i>	165
5.2.2. <i>Cinética de internalización celular de CDplejos</i>	169
5.2.3. <i>Internalización y transfección en presencia de inhibidores de la endocitosis</i>	171

6. Vectores de genes basados en ciclodextrinas anfífilas para transfección selectiva	181
6.1. Vectorización selectiva de genes	181
6.2. Resultados y discusión	185
6.2.1. <i>Estrategia para la funcionalización supramolecular de CDplejos</i>	187
6.2.2. <i>Estrategia para la funcionalización covalente de CDplejos</i>	190
7. Conclusiones	203
8. Parte Experimental	209
8.1. Métodos Generales	209
8.2. Sustancias de partida	222
8.3. Nuevos Productos	224
9. Bibliografía	305

Principales abreviaturas

A

A	Absorbancia
ABTS	Sal diamónica del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico)
Ac	Acetilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEDT	Ácido etilendiaminotetraacético
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	Ácido ribonucleico interferente
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AF	Ácido fólico
AP	Antígeno protector de la toxina del ántrax
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosin trifosfato

B

BNL-CL2	Células embrionarias de roedor
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
bPEI	PEI ramificada (<i>Branched-PEI</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BTC	Bis(triclotometril)carbonato (Trifosgeno)

C

cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
CaM	Calmodulina
c.c.f.	Cromatografía en capa fina

CD	Ciclodextrina
CLSM	Microscopía Láser de Barrido Confocal (<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>)
CLRS	Cloruro de Lissamina-Rodamina Sulfonilo
c.m.c.	Concentración micelar crítica
Con A	Concanavalina A
COS-7	Células fibroblastos de riñón de mono verde africano que incorporan el material genético del virus SV40
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>

D

DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	Diisopropiletilamina
DIMEB	β -Ciclodextrina con dos grupos metilo por unidad sacarídica
DLS	Dispersión dinámica de la luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMAP	4-(N,N-Dimetilamino)piridina
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>)
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidad óptica
DOTAP	Cloruro de 1,2-Dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano

E

EDA	Etilendiamina
EDCav	Endocitosis dependiente de Caveolina
EDCl _a	Endocitosis dependiente de Clatrina
EICC	Endocitosis independiente de Clatrina y Caveolina

ELLA	Ensayo de reconocimiento de lectinas por enzimas ancladas (<i>Enzyme-Linked Lectin Assay</i>)
EM-ESI	Espectrometría de masas - Ionización por electropray
eq.	Equivalente
Et	Etilo
EtBr	Bromuro de etidio

F

FACS	Citometría de flujo (<i>Fluorescent activated cell sorting</i>)
FCS	Suero bovino fetal (<i>Foetal Calf Serum</i>)
FE	Factor de edema de la toxina del ántrax
FL	Factor letal de la toxina del ántrax
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonilo
FTIR	Infrarrojo con transformada de Fourier

G

GaCD	Ciclodextrina glico-anfifilica
Glu	Ácido glutámico
GPC	Cromatografía de permeación sobre gel
GTP	Guanidin trifosfato

H

H9c2	Células embrionarias de miocardio de rata.
HeLa	Células epiteliales humanas de carcinoma cervical.
HEPES	Ácido 2-[4-hidroximetil piperazin-1-il]etanosulfónico
Hex	Hexanoilo
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Coherent experiment</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)

I

IP	Índice de polidispersidad
IPV	Inhibidores polivalentes
IR	Espectroscopía infrarroja

K

K_a	Constante de asociación
KB	Células cancerosas epiteliales humanas

L

LPEI	PEI de bajo peso molecular.
LeTx	Dosis letal de la toxina del ántrax
LR	Lissamina-Rodamina

M

M3-PALS	Análisis de fase por medida en modo mixto de la dispersión de la luz (<i>Mixed Mode Measurement Phase Analysis Light Scattering</i>)
MAPKKs	Quinasas de proteína quinasa activadas por mitógeno
MbCD	Ciclodextrina metilada al 66%
Me	Metilo
Mir	Miristoilo
MP	Macropinocitosis
m/z	Relación masa/carga

N

N/P	Relación entre el número de nitrógenos protonables del vector y grupos fosfatos del pADN
NuH	Nucleófilo

P

paCD	Ciclodextrina policatiónica anfifílica
pADN	Plásmido de ADN
pb	pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PBTS	Tampón fosfato salino conteniendo 0.05% v/v de Tween20 [®]
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
pGaCD	Ciclodextrina policatiónica glicoanfifílica
PLL	Poli-L-lisina
PPI	Polipropilenimina
PPO	Poli(óxido de propileno)
Py	Piridina

S

SDS	Dodecilsulfato sódico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

R

RAMEB	β -Ciclodextrina metilada estadísticamente
RAW264.7	Macrófagos monocíticos de roedor leucémico
Rend.	Rendimiento
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

T

t.a.	Temperatura ambiente
TAE	Tampón Tris-Acetato-AEDT
TBTU	Tetrafluoroborato de O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametil-uronio

TE	Tampón Tris-AEDT
TEM	Espectroscopía de transmisión electrónica (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
Tf	Transferrina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TNS	6- <i>p</i> -toluidino-2-naftalensulfonato sódico
TOCSY	<i>Totally Correlated Spectroscopy</i>
TPP	Trifenilfosfina
Tr	Tritilo
TREN	Tris(2-aminoetil)amina
TRIMEB	β -Ciclodextrina completamente metilada
Ts	Tosilo

U

U.A.	Unidades arbitrarias
URL	Unidades relativas de luz
UV	Ultravioleta

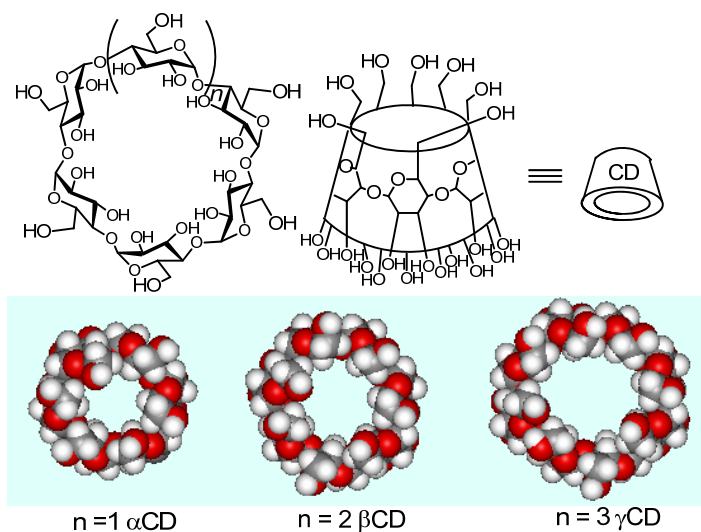
V

Vero	Células epiteliales de riñón de mono verde africano
------	---

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Introducción general

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos macrocíclicos no inmunogénicos, de alta simetría y esencialmente biocompatibles, procedentes de la degradación enzimática del almidón. Fueron aisladas por primera vez de fuentes naturales a finales del siglo XIX por Villiers¹ y caracterizadas por Schardinger² años más tarde. Las CDs están compuestas por unidades de glucopiranososa enlazadas a través de uniones $\alpha(1\rightarrow4)$. Los miembros más relevantes de esta familia son los constituidos por 6, 7 y 8 unidades de glucosa, denominados α , β y γ CD, respectivamente.³ Las CDs representan un ejemplo claro de moléculas con una estrecha relación entre estructura molecular y propiedades supramoleculares. Presentan una geometría troncocónica, con los hidroxilos secundarios (OH-2 y OH-3) situados sobre la base mayor y los hidroxilos primarios (OH-6) sobre la base menor, orientados hacia el exterior en ambos casos. La cavidad interna, de dimensiones nanométricas, se encuentra cubierta por los protones metínicos H-3 y H-5, lo que le otorga carácter hidrófobo. Esta estructura singular hace que las CDs se comporten como nanocontenedores capaces de encapsular moléculas hidrófobas de tamaño apropiado y solubilizarlas en agua (Figura 1).



Ciclodextrina	Diámetro interno (Å)	Diámetro externo (Å)	Altura (Å)
α CD (n = 1)	4.7 – 5.2	14.2 – 15.0	7.9 – 8.0
β CD (n = 2)	6.0 – 6.4	15.0 – 15.8	7.9 – 8.0
γ CD (n = 3)	7.5 – 8.3	17.1 – 17.9	7.9 – 8.0

Figura 1. Estructura y dimensiones de las ciclodextrinas (CDs) naturales o de primera generación.

La capacidad de las CDs para formar complejos de inclusión ha dado lugar a un gran número de aplicaciones tecnológicas.⁴ En muchos casos, la formación de un complejo de inclusión llega a alterar drásticamente las propiedades de la molécula incluida (por ejemplo su solubilidad o su estabilidad en agua). Como consecuencia, las CDs naturales o *CDs de primera generación* (Figura 1) no solo han jugado un papel fundamental en el desarrollo de la química supramolecular como ciencia, sino que, desde que Freudenberg registró la primera patente sobre el uso de CDs en la formulación de medicamentos,⁵ sus propiedades han encontrado además multitud de aplicaciones en la industria farmacéutica,^{6,7} cosmética,⁸ agroquímica⁹ o alimentaria¹⁰ entre otras.¹¹ Desde una perspectiva más académica y fundamental, las ciclodextrinas han encontrado aplicación en el diseño de máquinas moleculares,^{12,13} sensores,¹⁴ catalizadores^{15,16} o enzimas artificiales.¹⁷

Las propiedades de inclusión molecular de las CDs han sido explotadas, por ejemplo, para mejorar la biodisponibilidad de fármacos poco solubles, proteger la molécula activa de procesos de degradación o evitar que reaccione con otros componentes.¹⁸ Algunos efectos secundarios desagradables, tales como la irritación de tejidos, el mal sabor o el mal olor, pueden evitarse también usando CDs como transportadores.¹⁹ Sin embargo, a pesar del potencial de las CDs en la industria farmacéutica y de que muchos principios activos serían susceptibles de beneficiarse de una mejora de sus propiedades farmacocinéticas o de una presentación más apropiada tras su inclusión en una ciclodextrina, el número de formulaciones con CDs en el mercado

actual no es tan elevado como cabría esperar. Esto se debe a la existencia de inconvenientes asociados al uso de CDs tales como:

- la solubilidad en agua de los correspondientes complejos de inclusión es, en muchos casos, insuficiente para aplicaciones biomédicas;
- el carácter hemolítico de la β CD, la más interesante desde el punto de vista industrial, que la hace inadecuada para una administración por vía parenteral;
- la limitada gama de ciclodextrinas naturales comercialmente asequibles y, por tanto, de tamaños de cavidad y propiedades de inclusión disponibles;
- la carencia de elementos de reconocimiento específico frente a receptores biológicos, por lo que los sistemas de transporte basados en ciclodextrinas son esencialmente inespecíficos.

Para ampliar el rango de aplicaciones posibles, se ha desarrollado una serie de CDs modificadas químicamente en los grupos hidroxilos que se conocen como *CDs de segunda generación*.²⁰ Actualmente en el mercado están disponibles a escala industrial derivados metilados de la β CD (DIMEB, TRIMEB y RAMEB), hidroxipropil- β CDs (HP β CD) o sulfobutil- β CDs (Captisol[®]) con patrones de funcionalización estadístico en la mayor parte de los casos, que a su vez han dado lugar a nuevas formulaciones de medicamentos.²¹ Paralelamente a estos esquemas de derivatización estadística, se han desarrollado métodos de síntesis regioselectiva que han permitido acceder a nuevos derivados homogéneamente funcionalizados en los que es posible introducir elementos adicionales de manera controlada, lo que permite modular determinadas propiedades de las CDs, como por ejemplo, antenas de biorreconocimiento (*CDs de tercera generación*).^{22,23,24} Mediante la modificación química selectiva de CDs se ha conseguido, por ejemplo, optimizar simultáneamente la capacidad de las CDs para complejar docetaxel (agente anticanceroso de la familia del Taxol comercializado bajo el nombre de Taxotero[®]) y dotarlas de capacidad de reconocimiento específico a nivel de receptores de la membrana celular.²⁵

Independientemente de su comportamiento como receptores moleculares, las CDs pueden visualizarse como plataformas macrocíclicas de dimensiones nanométricas. La existencia de dos caras bien diferenciadas, con grupos hidroxilos susceptibles de derivatización selectiva,²⁶ permite la incorporación de elementos estructurales o funcionales con total control de su orientación espacial.^{27,28,29} Sistemas de este tipo, entre los que se encontrarían los péptidos macrocíclicos o los calixarenos, son especialmente útiles para el diseño de receptores y ligandos artificiales capaces de imitar procesos de reconocimiento en organismos vivos, tales como interacciones proteína-proteína,^{30,31} carbohidrato-proteína,^{32,33} carbohidrato-ácido nucleico^{34,35} o proteína-ácido nucleico.^{36,37} En esta línea, las CDs se han empleado como núcleos para la elaboración de glicoclústeres,^{27,38} glicoconjugados,³⁹ dendrímeros^{40,41} o polímeros.⁴² Así, se han desarrollado derivados de CD que se comportan como *sistemas inteligentes* de transporte de fármacos,^{25,43} miméticos de superficies celulares que expresan densidades elevadas de ligandos glucídicos²⁸ o incluso máquinas moleculares sensibles a estímulos químicos o físicos.^{13,44}

El trabajo desarrollado en esta Tesis aprovecha precisamente la faceta como plataforma nanométrica de las CDs. En ella se ha abordado la elaboración de estructuras molecularmente bien definidas basadas en CDs capaces de llevar a cabo tareas programadas y específicas. Para ello, se han implementado estrategias de funcionalización que utilizan reacciones quimioselectivas de alta eficacia, minimizando de esta manera el uso de grupos protectores y facilitando la purificación de los compuestos finales. Se ha conseguido acceder a macromoléculas preorganizadas que permiten una correlación más sencilla entre estructura y propiedades supramoleculares, biológicas o de autoorganización, mediante la incorporación secuencial y controlada de elementos funcionales sobre el núcleo de CD. En concreto, esta Tesis se ha centrado en el desarrollo de tres objetivos:

- El diseño de una metodología de funcionalización asistida por soporte sólido para la derivatización controlada de plataformas multifuncionales y su extensión a la preparación de conjugados de CDs.
- La elaboración de estructuras de simetría C_n capaces de actuar como ligandos complementarios de poros n-éricos formados por proteínas (PFPs; pore-forming proteins) implicadas en procesos de internalización de toxinas.
- El desarrollo de conjugados de CDs con capacidad de autoensamblaje aptos para generar sistemas nanoparticulados que permitan el transporte de biomoléculas con propiedades terapéuticas, en especial ácidos nucleicos.

Para alcanzar el primero de estos objetivos se han combinando estrategias clásicas de síntesis en fase sólida y el concepto del anclaje de liberación controlada (*safety-catch linker*),⁴⁵ y se ha desarrollado una metodología que permite transferir covalentemente, y con total quimioselectividad, subunidades previamente elaboradas sobre un soporte sólido directamente a un aceptor multivalente en disolución, minimizando los inconvenientes asociados a la elaboración y purificación de conjugados macromoleculares en disolución.

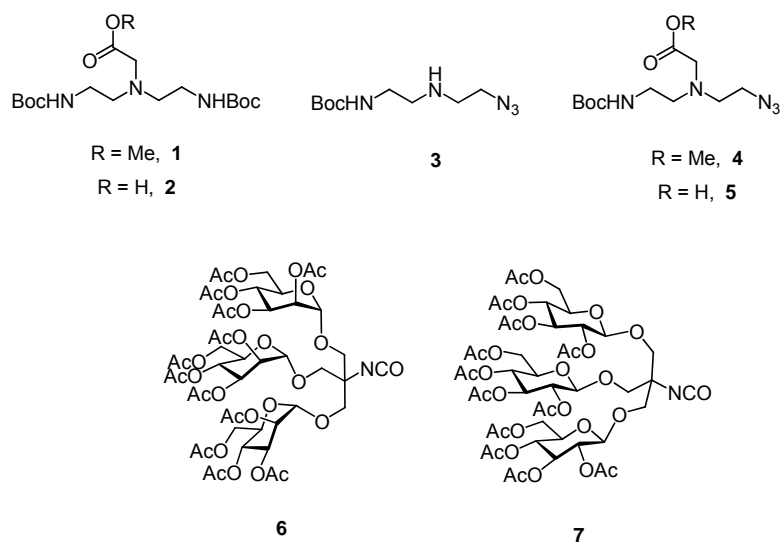
En el segundo apartado se ha explorado la posibilidad de construir derivados de CD selectivamente funcionalizados que puedan bloquear el tráfico de toxinas a través de los poros proteicos que determinados agentes infecciosos pueden formar en la superficie celular. Partiendo del principio de que una simetría compatible entre un receptor biológico y su ligando suele reforzar significativamente su interacción, y considerando la simetría heptamérica de los canales implicados en la internalización de ciertas toxinas como la de *Bacillus anthracis* (ántrax),⁴⁶ es razonable pensar que derivados convenientemente funcionalizados de β CD (ciclomaltoheptaosa) podrían bloquear el acceso de los factores nocivos al interior de las células, actuando así como antitoxinas.

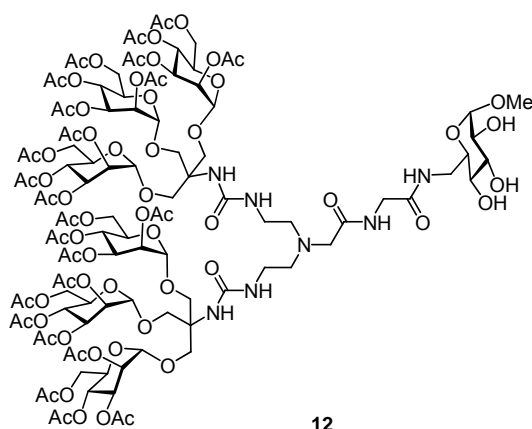
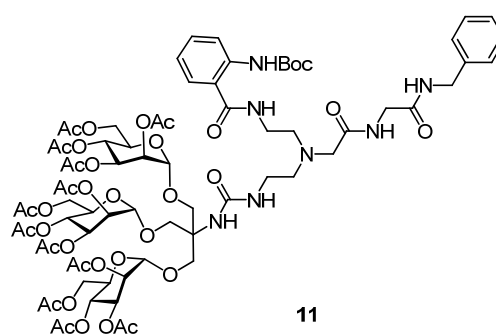
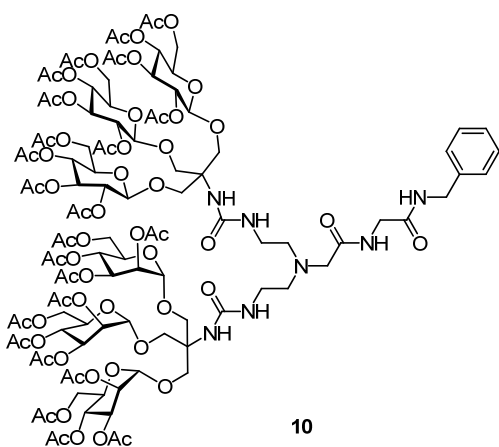
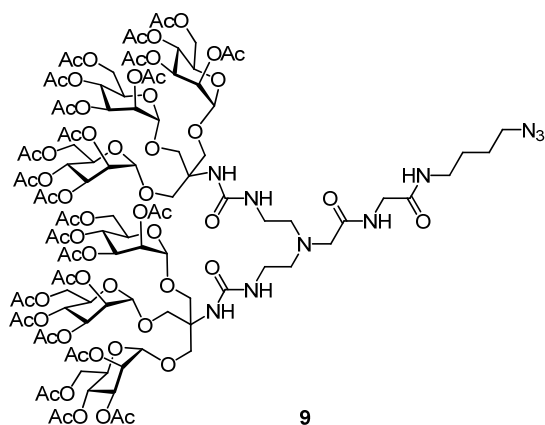
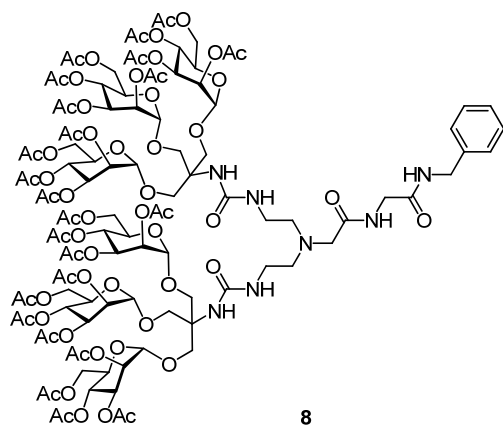
En el tercer apartado se han explotado estrategias de derivatización selectiva de ambas caras de las CDs para elaborar una amplia familia de derivados anfifílicos y

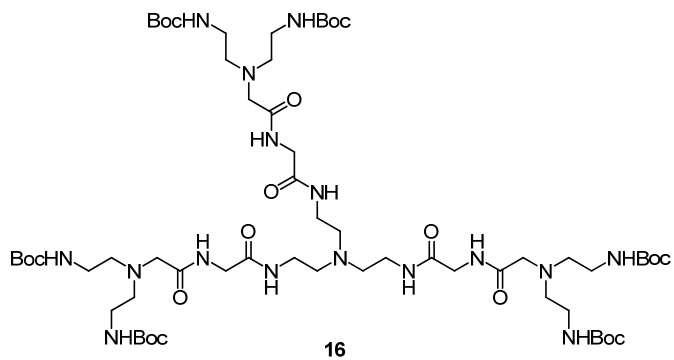
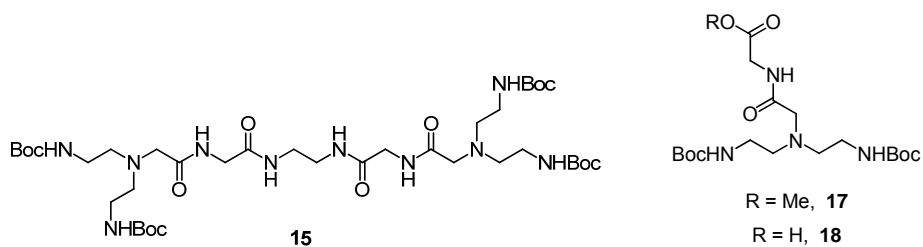
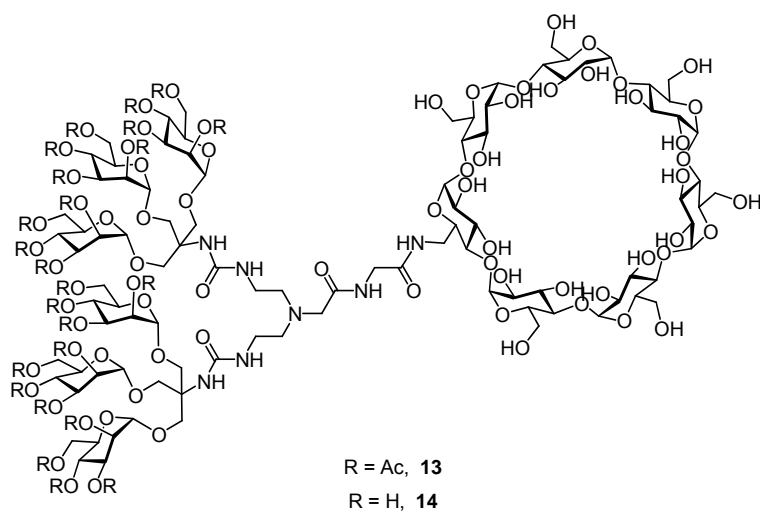
homogéneos capaces de autoorganizarse en presencia de biomoléculas como ácidos nucleicos. Partiendo de la hipótesis de que las propiedades de los nanoagregados dependen de la estructura molecular del conjugado de CD, su capacidad de compactación de material génico y, por tanto, su capacidad de protección y transporte de ADN, podrían ser manipuladas químicamente, lo cual constituiría una poderosa herramienta para el diseño de nuevos vectores artificiales de genes para *terapia génica*.⁴⁷

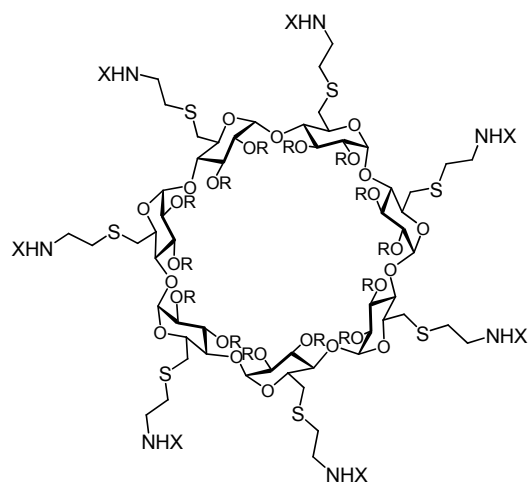
El desarrollo de este trabajo ha dado lugar a la preparación de una serie de nuevos compuestos y precursores cuyas estructuras se describen a continuación:

Funcionalización de plataformas multifuncionales asistida por soportes sólidos:

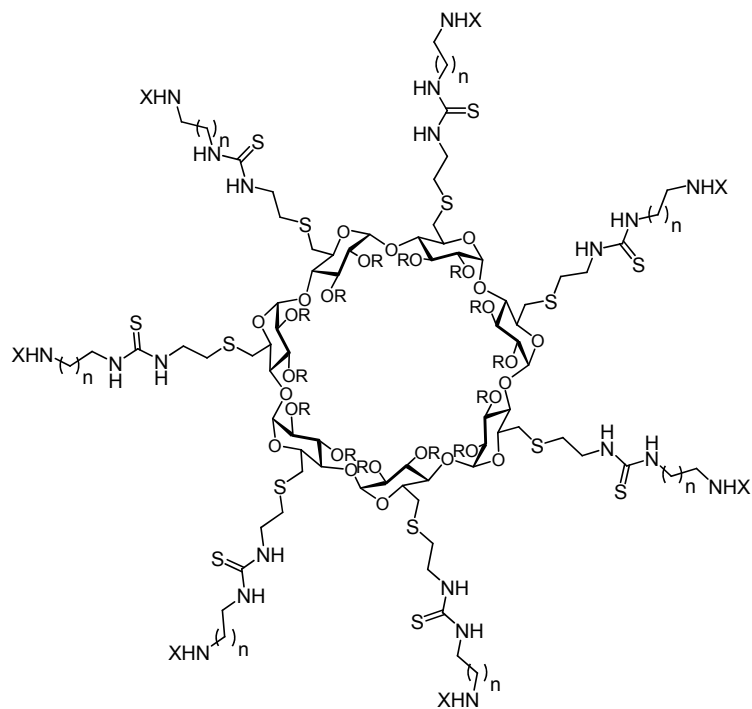




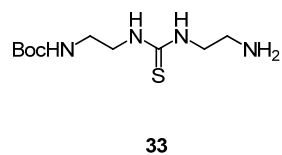
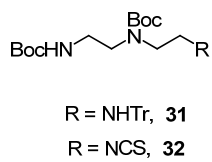
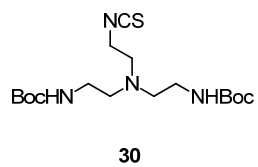


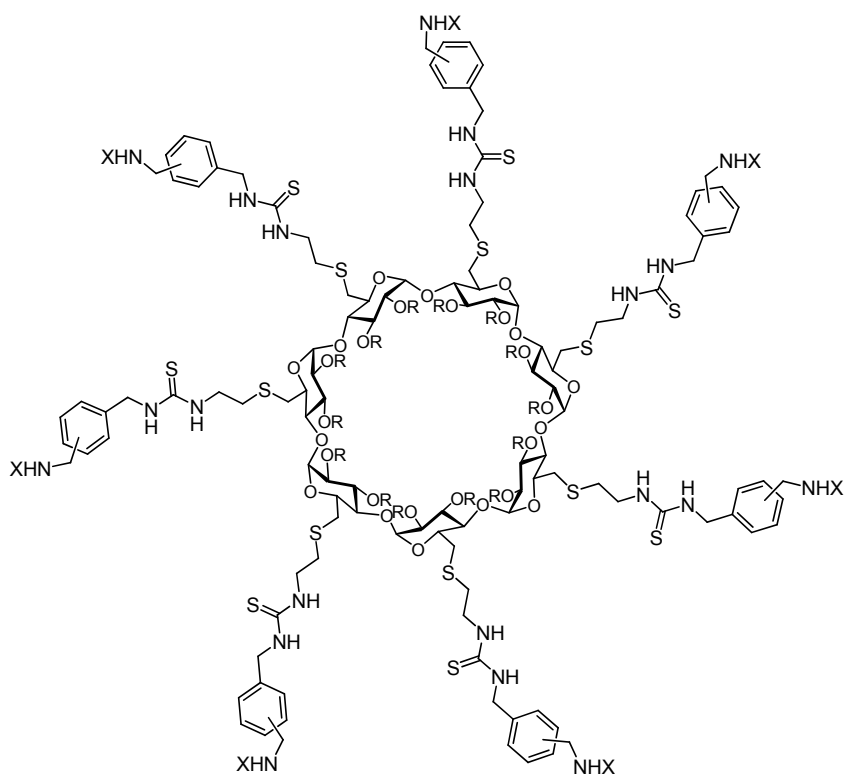
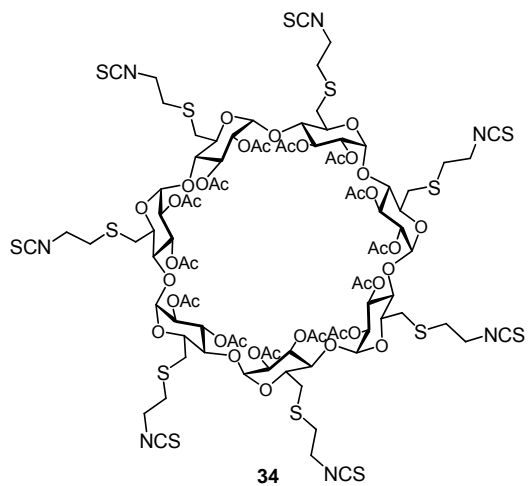
Diseño de antitoxinas del ántrax:

- R = H, X = Boc, **19**
R = Ac, X = Boc, **20**
R = Ac, X = H·TFA, **21**



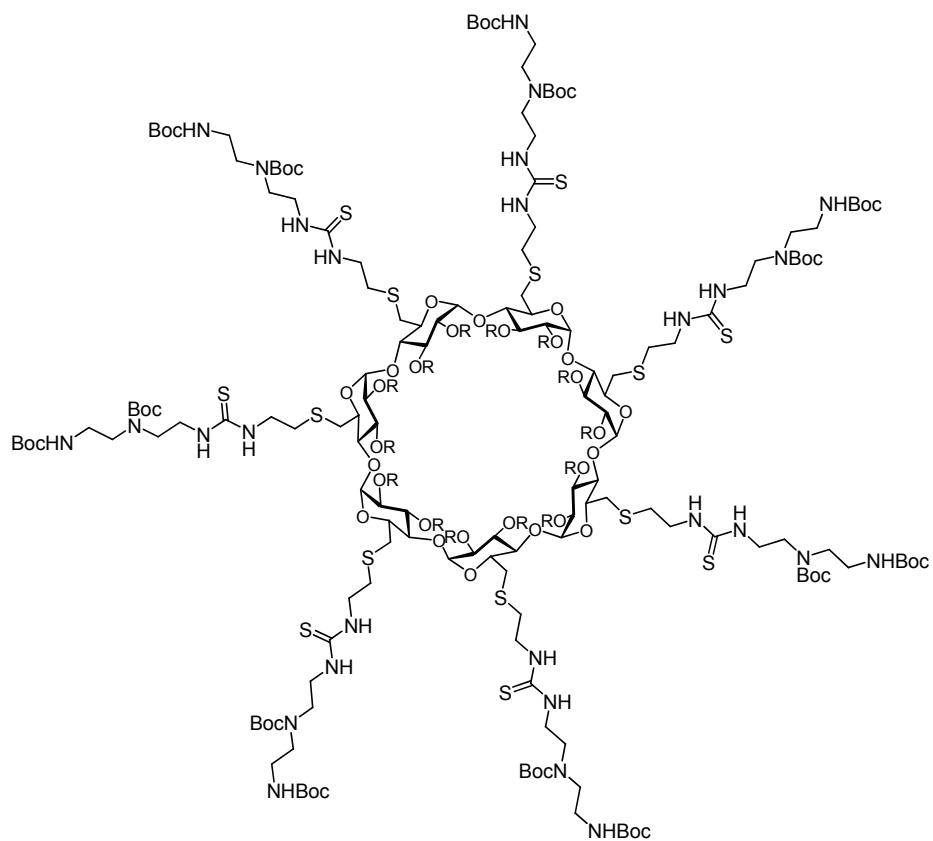
$n = 1$, **22, 23, 24** $R = \text{Ac}$, $X = \text{Boc}$, **22, 25, 27**
 $n = 3$, **25, 26** $R = \text{H}$, $X = \text{Boc}$, **23, 26, 28**
 $n = 5$, **27, 28, 29** $R = \text{H}$, $X = \text{H}\cdot\text{HCl}$, **24, 29**





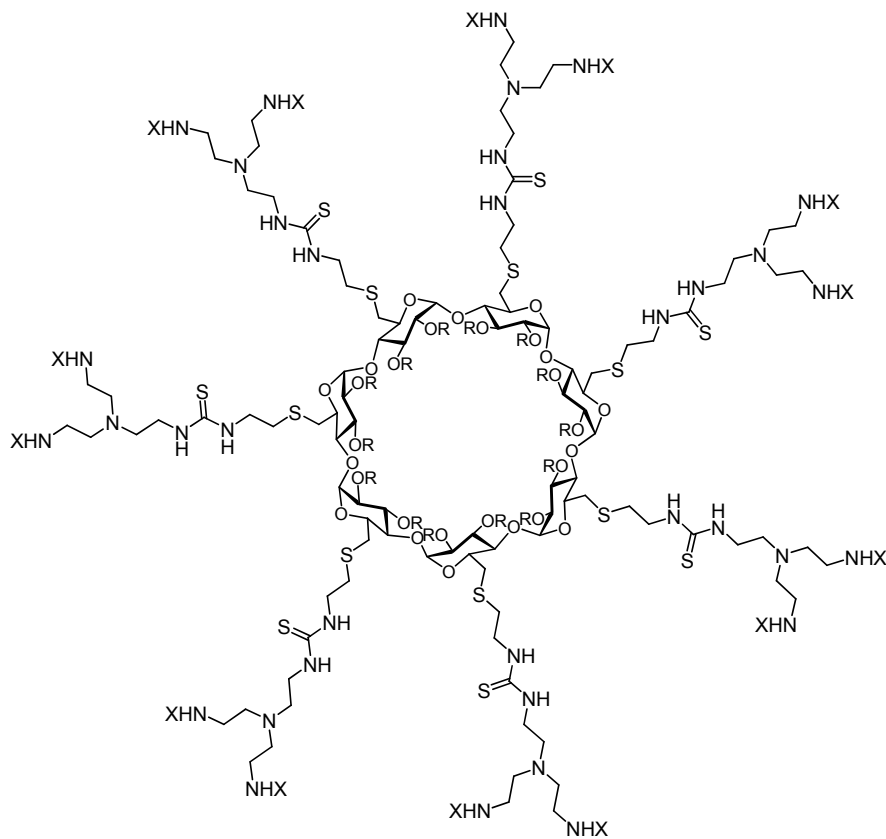
para, **35, 36, 37**
meta, **38, 39, 40**

R = Ac, X = Boc, **35, 38**
 R = H, X = Boc, **36, 39**
 R = H, X = H-HCl, **37, 40**



R = Ac, **41**

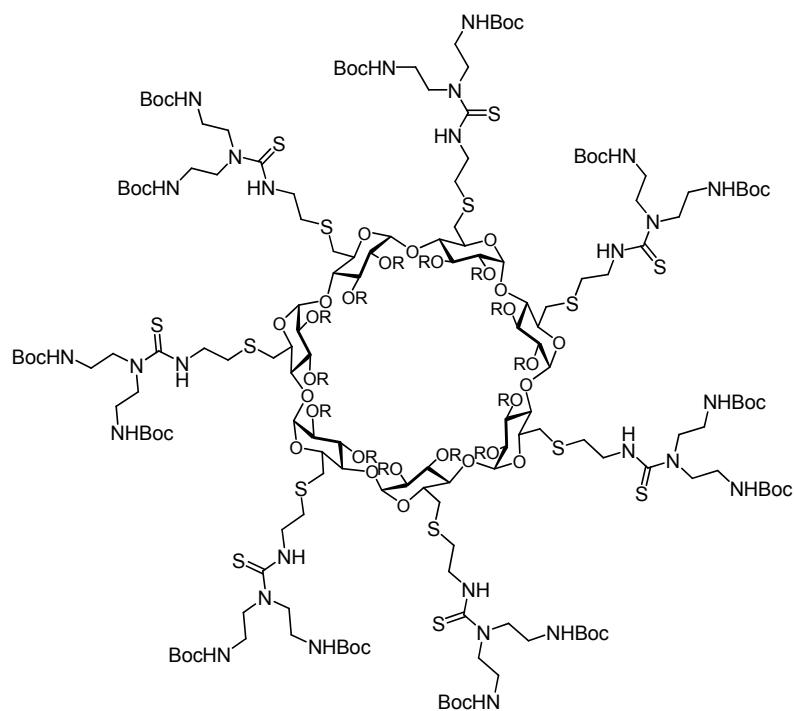
R = H, **42**



R = Ac, X = Boc, **43**

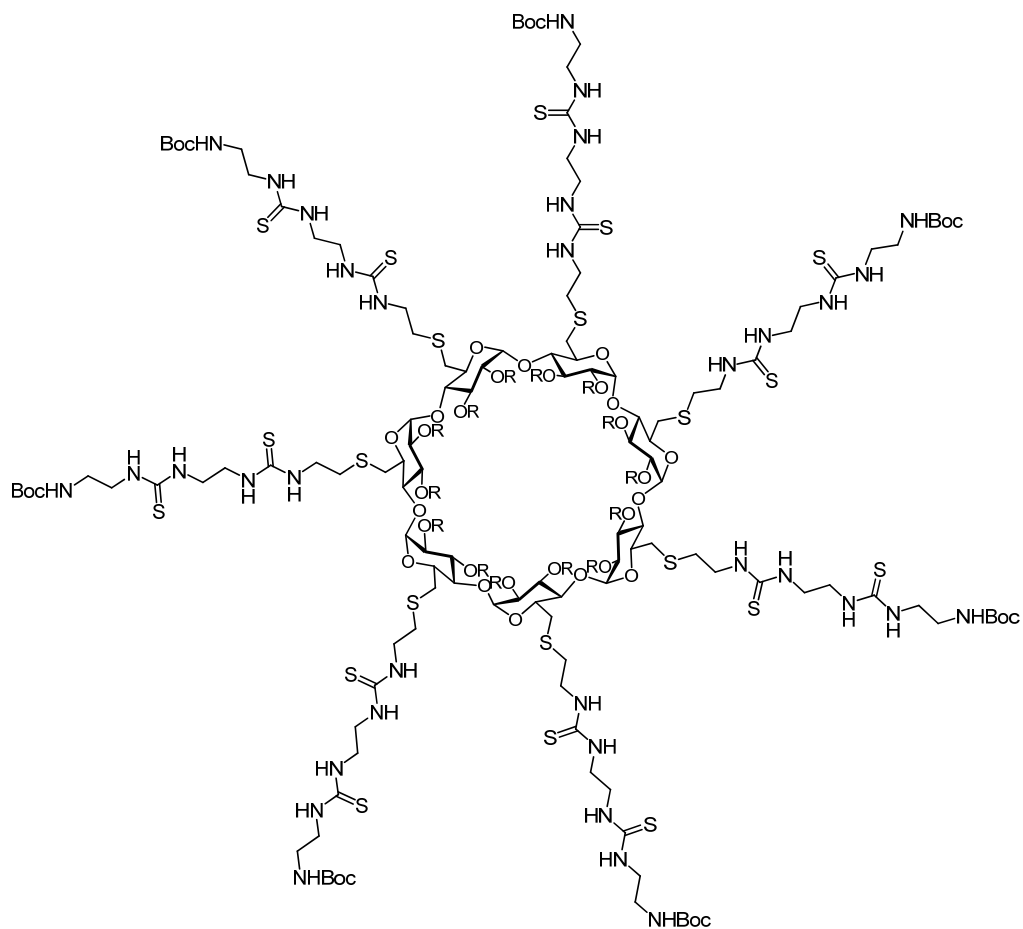
R = H, X = Boc, **44**

R = H, X = H·HCl, **45**



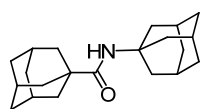
R = Ac, **46**

R = H, **47**

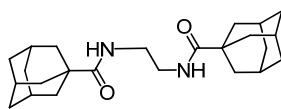


R = Ac, **48**

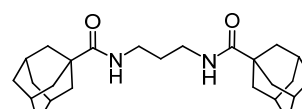
R = H, **49**



50

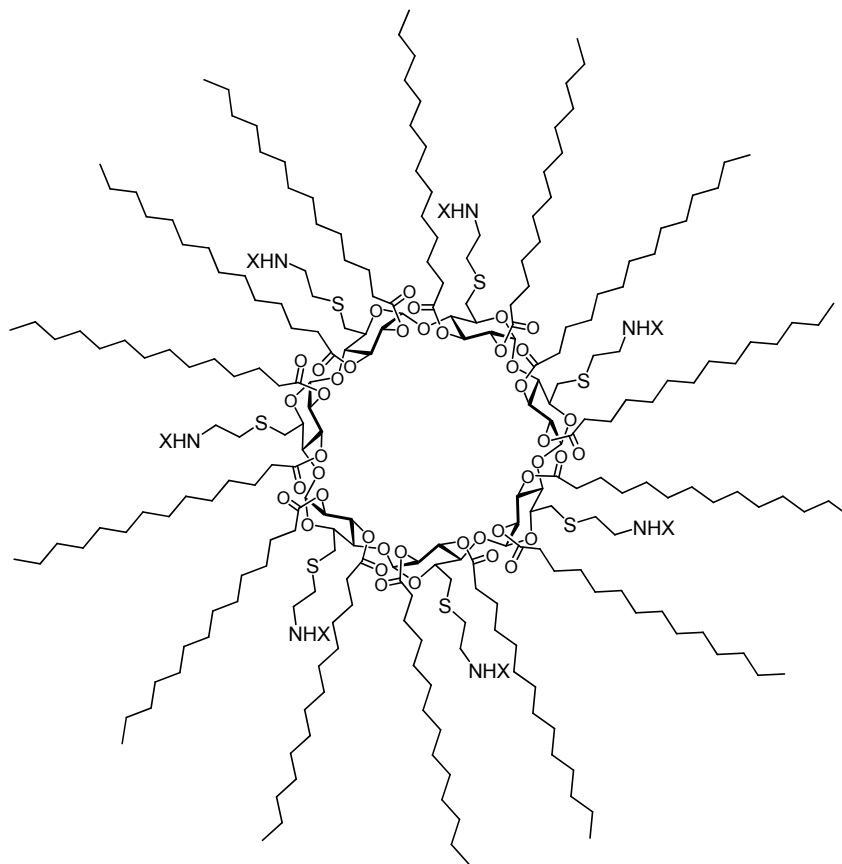


51



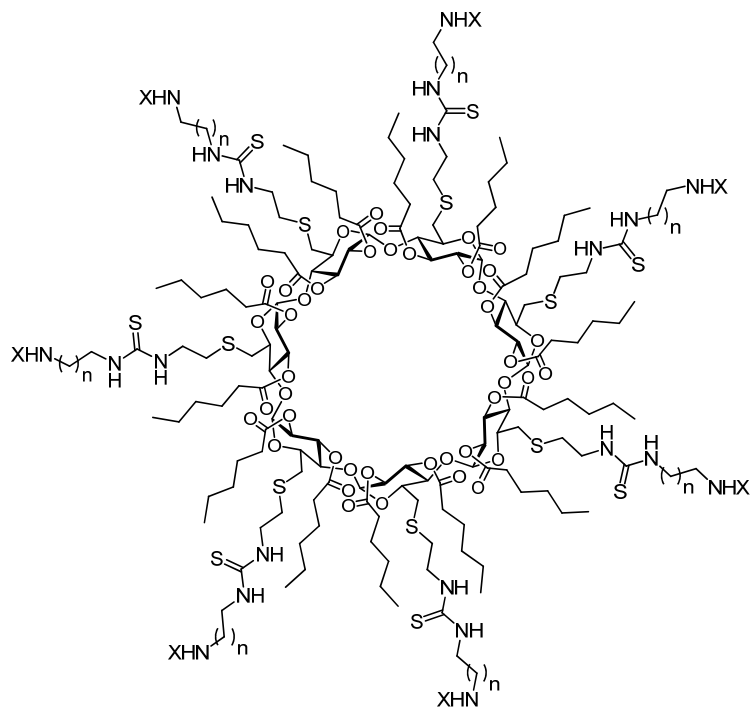
52

Diseño de vectores para transfección basados en ciclodextrinas:

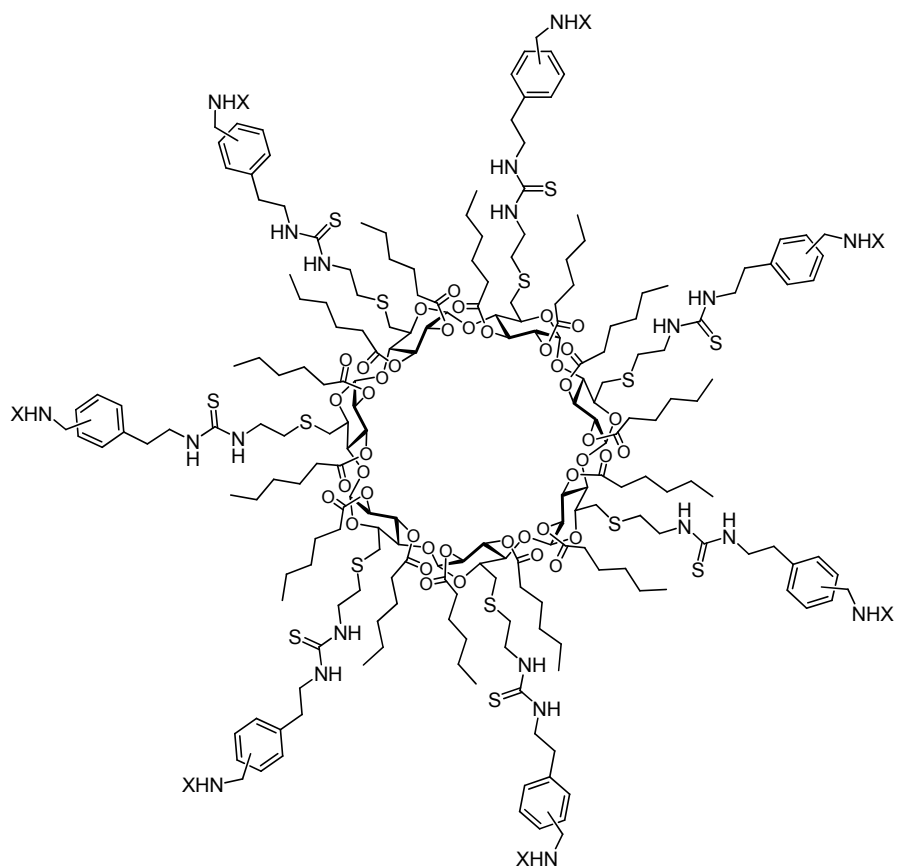


X = Boc, **53**

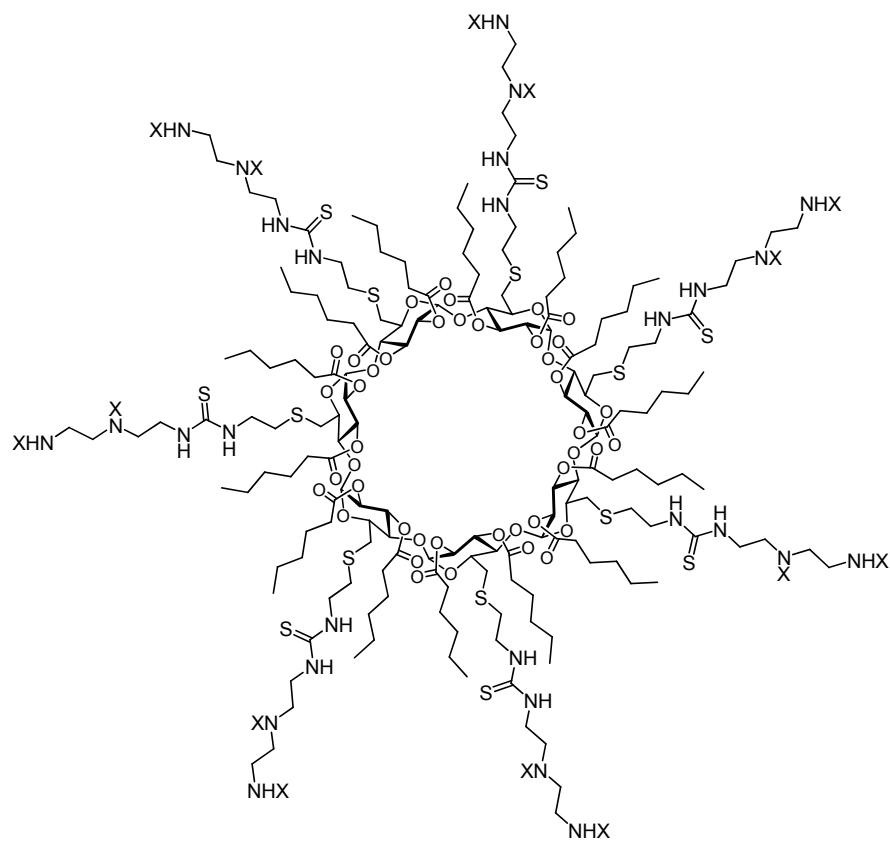
X = H·HCl, **54**



$n = 1$, **55, 56** $X = \text{Boc}$, **55, 57, 59**
 $n = 3$, **57, 58** $X = \text{H}\cdot\text{HCl}$, **56, 58, 60**
 $n = 5$, **59, 60**

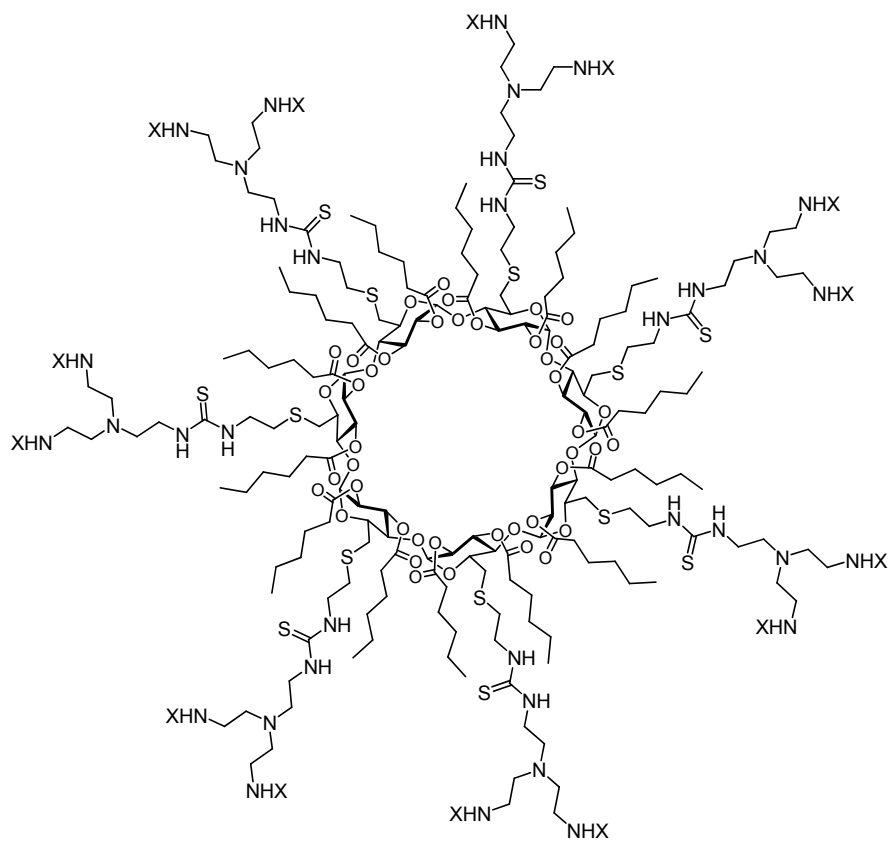


meta, **61**, **62** X = Boc, **61**, **63**
para, **63**, **64** X = H·HCl, **62**, **64**



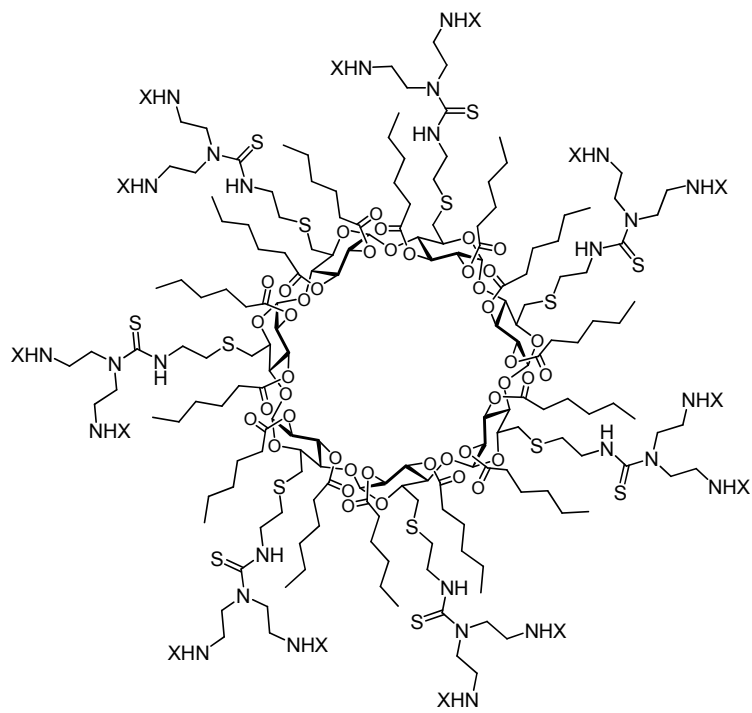
X = Boc, **65**

X = H·HCl, **66**

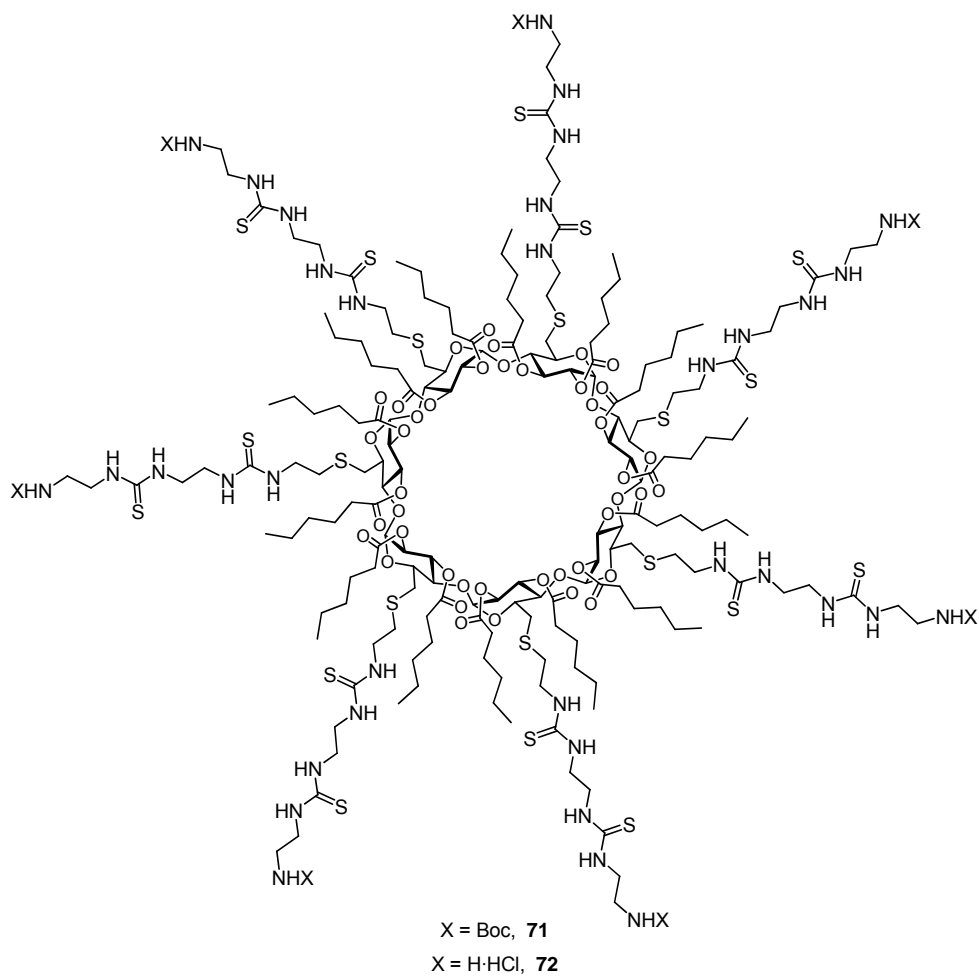


X = Boc, **67**

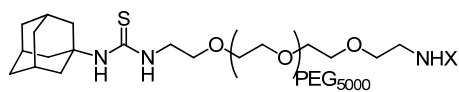
X = H·HCl, **68**



X = Boc, **69**
X = H·HCl, **70**

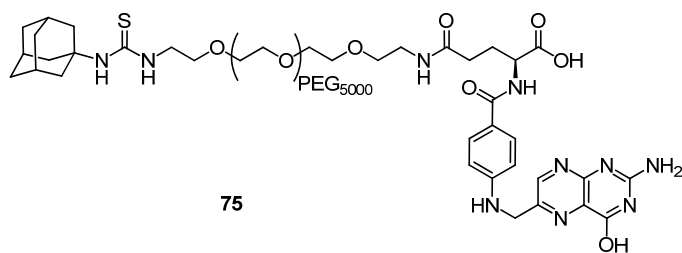


Vectores de genes anfífilos basados en ciclodextrinas para transfección selectiva:

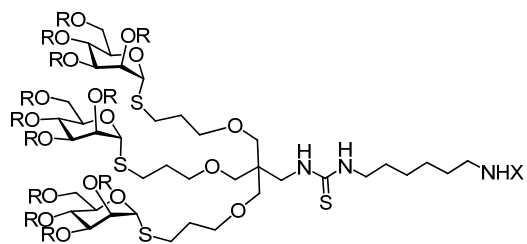


X = Boc, **73**

X = H, **74**



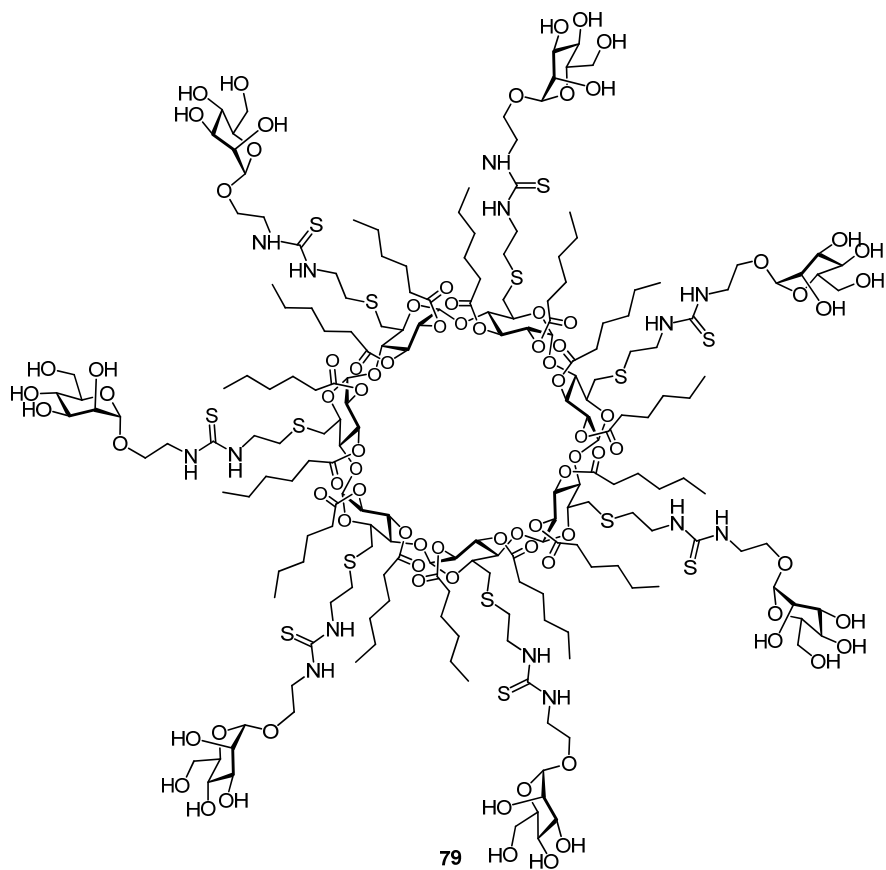
75

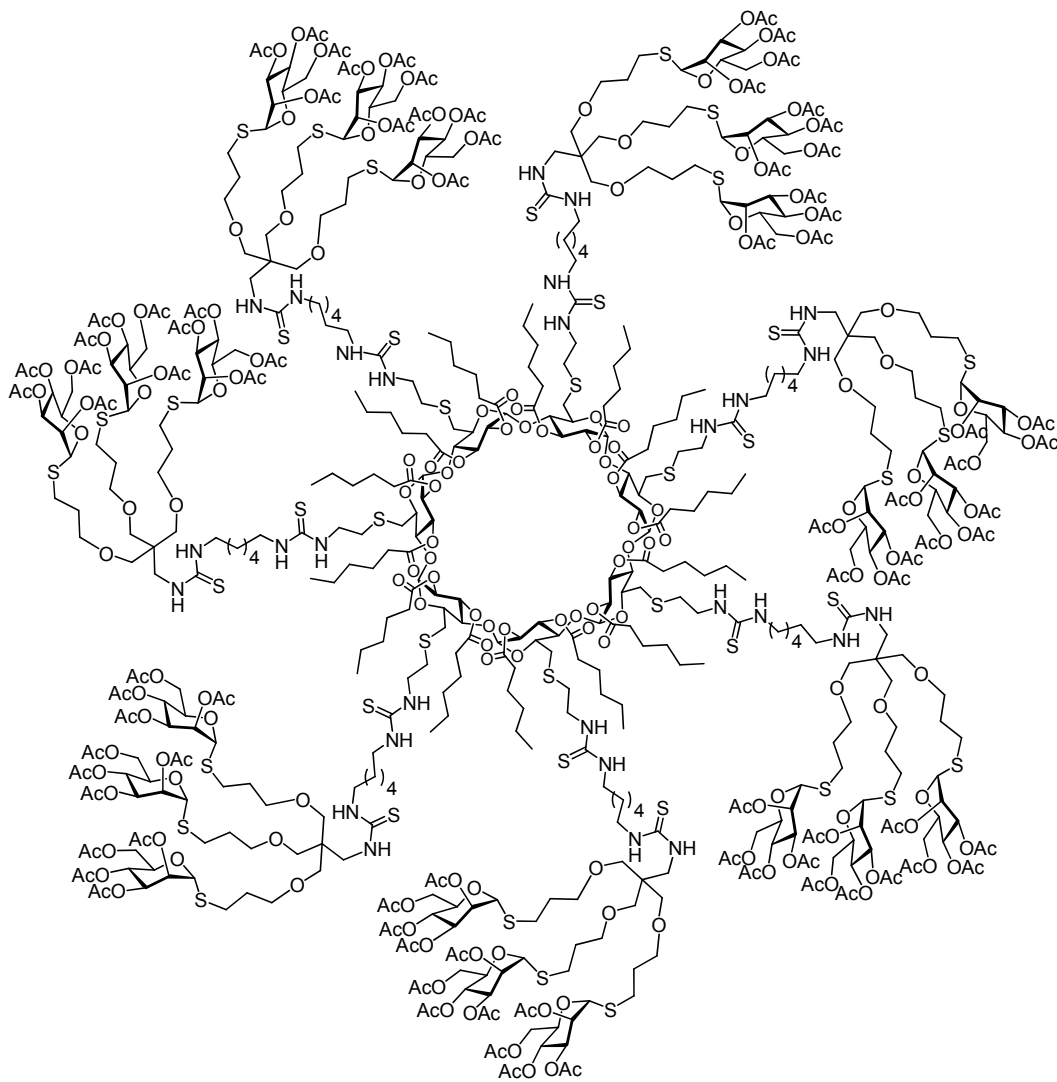


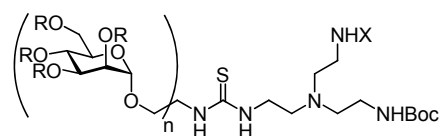
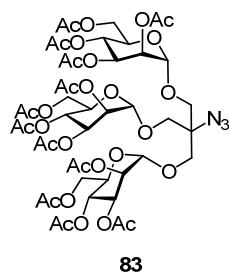
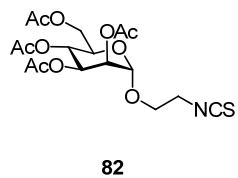
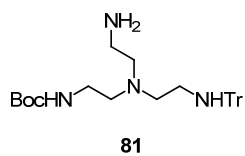
R = Ac, X = Boc, **76**

R = H, X = Boc, **77**

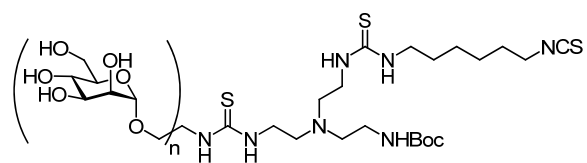
R = H, X = HCl, **78**



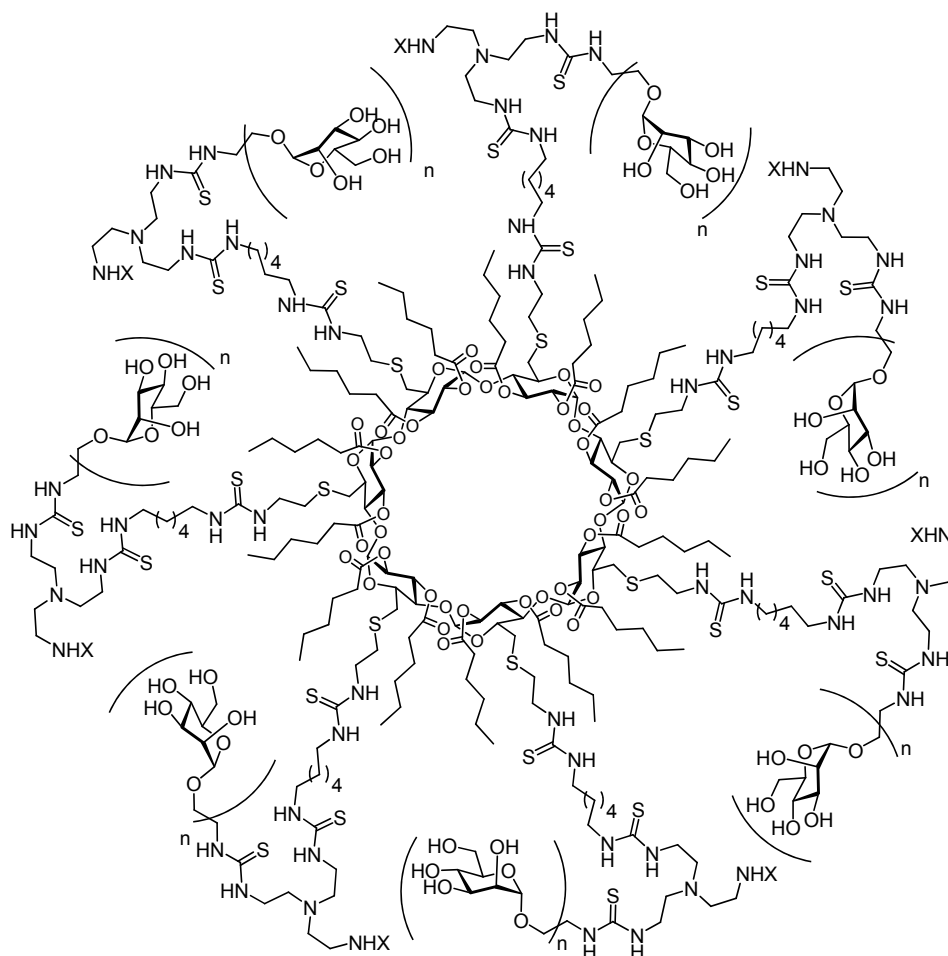




X = Tr, R = Ac, **84, 87**
 n = 1, **84, 85, 86** X = Tr, R = H, **85, 88**
 n = 3, **87, 88, 89** X = R = H, **86, 89**



n = 1, **90**
 n = 3, **91**



n = 1, **92, 93** X = Boc, **92, 94**
 n = 3, **94, 95** X = H·HCl, **93, 95**

El trabajo desarrollado en esta Tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas y patentes:

1. A. Díaz-Moscoso, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández. Efficient use of Ellman Safety-Catch Linker for Solid-Phase Assisted Synthesis of Multivalent Glycoconjugates. *J. Comb. Chem.* **2007**, *8*, 339-342.
2. A. Díaz-Moscoso, P. Balbuena, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, L. Le Gourriérec, C. Di Giorgio, P. Vierling, A. Mazzaglia, N. Micali, J. Defaye, J. M. García Fernández. Rational Design of Cationic Cyclooligosaccharides as Efficient Gene Delivery Systems. *Chem. Commun.*, **2008**, 2001-2003.
3. N. Guilloteau, L. Le Gourriérec, A. Díaz-Moscoso, C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, J. M. García Fernández. Targeted β -Cyclodextrine-Based Gene Delivery Systems: Physicochemical and Transfection Studies. *Hum. Gene Ther.* **2008**, *19*, 1154.
4. A. Díaz-Moscoso, L. Le Gourriérec, M. Gómez-García, J. M. Benito, P. Balbuena, F. Ortega-Caballero, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández. Polycationic Amphiphilic Cyclodextrins for Gene Delivery: Synthesis and Effect of Structural Modifications on Plasmid DNA Complex Stability, Cytotoxicity and Gene Expression. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12871-12888.

5. A. Díaz-Moscoso, N. Guilloteau, J. L. Jiménez Blanco, M. Gómez-García, J. M. Benito, L. Le Gourriérec, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández. Preorganized Macromolecular Gene Delivery Systems: Polycationic Glyco-Amphiphilic Cyclodextrins. *Chem. Eur. J.* **2010**, enviado.
6. A. Díaz-Moscoso, D. Vercauteren, J. Rejman, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, S. C. De Smedt, J. M. García Fernández. Insights on Cellular Uptake Mechanisms of pDNA–Polycationic Amphiphilic Cyclodextrin Nanoparticles (CDplexes). *J. Control. Rel.* **2010**, aceptado.
7. J. Defaye, P. Balbuena, J. M. Benito, A. Díaz-Moscoso, C. Di Giorgio, J. M. García Fernández, A. Gèze, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, P. Vierling, D. Wouessidjewe “Novel amphiphilic cyclodextrin derivatives”. FR2903987, **2006**; WO2008009831, **2008**; CA2658459, **2008**; EP2044128, **2009**.

2. FUNCIONALIZACIÓN DE CICLODEXTRINAS ASISTIDA POR SOPORTES SÓLIDOS

2. Funcionalización de ciclodextrinas asistida por soportes sólidos

Las construcciones moleculares multifuncionales se han convertido en herramientas fundamentales para el diseño y elaboración de nuevos materiales con propiedades que se pueden aplicar en una gran diversidad de campos, desde tecnológicos hasta terapéuticos.⁴⁸ Las propiedades intrínsecas asociadas a estas estructuras monodispersas y bien definidas, tales como la capacidad de controlar el tamaño, la forma o el modo de presentación de sus elementos constitucionales en la escala nanométrica, están en el origen del interés que ha atraído su desarrollo hasta el punto de convertirse en uno de los pilares de la conocida como *revolución nanotecnológica*.⁴⁹

2.1. Plataformas multifuncionales con carbohidratos

La investigación de los fenómenos de reconocimiento biológico que implican carbohidratos, que constituyen la base de un gran número de procesos fundamentales a nivel celular, está viéndose especialmente beneficiada por el avance de la nanotecnología. El reconocimiento de glicoconjugados por lectinas (sus receptores biológicos) expresadas en la superficie celular regula una gran cantidad de procesos biológicos como el transporte, la diferenciación o la adhesión celular, la respuesta inmune, la traducción de señales bioquímicas o la metástasis del cáncer.⁵⁰ Por ello, el diseño de moléculas capaces de interferir en dicho reconocimiento se ha convertido en una herramienta muy eficaz, tanto desde el punto de vista académico como práctico, que ha facilitado el desarrollo de la glicómica en los últimos años.⁵¹

No obstante, el diseño de moléculas para el estudio de estos fenómenos, constituye un reto importante. La afinidad carbohidrato-proteína es generalmente débil ($K_a \sim 10^{3-4} \text{ M}^{-1}$) y, para alcanzar valores de afinidad biológicamente relevantes, ligando y receptor deben mostrar una presentación multivalente, lo que conduce a afinidades mayores de la que cabría esperar de la suma de las interacciones individuales. Este fenómeno, conocido como efecto multivalente o clúster,^{52,53,54} es una superposición de

múltiples factores y depende íntimamente no solo del número de elementos de reconocimiento en ligando y receptor, sino también del modo de presentación de cada uno de ellos.⁵⁵ El diseño de inhibidores de toxinas bacterianas como la del cólera es un ejemplo representativo del potencial terapéutico de esta aproximación: Fan⁵⁶ y Bundle⁵⁷ diseñaron, sobre la estructura de esta toxina, ligandos multivalentes capaces de interactuar simultáneamente con varios sitios de reconocimiento, observando afinidades hasta un millón de veces superiores a las del ligando monovalente (Figura 2).

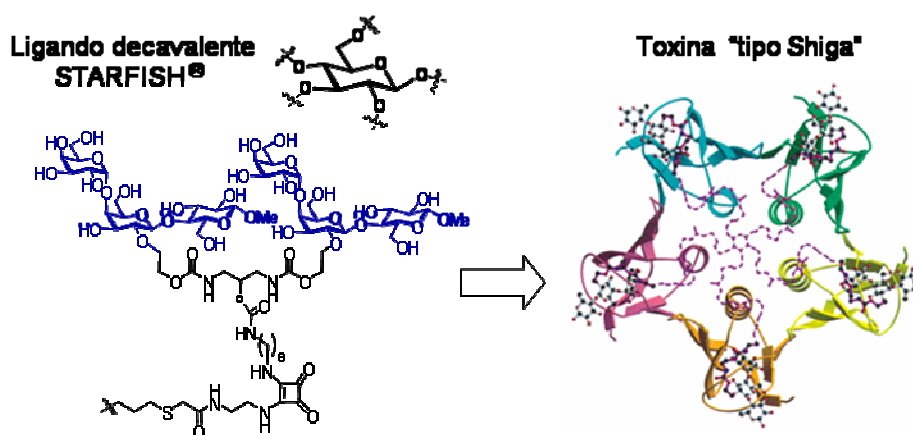


Figura 2. Estructura del ligando decavalente (STARFISH®) inhibidor de la toxina del cólera tipo Shiga descrito por Bundle.⁵⁷

Este ejemplo ilustra como el diseño racional de ligandos artificiales basado en el conocimiento de la estructura del receptor biológico ha permitido realizar importantes avances biomédicos. Sin embargo, el desconocimiento de la estructura de muchos de los receptores que median en los procesos de comunicación celular impide aplicar una estrategia racional y directa en la mayoría de los casos. Como alternativa, se ha explotado la variación sistemática del modo de presentación de los motivos de reconocimiento y su análisis conjunto mediante diversas técnicas para obtener ligandos eficaces, cuya preparación y purificación es generalmente complicada y requiere un esfuerzo sintético considerable.⁴¹ Para el diseño de estos sistemas se han empleado numerosos tipos de

plataformas moleculares, desde moléculas de baja valencia, elaboradas sobre una cadena lineal o ramificada, hasta polímeros multivalentes, pasando por plataformas más o menos definidas a nivel molecular como las estructuras dendríticas y proteínas globulares (Figura 3).^{52,58}

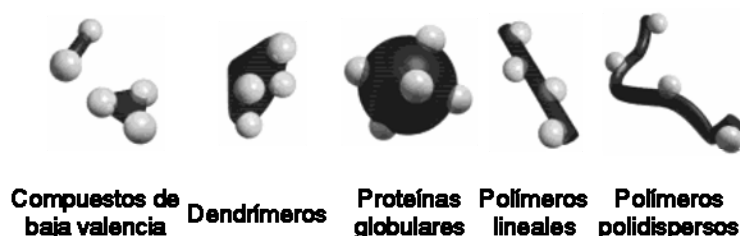


Figura 3. Tipos de plataformas moleculares empleadas en el diseño de sistemas multivalentes.

En este contexto, las plataformas preorganizadas basadas en estructuras rígidas han demostrado tener un interés especial. Plataformas molecularmente bien definidas, con una valencia conocida, que presenten una orientación precisa de sus elementos estructurales, permiten lograr una distribución controlada (eventualmente predecible) de los ligandos que se les acoplen. Existe una diversidad de estructuras moleculares que puede cumplir esta labor como plataformas rígidas que, según sus dimensiones, van desde moléculas pequeñas, como derivados aromáticos o monosacáridos, hasta macrociclos como éteres corona, calixarenos o ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas constituyen un ejemplo único de complementariedad entre nano- y biotecnología, lo que las convierte en plataformas multifuncionales privilegiadas. Entre las virtudes que las diferencian de otros candidatos cabe destacar su aptitud, ya comentada, para formar complejos supramoleculares con otras especies orgánicas debido a las propiedades de su nanocavidad, su carácter biocompatible y su capacidad de autoasociación para dar lugar a nanoestructuras. Estas características, unidas a la diversidad de estrategias disponibles para su funcionalización química selectiva, ofrecen excelentes oportunidades para la elaboración de macromoléculas preorganizadas con un

control preciso de su estructura tridimensional. Por último, la disponibilidad de las CDs a una escala que permite no solo el desarrollo de estudios fundamentales, sino también de aplicaciones comerciales, las convierte en una familia única de nanomateriales y justifica el esfuerzo que se viene realizando en la caracterización y desarrollo de aplicaciones en multitud de áreas como el transporte activo de agentes terapéuticos⁶ o la catálisis.¹⁵

2.2. Estrategias para la funcionalización selectiva de ciclodextrinas

La modificación química de ciclodextrinas en sus orígenes tuvo como propósito modificar la solubilidad en agua de las CDs naturales (o *CDs de primera generación*), especialmente de la β CD. Dentro de esta serie de CDs modificadas, conocidas como *CDs de segunda generación*, existe una amplia variedad de derivados alquilados, hidroxialquilados o sulfoalquilados, algunos de ellos preparados en escala industrial. Sin embargo, en muchos casos estos derivados son productos heterogéneos, resultado de funcionalizaciones estadísticas, lo cual, aunque no ha sido un serio obstáculo para el desarrollo de algunas aplicaciones farmacéuticas, dificulta una caracterización rigurosa y limitan las aplicaciones que requieran una distribución precisa de los elementos ensamblados sobre la plataforma de CD.

De hecho, las estrategias de modificación selectiva de CDs para obtener productos homogéneos ofrece, a partes iguales, enormes posibilidades y retos.²⁶ Por un lado, las CDs han demostrado ser valiosas herramientas para investigar la actividad catalítica de enzimas,¹⁷ para diseñar sensores específicos,^{14,59} transportadores moleculares^{18,25} o soportes multivalentes.^{28,38} Sin embargo, la complejidad de la estructura de las CDs naturales, con un gran número de grupos hidroxilo que presentan sutiles diferencias de reactividad y accesibilidad, unido a sus propiedades supramoleculares, hacen que el número de estrategias verdaderamente eficaces para la funcionalización selectiva sea relativamente bajo.⁶⁰

A pesar de los esfuerzos realizados,¹⁵ las estrategias para diferenciar selectivamente uno o varios de los hidroxilos presentes en la estructura de las CDs,

continúa siendo un serio obstáculo para desarrollar determinadas aplicaciones. Las técnicas descritas para ello y utilizadas en la actualidad se pueden agrupar en tres categorías:

- Métodos “inteligentes” que aprovechan las peculiaridades supramoleculares de la propia CD para obtener el producto deseado.^{61,62}
- Métodos basados en el uso de grupos protectores y secuencias más o menos largas de protección-desprotección para funcionalizar selectivamente posiciones de otro modo inaccesibles.⁶³
- Métodos basados en reacciones estadísticas que conducen a mezclas de productos cuya separación puede resultar más o menos compleja.

El problema asociado a la funcionalización selectiva es aún más complicado de resolver cuando lo que se pretende no es solo diferenciar uno o varios de los grupos hidroxilo de la CD, sino ensamblar elementos complejos capaces de desarrollar funciones adicionales como, por ejemplo, grupos catalíticos, antenas de reconocimiento biológico, elementos de autoensamblaje o incluso biomoléculas. Aunque metodologías complementarias a los métodos clásicos, como la síntesis enzimática, han contribuido significativamente a facilitar dicha funcionalización,¹⁷ su versatilidad es limitada. Por tanto, continúa siendo necesaria la implementación de nuevas metodologías eficaces para la obtención de derivados selectivamente funcionalizados de estas plataformas multivalentes que simplifiquen el aislamiento y la purificación de los productos para desarrollar aplicaciones más allá de la investigación fundamental.

El uso de soportes sólidos para la funcionalización de plataformas multivalentes es un área poco investigada, a pesar de que las técnicas de síntesis en fase sólida ofrecen excelentes ventajas que merece la pena explorar. Entre los méritos de la química en fase sólida destacan la posibilidad de automatización, y consiguiente aceleración, del esquema sintético y, fundamentalmente, la simplificación de la purificación final de los productos que, idelamente, consiste en un simple proceso de filtración. Estos son inconvenientes

recurrentes en la química de CDs y, por lo general, en la funcionalización de moléculas multifuncionales.

2.3. Estrategias de síntesis basadas en el empleo de soportes sólidos

2.3.1. Síntesis en fase sólida y asistida por polímeros

Desde que Merrifield describió por primera vez su uso en 1963⁶⁴ (recibiría el Premio Nobel en 1984 por este motivo), la síntesis en fase sólida se ha convertido en una herramienta extraordinariamente eficaz, fiable y popular para la preparación de péptidos y oligonucleótidos. La ventaja intrínseca de este tipo de técnicas consiste en la facilidad para la separación y purificación de productos, lo que permite, además, usar excesos de reactivos para conseguir completar las reacciones (Esquema 1). Más recientemente se ha ampliado su aplicación a multitud de métodos de síntesis de heterociclos y a las tecnologías de síntesis automatizada de alta eficacia, que hoy día constituyen herramientas fundamentales de la química combinatoria. Sin embargo, las metodologías de síntesis en fase sólida también presentan importantes limitaciones, como las asociadas a la escala de trabajo, la monitorización en tiempo real del curso de las reacciones, la necesidad de reoptimización de reacciones en fase homogénea, la eventual presencia de “vestigios” de la unión con el soporte sólido en los productos finales o la necesidad de diseñar esquemas sintéticos que incorporen dos pasos adicionales (el acoplamiento y liberación del soporte sólido).

Una alternativa a esta versión clásica de la síntesis en fase sólida que mantiene algunas de sus ventajas y evita ciertos inconvenientes es la síntesis asistida por reactivos⁶⁵ y catalizadores soportados (Esquema 1).⁶⁶ Aunque los reactivos soportados se vienen empleando desde los años 60,⁶⁷ su rápido desarrollo en los últimos años ha ido ligado al interés de la industria farmacéutica por la preparación de colecciones de compuestos mediante síntesis en paralelo. Además de permitir aumentar significativamente la escala de trabajo, la metodología permite monitorizar el curso de las reacciones e incluso

eliminar impurezas y subproductos que, de otro modo, contaminarían irreversiblemente el producto anclado a un soporte sólido.

Síntesis en fase sólida

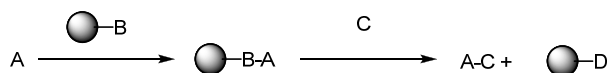


Síntesis en disolución asistida por reactivos soportados



Esquema 1. Esquema general de la síntesis en fase sólida frente a la síntesis en disolución asistida por reactivos soportados.

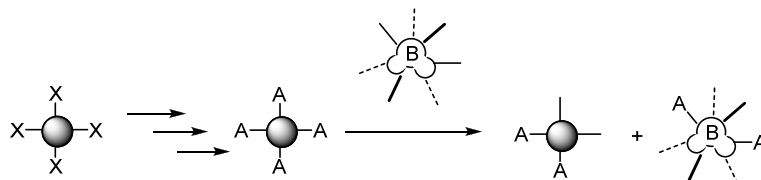
Al amparo de estas metodologías han emergido diferentes estrategias que hacen uso de soportes sólidos, como las que utilizan el concepto de “captura y liberación” (*catch-and-release*).⁶⁸ El uso de un soporte sólido convenientemente funcionalizado para capturar covalente o supramolecularmente el producto (*catch*) de una disolución, separándolo temporalmente de contaminaciones o subproductos, y permitiendo su liberación posterior (*release*), permite visualizar una técnica híbrida entre la síntesis en fase sólida y asistida por reactivos soportados (Esquema 2).



Esquema 2. Esquema general del concepto de “captura y liberación”.

Contribuciones como las realizadas por el grupo de Ley durante los últimos años dan una clara perspectiva del nivel de excelencia alcanzado por estas técnicas⁶⁹ y demuestran como su combinación puede resultar de gran utilidad para la síntesis de productos naturales.⁷⁰

En principio, la funcionalización de plataformas multifuncionales podría verse facilitada mediante la aplicación de las metodologías de síntesis asistida por soportes sólidos.^{33,71} Una estrategia que permitiese transferir covalentemente los elementos funcionales a la plataforma de forma directa y selectiva desde un soporte sólido representaría una ventaja sustancial sobre los métodos clásicos de funcionalización en disolución (Esquema 3). Esto simplificaría el proceso de purificación de los conjugados, aún en el caso de usar excesos importantes de elemento que se transfiere dado que este permanecería soportado. Además, si fuese posible construir los elementos funcionales que se pretenden transferir sobre el mismo soporte sólido podrían aprovecharse el resto de ventajas que ofrecen las metodologías de síntesis en fase sólida.

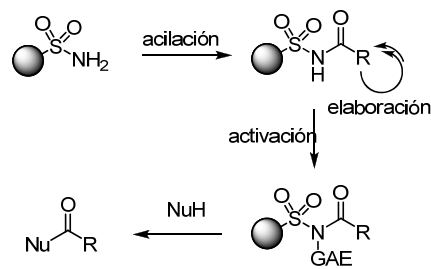


Esquema 3. Esquema general del concepto de transferencia funcional desde el soporte sólido.

2.3.2. Concepto de anclaje de seguridad o de liberación controlada

La dificultad intrínseca para implementar el concepto anteriormente expuesto radica en la necesidad de disponer de una función química de anclaje al soporte sólido que sea completamente resistente a las condiciones de elaboración del elemento funcional y, al mismo tiempo, lo suficiente reactiva como para transferirlo en las condiciones más suaves posibles a la plataforma molecular de destino.

Una solución creativa para compaginar estas dos características, en principio incompatibles, la propuso Kenner hace casi 40 años. En 1971, describió el concepto del elemento de anclaje de seguridad o de liberación controlada (*safety-catch linker*),⁷² basado en la utilización de un grupo funcional químicamente inerte al abanico de condiciones de reacción más amplio posible y que, tras una activación selectiva, se convierte en un grupo lábil en condiciones suaves. La aplicación diseñada por Kenner para demostrar su concepto, orientada a la síntesis en fase sólida de péptidos, en alza en aquella época, se basaba en la utilización de una N-acilsulfonamida aromática como elemento de anclaje al soporte sólido que, tras ser N-alquilada, liberaba el conjugado en presencia de nucleófilos en condiciones suaves (Esquema 4). Las N-acilsulfonamidas son inertes en condiciones ácidas (TFA, HBr-AcOH) necesarias para la eliminación de algunos grupos protectores, mientras que el medio alcalino ioniza el grupo NH ($pK_a \sim 2.5$), haciendo que la función amida sea muy resistente al ataque nucleófilo. Cuando se produce la alquilación en el nitrógeno de la acilsulfonamida la ionización ya no es posible y el grupo carbonilo se vuelve muy sensible al ataque por nucleófilos.



GAE = Grupo Atractor de Electrones

Esquema 4. Esquema general del concepto de "liberación controlada" (safety-catch linker).

La repercusión limitada que tuvo en su momento el concepto original de Kenner se debe a la dificultad de incorporar en el esquema sintético el nuevo grupo funcional (la N-acilsulfonamida) en comparación con otros elementos de enlace convencionales. Sin embargo, el principio del anclaje de seguridad ha sido explorado empleando la reactividad química peculiar de una amplia gama de grupos funcionales, describiéndose versiones alternativas en las que la activación del elemento de anclaje se logra mediante otras estrategias como, por ejemplo, la oxidación de un tioéter a una sulfona⁷³ o la reducción de un sulfóxido a sulfuro (anclaje de seguridad de Lebl (*Scal linker*)).⁷⁴ Otros ejemplos de anclajes de seguridad son las benzoínas fotosensibles protegidas como ditianos descritas por Chan⁷⁵ y Routledge,⁷⁶ los basados en selenio descritos por Nicolaou,⁷⁷ o los derivados de catecoles⁷⁸ (Figura 4).

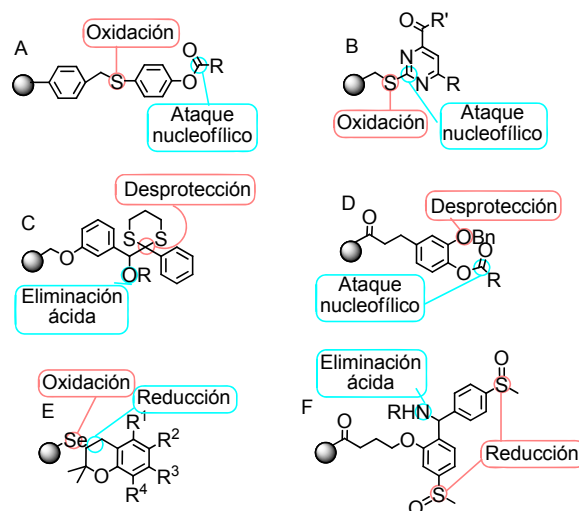


Figura 4. Ejemplos de anclajes de liberación controlada, indicando el punto de activación (rojo) y el de liberación (azul). A y B, oxidación de un tioéter a una sulfona;⁷³ C, benzoinas fotosensibles protegidas como ditianos;^{75,76} D, catecoles;⁷⁸ E, basados en selenio descritos por Nicolaou;⁷⁷ F, anclaje de seguridad de Lebl.⁷⁴

Más recientemente, los problemas asociados al diseño original de la sulfonamida de Kenner han sido en buena parte resueltos por Ellman mediante la optimización de la estructura del elemento de anclaje y del método de activación (Figura 5).^{79,80} Por un lado, el uso de una sulfonamida alifática aumenta la eficacia de la etapa de incorporación en el soporte del elemento de anclaje (acilación inicial) y la de la activación previa a la liberación (alquilación final). Por otro, el uso de haloacetnitrilos como agentes alquilantes simplifica la etapa de activación y asegura una mayor selectividad, al tiempo que la presencia de grupos atradores de electrones aumenta la reactividad frente a nucleófilos.

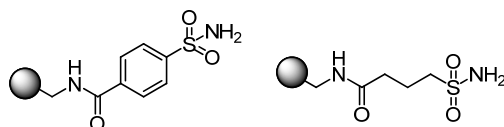


Figura 5. Sulfonamidas de Ellman como elementos de anclaje de liberación controlada.

Estas mejoras han aumentado significativamente la versatilidad del anclaje de seguridad de Kenner y, consecuentemente, se han multiplicado el número de aplicaciones.⁸¹

Backes y Ellman han demostrado que este elemento de anclaje es completamente compatible con los grupos protectores más habituales en síntesis de péptidos (Boc y Fmoc).⁷⁹ Además, Yang y Motiello han demostrado que es posible promover la liberación del soporte mediante un ataque nucleófilo intramolecular, lo que constituye una ruta muy eficaz para la síntesis de péptidos cíclicos.⁸² Ingenito ha demostrado que la reacción de liberación se puede realizar con tioles como nucleófilos, lo que ha facilitado el acceso a tioésteres,⁸³ herramientas fundamentales en la síntesis de proteínas desde el descubrimiento de la ligación química nativa (*native chemical ligation*).^{84,85} Pero su aplicación no se ha limitado a la síntesis de péptidos. Grupos como los de Bertozzi,⁸⁶ Macmillan⁸⁷ o Unverzagt⁸⁸ la han extendido a la síntesis de glicopéptidos y Wong⁸⁹ a la síntesis de oligosacáridos. Se han descrito numerosas aplicaciones de síntesis orientada a la diversidad⁹⁰ y de productos naturales.⁹¹ Los grupos del Waldmann⁹² y Shin⁹³ han ampliado la aplicación del anclaje de Ellman describiendo la elaboración de conjugados marcados con elementos bioactivos y sondas de monitorización para estudiar procesos de reconocimiento biológico que implican carbohidratos.

Existe una amplia variedad de ejemplos que ilustran la eficacia del elemento de anclaje de liberación controlada de Ellman como agente acilante.⁹⁴ La posibilidad de elaborar, mediante técnicas de síntesis en fase sólida, conjugados que, en una etapa posterior, puedan ser transferidos a una molécula en disolución con muy buena

selectividad resulta una aproximación muy atractiva y presenta, además, excelentes oportunidades para la funcionalización de macromoléculas o moléculas polifuncionales.

Con objeto de explorar esta aproximación, nos hemos propuesto en esta Tesis el desarrollo de una metodología para la funcionalización de plataformas multifuncionales basada en la transferencia quimioselectiva de conjugados elaborados en fase sólida, explotando el concepto del elemento de anclaje de liberación controlada. Teniendo en cuenta la utilidad de los glicoconjugados multivalentes para el estudio de las interacciones específicas entre carbohidratos y proteínas, nos hemos fijado como objetivo la síntesis de derivados de β CD funcionalizadas con antenas sacarídicas, una familia de compuestos que ha demostrado un gran potencial como sistemas de transporte específico de fármacos.²⁵ Esto permitiría minimizar los complicados procesos de purificación asociados a la síntesis clásica de glicoconjugados multivalentes y acceder a una amplia gama de estructuras, modificando los elementos de construcción empleados. Además, la liberación controlada del soporte sólido permitiría transferir el conjugado a una molécula que presente una función adicional (sonda de seguimiento, transporte de moléculas, grupos funcionales reactivos, etc...). Como estudio previo, también hemos evaluado la utilidad de esta estrategia para la funcionalización de plataformas de baja valencia más simples.

2.4. Resultados y discusión

Para explorar las posibilidades de esta aproximación se diseñaron una serie de elementos base que permitiesen acceder a la mayor diversidad posible de estructuras glicodendríticas construidas sobre el soporte sólido utilizando elementos compatibles con la reactividad del elemento de anclaje al soporte sólido de Ellman.⁷⁹ Se eligieron unidades de construcción susceptibles de enlazarse entre sí mediante uniones de tipo amida o urea, que pueden generarse mediante reacciones quimioselectivas que funcionan con altos rendimientos y en condiciones compatibles con la multifuncionalidad de los carbohidratos. Así, como elementos de ramificación se emplearon las estructuras de tipo AB₂ y ABC, **2** y **5** respectivamente, que permiten diseños homo- o heteromultivalentes. Como elementos de biorreconocimiento se emplearon glicodendrones trivalentes de configuración α -D-mano- (**6**) y β -D-gluco (**7**). Además de estos, se ha incluido en el juego de elementos de construcción un derivado del ácido *o*-aminobenzoico (Abz, **96**) como ejemplo de sonda fluorescente (Figura 6).

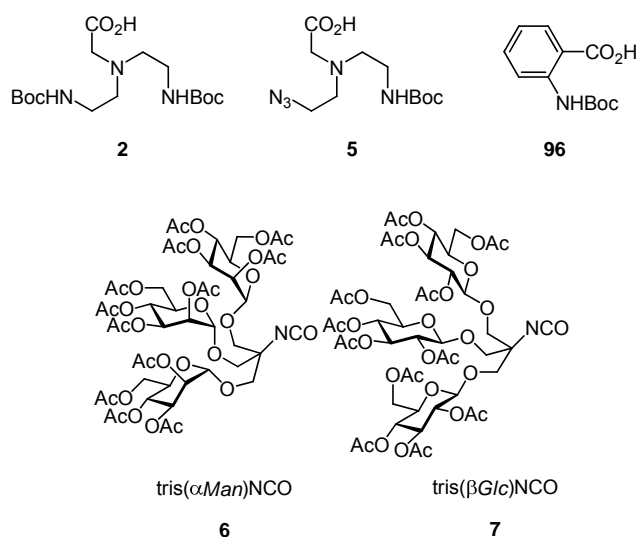
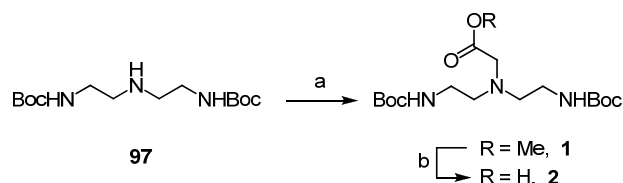


Figura 6. Elementos de construcción para la síntesis de glicoconjugados multivalentes en fase sólida.

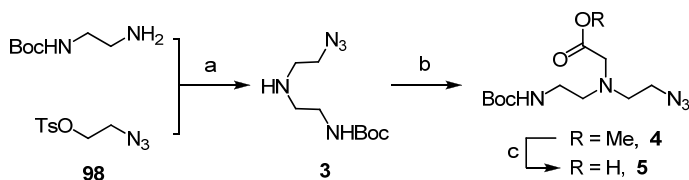
2.4.1. Síntesis de elementos de base

El elemento de ramificación bifuncional **2** se obtuvo por alquilación del grupo amino secundario de la bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]amina (**97**)²⁵ con bromoacetato de metilo y posterior saponificación del éster (**1**) para dar el ácido carboxílico correspondiente (Esquema 5).



Esquema 5. Síntesis del elemento de ramificación bifuncional. Reactivos y condiciones: a) $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$, Et_3N , DMF, 24 h, 85%. b) MeONa , $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1:1), 24 h, 99%.

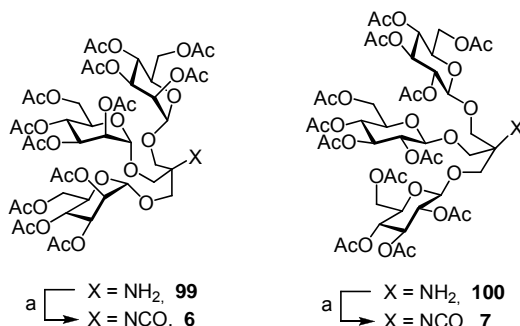
La obtención del elemento de ramificación trifuncional **5** requirió un esquema de síntesis un poco más largo. En primer lugar se llevó a cabo el desplazamiento nucleófilo del grupo tosilo en el *p*-toluensulfonato de 2-azidoetanol (**98**)²⁵ por la 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etilamina para dar **3**. Posteriormente se alquiló el grupo amino secundario con bromoacetato de metilo, obteniéndose el éster metílico **4** que, finalmente, se saponificó para dar el correspondiente ácido carboxílico (Esquema 6).



Esquema 6. Síntesis del elemento de ramificación trifuncional. Reactivos y condiciones: a) K_2CO_3 , MeCN, 80 °C, 24 h, 60%. b) $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$, Et_3N , DMF, 24 h, 80%. c) MeONa , $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1:1), 24 h, 99%.

Finalmente, los tris-glicósidos de configuración α -D-mano (**6**) y β -D-gluco (**7**) se sintetizaron a partir de las correspondientes aminas **99**⁹⁵ y **100**⁹⁶ por reacción con

trifosgeno (BTC, bis(triclorometil)carbonato) a 0 °C en diclorometano seco con buenos rendimientos (Esquema 7).

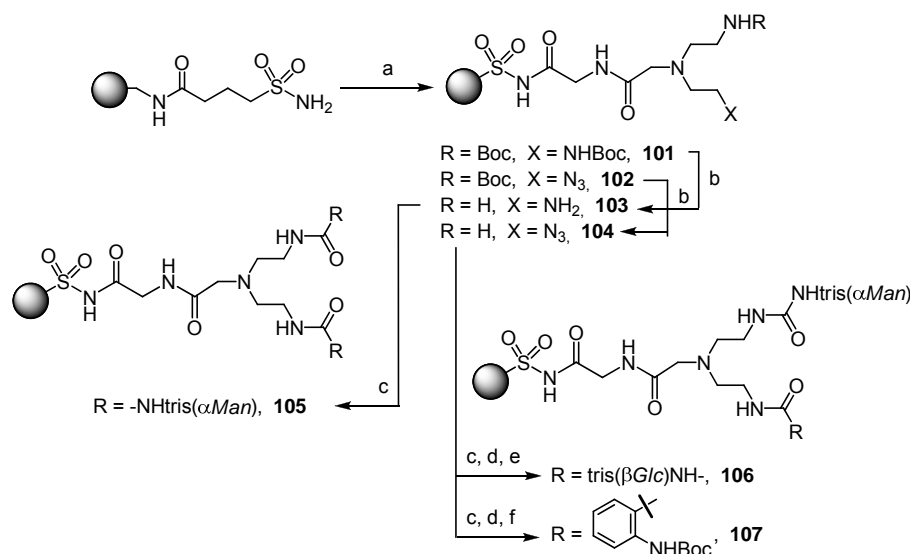


Esquema 7. Síntesis de las antenas sacarídicas. Reactivos y condiciones: a) BTC, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C, 30 min, 70%.

2.4.2. Ensamblaje de elementos de base en el soporte sólido

El esquema sintético desarrollado en fase sólida parte de una resina de poliestireno comercial funcionalizada con el elemento de anclaje de Ellman (ácido 4-sulfamilbutírico). Para asegurar una carga óptima de la resina se instaló, en primer lugar, un segmento de glicina mediante preactivación del aminoácido N-prottegido con Fmoc con diisopropilcarbodiimida (DIC) y 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP). De este modo se asegura una completa acilación de la sulfonamida y se evita la epimerización en el carbono α ⁷⁹ al tiempo que se dispone de un espaciador útil para evitar los efectos estéricos tanto en la unión de los elementos de ramificación como en la liberación del compuesto final con el nucleófilo. A continuación se desprotege el grupo amino de la glicina usando piperidina al 20% en DMF y se acopla el correspondiente elemento de ramificación (**2** o **5**), activado con TBTU, mediante una unión tipo amida, obteniéndose resinas mono- o bifuncionales, respectivamente, con el mismo esqueleto dendrítico. La resina monofuncional (**101**) puede ser utilizada para preparar glicodendrones homomultivalentes mientras que la bifuncional (**102**), con dos grupos funcionales

nitrogenados ortogonalmente protegidos, permite el diseño de dendrímeros heteromultivalentes (Esquema 8).



Esquema 8. Construcción modular de glicoconjugados homo- y heteromultivalentes. Reactivos y condiciones: a) i, FmocGlyOH, DIC, DMAP, CH_2Cl_2 , 3 h; ii, Piperidina-DMF (1:4), 15 min; iii, **2** (\rightarrow **101**) o **5** (\rightarrow **102**), TBTU, DIPEA, CH_2Cl_2 , 3 h. b) TFA- CH_2Cl_2 (1:1), 2 h. c) **6**, Et_3N , CH_2Cl_2 , 18 h. d) 1,3-propanoditiol, SnCl_2 , Et_3N , DMF, 18 h. e) **7**, Et_3N , CH_2Cl_2 , 18 h. f) **96**, TBTU, DIPEA, CH_2Cl_2 , 3 h.

El acoplamiento de las antenas sacarídicas al soporte sólido es una etapa crucial. Para evitar una funcionalización incompleta de la resina es necesaria una reacción que ocurra con buenos rendimientos. Se decidió usar la reacción de formación del grupo urea entre aminas e isocianatos, muy utilizadas en las síntesis de dendrímeros.⁹⁷ Aunque los isocianatos derivados de azúcares son a menudo inestables,⁹⁸ los tris(2-glicosiloximetil)metil derivados **6** y **7**, con la función isocianato sobre un carbono cuaternario, son glicodendrones trivalentes lo suficiente estables como para permitir su manipulación.⁹⁹

La hidrólisis ácida de los grupos carbamato de **101** y el posterior acoplamiento de la amina resultante con el isocianato **6** en diclorometano seco en presencia de Et₃N condujo al conjugado hexamansilado sobre la resina **105** (Esquema 8). La resina bifuncional **104** es una materia de partida particularmente versátil. Recientemente se ha demostrado que sistemas heteromultivalentes relativamente sencillos con una distribución controlada de los ligandos son modelos de regiones heterogéneas del glicocalx que permiten el estudio de los fenómenos de unión a la membrana celular en los que intervienen carbohidratos.²⁸ La unión del isocianato **6** con la resina **104** se llevó a cabo en diclorometano seco con Et₃N. Posteriormente se redujo la azida empleando el sistema SnCl₂-1,3-propanoditiol,¹⁰⁰ reacción cuyo curso se monitorizó mediante espectroscopia de IR sobre las propias partículas de resina. Por último, el acoplamiento de la amina resultante con el trisglucósido **7** en diclorometano anhidro catalizado con Et₃N condujo al dendrón mixto **106** sobre la resina. La resina **104** permite, además, introducir elementos no glucídicos en la construcción, como el ácido *o*-aminobenzóico (**96**) (→ **107**), una sonda fluorescente muy útil (Esquema 8).¹⁰¹

2.4.3. Liberación del soporte y transferencia de glicoconjugados a nucleófilos en disolución

Aunque el objetivo último es la transferencia selectiva de glicoconjugados desde el soporte sólido a plataformas multifuncionales como CDs, se ha comenzado estudiando la liberación de los conjugados multivalentes con nucleófilos más simples. Para ello se seleccionaron una serie de aminas de complejidad estructural creciente (Figura 7): la bencilamina (**108**), la 4-azidobutilamina (**109**), que introduce un grupo funcional adicional que podría ser empleado para modificaciones posteriores, y el metil 6-amino-6-desoxi- α -D-glucopiranosido (**110**), como modelo de derivado de carbohidrato. Una vez optimizado el proceso de liberación/transferencia con estos nucleófilos, la estrategia se ha extendido al derivado de β CD con un grupo amino en el carbono 6 (**111**).

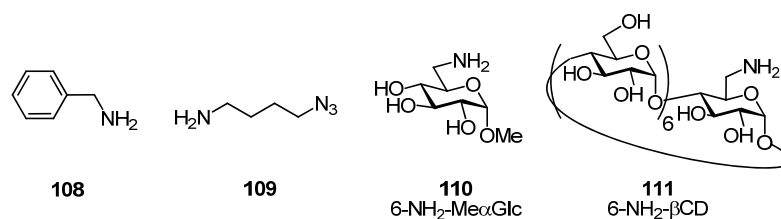
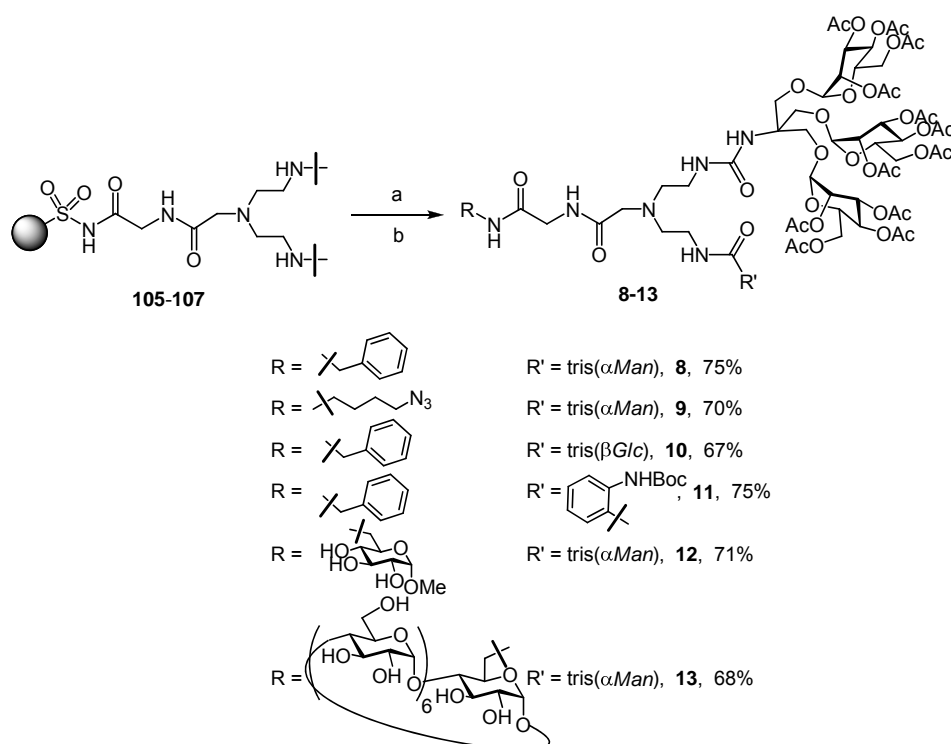


Figura 7. Nucleófilos utilizados en la liberación de los glicoconjugados multivalentes de la resina.



Esquema 9. Liberación nucleófila de los glicoconjugados homo- y heteromultivalentes. Reactivos y condiciones: a) I-CH₂CN, DIPEA, DMF, 18 h. b) **108-111**, DIPEA, DMF, 18 h.

El grupo N-acilsulfonamida presenta un protón relativamente ácido ($pK_a \sim 2.5$), lo que permite que el átomo de nitrógeno sea fácilmente alquilable en condiciones suaves compatibles con casi cualquier otra funcionalidad. La N-acil-N-alquilsulfonamida que se genera es extraordinariamente sensible al ataque por nucleófilos. Cuando la alquilación se

lleva a cabo con grupos atractores de electrones es posible usar aminas como nucleófilos para generar la correspondiente amida en condiciones suaves. En nuestro caso, el grupo funcional N-acilsulfonamida se alquiló selectivamente usando yodoacetoniitrilo en DMF.⁷⁹ Utilizando un exceso de tres equivalentes de bencilamina (**108**) como modelo de nucleófilo, obtuvimos una liberación limpia de los glicodendrones del soporte sólido, con la formación simultánea del conjugado de bencilamina **8** (Esquema 9) (Tabla 1, entrada 1). Es interesante el hecho de que el rendimiento de la liberación prácticamente no se ve afectado cuando utilizamos un ligero defecto de amina (Tabla 1, entrada 2), facilitando la purificación y ampliando el rango de posibles nucleófilos a estructuras más elaboradas. De esta forma, cuando utilizamos la 4-azidobutilamina (**109**), el correspondiente glicodendrón funcionalizado (**9**) se obtiene con un rendimiento similar (Tabla 1, entrada 3) (Esquema 9). Resultados comparables se obtuvieron en la liberación de las resinas bifuncionales **106** y **107** con bencilamina para dar **10** y **11** respectivamente (Tabla 1, entradas 4 y 5).

Tabla 1. Liberación controlada de glicoconjugados multivalentes
(^aestimado sobre la carga inicial de la resina).

Entrada	Resina	NuH (eq.)	Producto	Rendimiento (%) ^a
1	105	108 (3.0)	8	77
2	105	108 (0.9)	8	75
3	105	109 (0.9)	9	70
4	106	108 (0.9)	10	67
5	107	108 (0.9)	11	75
6	105	110 (0.9)	12	71
7	105	111 (0.9)	13	68

Al utilizar un pequeño defecto de nucleófilo, éste se consume completamente. De esta forma, el conjugado liberado **8**, se obtiene con una alta pureza tan solo filtrando la resina y evaporando el disolvente. Su homogeneidad se confirmó mediante EM-ESI y RMN (Figura 8). No obstante, de manera generalizada, se llevó a cabo una purificación

por cromatografía de permeación sobre gel (Sephadex LH-20) antes de la caracterización completa de los conjugados liberados.

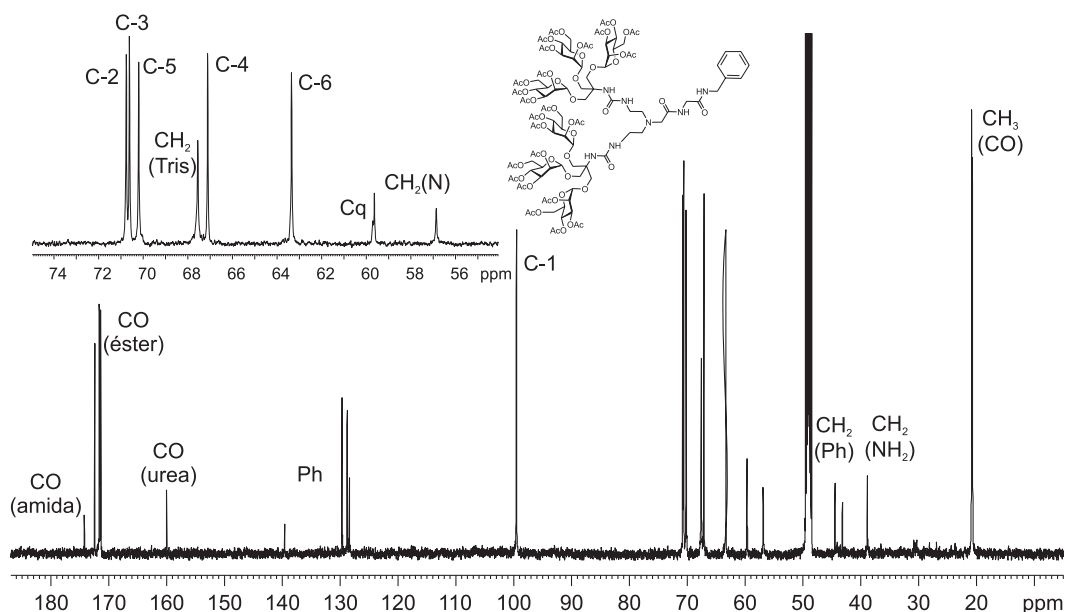


Figura 8. Espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125.7 MHz, 313 K) de **8**.

Una ventaja adicional del conector seleccionado es la ausencia de reactividad frente a hidroxilos primarios y secundarios, incluso cuando éstos se presentan en un gran exceso. Así, utilizando el metil 6-amino-6-desoxi- α -D-glucopiranosido (**110**) como nucleófilo, se obtuvo el conjugado **12** con total quimioselectividad (Tabla 1, entrada 6).

El gran potencial de esta metodología para la síntesis de estructuras multivalentes más complejas se demostró mediante la preparación del glicodendrímico conjugado a una unidad de β CD. La liberación quimioselectiva del hexamanósido soportado en la resina **105** por la monoamina de la β CD (**111**) condujo a **13** con un excelente rendimiento y pureza (Tabla 1, entrada 7). La hidrólisis de los grupos protectores acetato en medio básico condujo al derivado de β CD **14** completamente desprotegido. Es interesante destacar que, en comparación con la síntesis en fase homogénea, la síntesis asistida por

fase sólida presenta ventajas evidentes en cuanto a rapidez y eficacia, pasándose de un rendimiento global del 28% en una síntesis laboriosa de unas dos semanas²⁵ a un rendimiento global del 68% en tres días. El compuesto **14** presentó una elevada afinidad por la lectina específica de manosa Concanavalina A (Con A) y capacidad de inclusión de moléculas orgánicas hidrófobas, entre las que se encuentran principios activos como el anticanceroso docetaxel (Taxotero[®]), análogas a las descritas anteriormente para estructuras similares.²⁵

La afinidad del compuesto **14** por la Con A se evaluó siguiendo el protocolo ELLA (Enzyme-Linked Lectin Assay).¹⁰² Este ensayo determina la capacidad de un ligando en disolución (**14**) para inhibir la asociación del receptor (Con A) a un ligando de referencia (manano de levadura) inmovilizado en la placa de valoración. Los resultados indicaron que la afinidad de **14** frente a Con A aumenta unas 100 veces con respecto a la determinada para el metil α -D-manopiranosido, un ligando de referencia monovalente.

Para determinar la capacidad de inclusión del docetaxel en **14** se preparó una disolución de docetaxel en acetona y se adicionaron alícuotas de esta disolución a otra disolución del conjugado **14** en agua. La mezcla se calentó a 50 °C en un matraz sellado durante toda la noche, manteniéndose a 25 °C durante otras 24 h. Después se evaporó la acetona con una corriente de N₂ y la capacidad de solubilización del fármaco se estimó filtrando el precipitado insoluble tras la evaporación de la acetona y la liofilización de la disolución acuosa, observándose un aumento de cerca de tres órdenes de magnitud en la solubilidad del docetaxel en agua (de 4 mg/L hasta ~3 g/L) en una disolución 50 mM de **14**.

2.4.4. Liberación del soporte y transferencia sobre plataformas multivalentes

Los resultados descritos anteriormente demuestran la versatilidad del concepto del anclaje de liberación controlada para la funcionalización selectiva de moléculas complejas como ciclodextrinas con antenas bioactivas, evitando los inconvenientes asociados a metodologías de síntesis en disolución. Además, la eficacia sintética sugiere

que el espectro de aplicación de este concepto podría ampliarse a la funcionalización de plataformas con múltiples centros reactivos, como núcleos dendríticos o plataformas multivalentes.

Como se ha comentado anteriormente, el control de la arquitectura macromolecular es un factor determinante en el diseño racional de moléculas con actividad biomédica. En este contexto, las propiedades peculiares de los dendrímeros tales como uniformidad, monodispersidad y multivalencia, han atraído la atención de los investigadores.⁴⁸ Sin embargo, la funcionalización homogénea de estas plataformas mediante aproximaciones clásicas se vuelve exponencialmente más complicada a medida que crece la estructura. Una alternativa para sortear este inconveniente podría ser el uso del concepto del anclaje de liberación controlada para transferencia selectiva desde un soporte sólido sobre el núcleo dendrítico.

Para realizar una evaluación preliminar de esta posibilidad se ha seleccionado un modelo de conjugado dendrítico y se ha estudiado su transferencia sobre dos plataformas simples con dos o tres centros reactivos, la 1,2-etilendiamina (**EDA**) y la tris(2-aminoetil)amina (**TREN**), respectivamente (Figura 9).

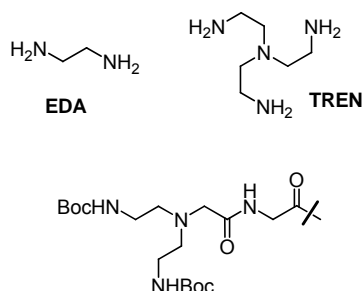
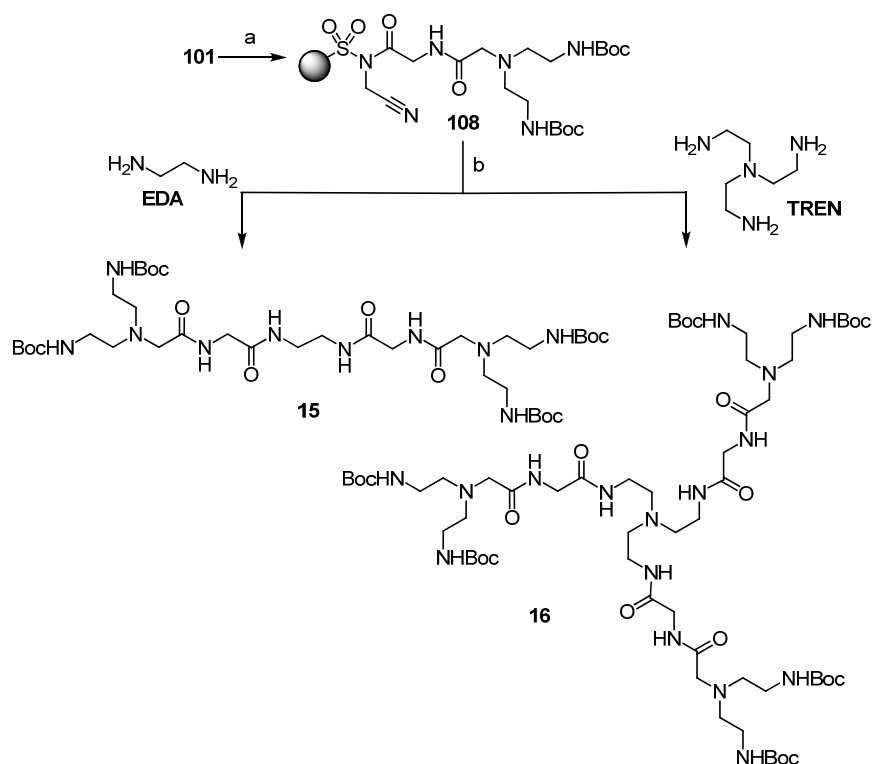
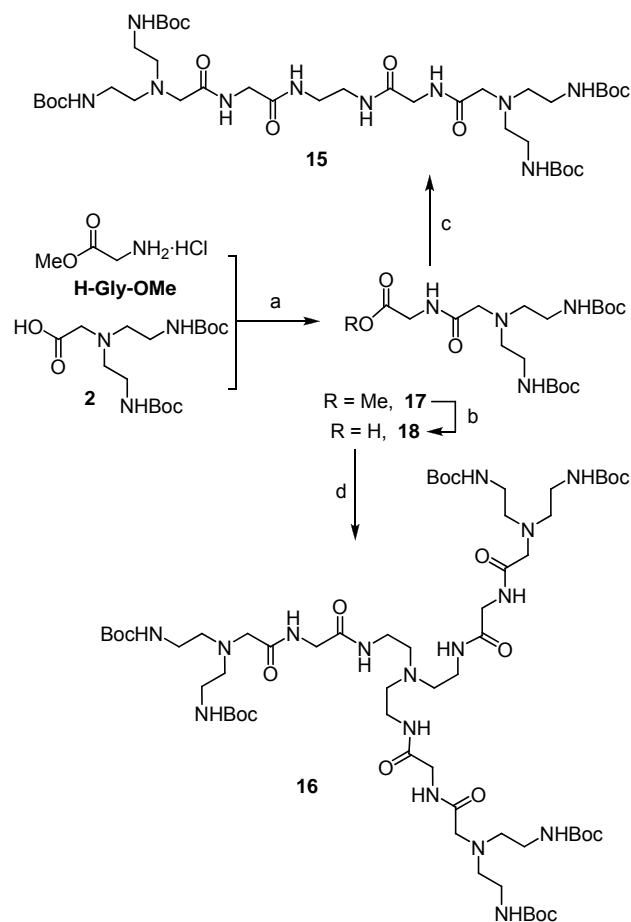


Figura 9. Estructuras del modelo de conjugado dendrítico y plataformas di- y trivalentes.



Esquema 10. Liberación por nucleófilos multivalentes EDA y TREN. Reactivos y condiciones: a) $\text{I-CH}_2\text{CN}$, DIPEA, DMF, 18 h. b) EDA (\rightarrow **15**) o TREN (\rightarrow **16**), DIPEA, DMF, 18 h.

Para la elaboración del conjugado soportado se ha seguido la misma estrategia descrita anteriormente para **101** (sección 2.4.2). La alquilación de la acilsulfonamida se llevó a cabo mediante tratamiento de **101** con un exceso de yodoacetoniitrilo en presencia de DIPEA en DMF (Esquema 10). Con fines comparativos, se ha llevado a cabo la preparación de **15** y **16** mediante síntesis en disolución a partir de los sintones descritos anteriormente (Esquema 11).



Esquema 11. Síntesis de los dendrímeros basados en EDA y TREN. Reactivos y condiciones: a) TBTU, Et₃N, 24 h, 99%. b) NaOH, THF-H₂O (1:2), 5 h, 99%. c) **EDA**, TBTU, DIPEA, 24 h, 62%. d) **TREN**, TBTU, DIPEA, 24 h, 42%.

El acoplamiento peptídico de la glicina metil éster (**H-Gly-OMe**) con **2**, promovido por TBTU, (\rightarrow **17**) seguido de saponificación del metiléster condujo a **18** con buenos rendimientos. Posteriormente, el acoplamiento a **EDA** y **TREN** se llevó a cabo también en presencia de TBTU y medio básico (DIPEA), conduciendo a los dendrímeros **15** y **16**, respectivamente.

Con el fin de determinar las condiciones óptimas de transferencia se han diseñado una serie de experimentos de liberación cuya monitorización se ha realizado cualitativamente mediante cromatografía de capa fina, en comparación con los patrones sintetizados en disolución, y espectrometría de masas.

En una primera aproximación, se aplicaron las condiciones optimizadas para la transferencia de glicoconjugados a moléculas monofuncionales. Así, la resina **101** se alquiló con yodoacetnitrilo y posteriormente se suspendió en una disolución de **EDA** (0.9 eq.) en presencia de DIPEA en DMF a t.a. durante 24 h. El análisis de la suspensión mediante cromatografía en capa fina indicó la formación de un producto principal con la misma movilidad cronológica que el patrón preparado en disolución. Sin embargo, la espectrometría de masas permitió detectar, además de **15**, la presencia de una proporción apreciable del producto correspondiente a la transferencia de una unidad sobre **EDA** (m/z 461.3 $[M + H]^+$, Figura 10A). Tiempos de reacción más prolongados o temperaturas más altas (40 °C) no mejoraron el perfil del espectro de masas. Hay que destacar que la proporción relativa de productos no es directamente proporcional a la intensidad relativa de las señales del espectro de masas, ya que estas dependen en buena medida de la facilidad con que se ionice cada uno de los productos. En el modo de monitorización de cationes, la ionización de especies con grupos aminos está favorecida por su facilidad para protonarse, de manera que la detección cualitativa de los productos intermedios de la reacción se puede realizar hasta niveles que otras técnicas no podrían.

Cuando el experimento se repitió empleando solo 0.4 eq. de **EDA**, tanto a t.a. como a 40 °C, el único producto observado en espectrometría de masas es **15** (Figura 10B). La presencia del intermedio es prácticamente indetectable en ambos casos.

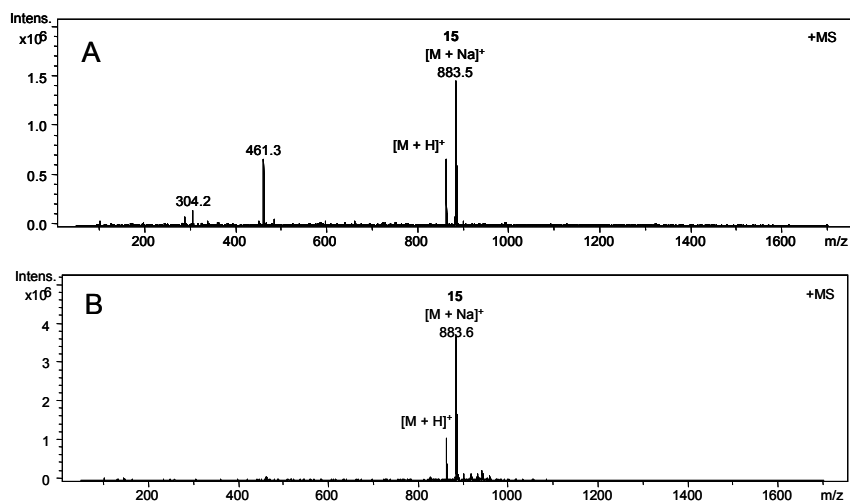


Figura 10. Espectros de masas de la liberación de **101** con 0.9 eq. (A) y 0.4 eq. (B) de EDA.

La presencia de productos de transferencia parcial es aún más evidente cuando este mismo experimento se realiza con **TREN** (\rightarrow **16**). En el caso del ensayo con 0.9 eq., el aducto difuncionalizado es predominante (Figura 11A). Incluso registrando el espectro en el modo negativo, en el que la ionización de los productos de transferencia parcial no está tan favorecida, el producto difuncionalizado sigue siendo mayoritario (m/z 981.5 [M + Cl]⁻, Figura 11B). En los experimentos de transferencia empleando **TREN** no se obtuvo, en ningún caso, una funcionalización completa y homogénea (Figura 11).

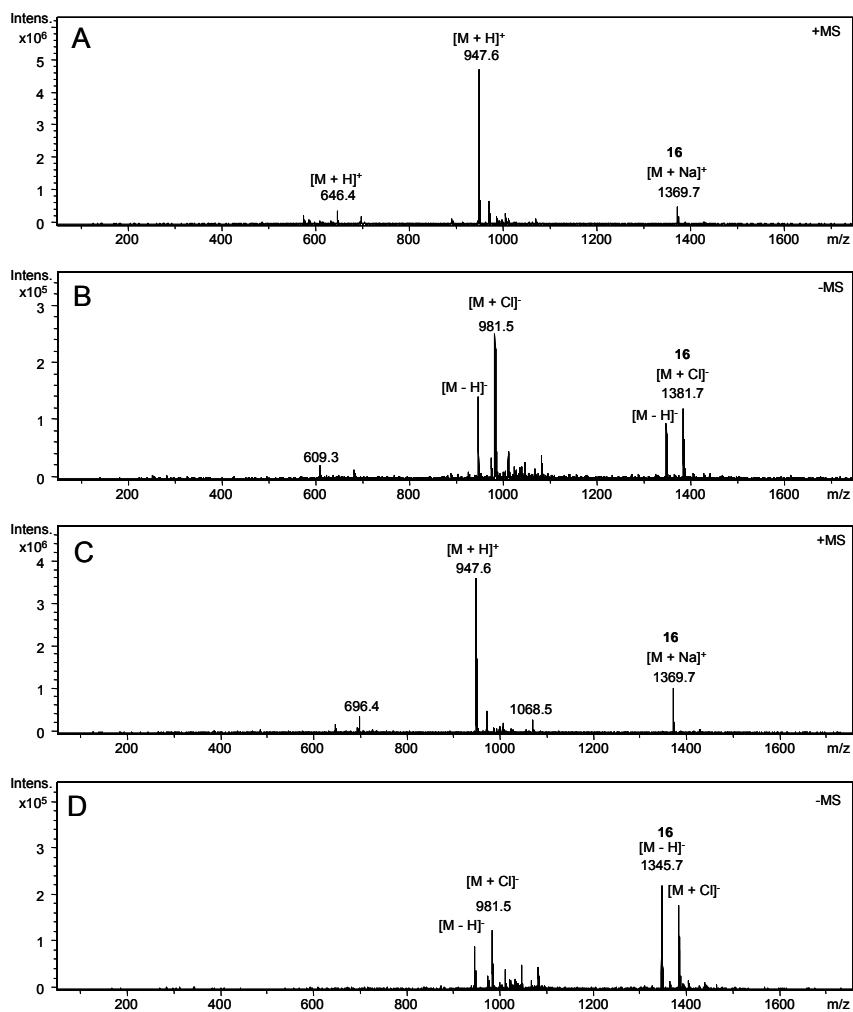
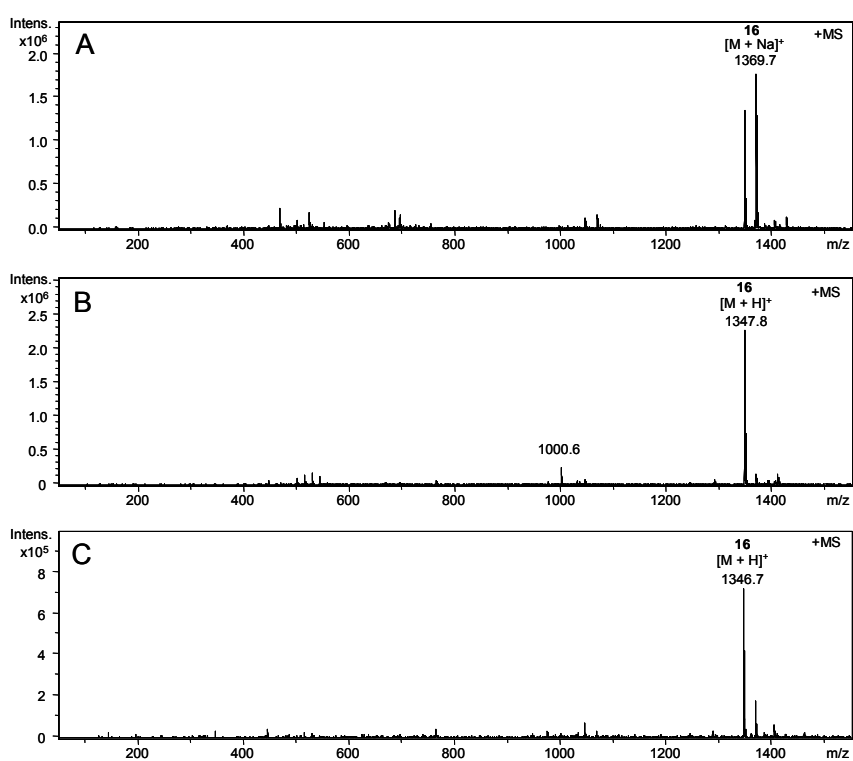


Figura 11. Espectros de masas de la liberación de **101** con 0.9 eq. (A, modo positivo; B modo negativo) y 0.5 eq. (C, modo positivo; D, modo negativo) de **TREN**.

Estos resultados parecen indicar que la velocidad de la reacción disminuye significativamente a medida que el tamaño de los productos aumenta, lo cual es más evidente en el caso de los ensayos con **TREN**. En principio sería posible compensar este efecto sometiendo al aceptor a un exceso permanente del conjugado soportado. Esta hipótesis se ha confirmado monitorizando el curso de un experimento en el que se ha ido

añadiendo lentamente la poliamina sobre la resina activada. Después de 24 h del inicio de la reacción se comprobó que la cantidad inicial de **TREN** (0.25 eq.) se había consumido completamente para formar el dendrímero **16** (Figura 12A) momento en el que se realizó la siguiente adición. El segundo (hasta 0.45 eq.) y tercer ciclo (hasta 0.55 eq.) también resultan exitosos (Figuras 12B y C) ya que la presencia de aductos de funcionalización parcial es imperceptible. Llegar a este punto ya supone un progreso importante respecto a los ensayos de adición directa anteriormente comentados, sin embargo, con este procedimiento es posible llegar algo más lejos. Empleando 0.6 eq., tras 24 h aún es posible detectar la señal para el aducto difuncionalizado (Figura 12D), pero tras otras 48 h de reacción se logra completar la reacción. El resultado no se modificó empleando más cantidad de **TREN**.



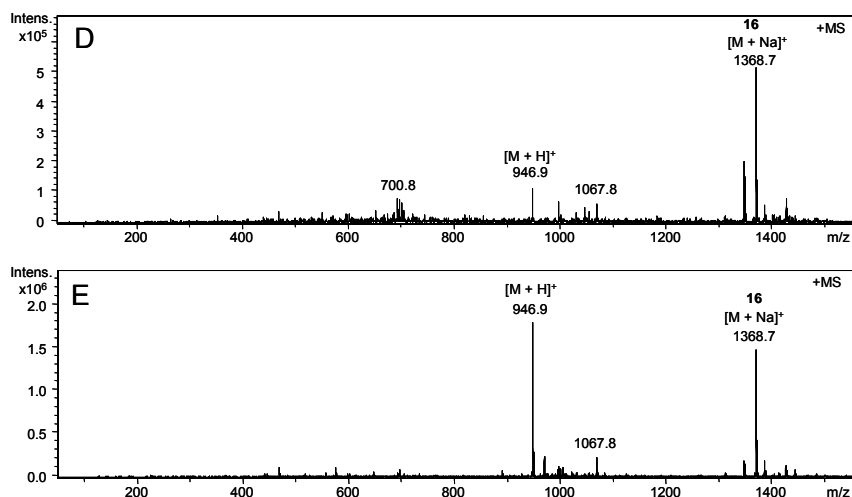


Figura 12. Espectros de masas de la liberación de **101** con adiciones sucesivas de **TREN** (A, 0.25 eq.; B, 0.45 eq.; C, 0.55 eq.; D, 0.6 eq.; E, 0.65 eq.).

En resumen, en este capítulo se ha puesto de manifiesto la versatilidad del anclaje de liberación controlada de Ellman basado en N-acilsulfonamidas para la funcionalización selectiva de plataformas multifuncionales. Por un lado, se ha desarrollado una metodología para la síntesis asistida en fase sólida de glicoestructuras multivalentes. La metodología permite la síntesis rápida y flexible de homo- y heteroligandos multivalentes y su conjugación quimioselectiva a una molécula aceptora con funcionalidades adicionales. Por otro, se ha realizado una evaluación de la metodología para la funcionalización homogénea de plataformas multivalentes. En ambos casos, el esquema sintético se puede ver significativamente acelerado, al mismo tiempo que las purificaciones por cromatografía se hacen prácticamente innecesarias (dos de los mayores problemas que presenta la síntesis clásica de conjugados multivalentes).

3. DISEÑO DE ANTITOXINAS DEL ÁNTRAX

3. Diseño de ciclodextrinas policatiónicas como antitoxinas del ántrax

3.1. El ántrax

El ántrax es una enfermedad causada por el *Bacillus anthracis*, una bacteria Gram-positiva de forma cilíndrica capaz de formar esporas típicamente asociada al ganado vacuno y lanar, para el que resulta letal (Figura 13).^{46,103} Sus esporas son extremadamente resistentes, pudiendo sobrevivir en la tierra durante más de 100 años. En condiciones normales, su incidencia en humanos es rara. Solo ocurre en individuos en contacto directo con animales de granja contaminados o sus productos (cuero, lana, etc...). La enfermedad puede manifestarse de tres formas dependiendo de la vía de infección.¹⁰⁴ Por un lado, en la infección por vía cutánea (que ocasiona el ántrax cutáneo, también conocido como carbunco), causada por esporas que infectan heridas o erosiones en la piel, la bacteria rara vez se propaga por el organismo y la infección, por regla general, se resuelve sin mayores complicaciones. La infección gastrointestinal, que resulta de la ingestión de las esporas, es poco frecuente pero, normalmente, letal. Y la infección por vía respiratoria, que es la forma más peligrosa, causada por la inhalación de esporas suspendidas en el aire que son capaces de alcanzar los alvéolos pulmonares, donde germinan y desde los cuales se pueden propagar a través del torrente sanguíneo por todo el organismo.¹⁰⁵



Figura 13. Micrografía del *Bacillus Anthracis* (izquierda) y de sus esporas (derecha).

El *Bacillus anthracis* debe su virulencia a dos factores: su cápsula antifagocítica¹⁰⁶ y su toxina.¹⁰⁷ Durante una infección sistémica, como la que ocurre por vía respiratoria, el *Bacillus anthracis* se puede replicar hasta niveles altísimos en el torrente sanguíneo. En este punto de la infección, aunque una terapia agresiva basada en la administración de antibióticos puede evitar el crecimiento bacteriano, el nivel de toxina acumulada en el organismo suele ser letal.¹⁰⁸ La alta mortalidad de esta forma de infección, que roza el 100%, ha resultado un atractivo reclamo para aquellos que buscan nuevas armas bacteriológicas. Para este fin, incluso se han desarrollado cepas bacterianas resistentes a los tratamientos antibióticos.¹⁰⁹

Las vacunas desarrolladas para prevenir la infección por *Bacillus anthracis*, algunas hace cerca de 40 años, no reúnen los requisitos impuestos por la medicina moderna:¹¹⁰ requieren revacunación periódica, están asociadas a efectos secundarios que no están completamente caracterizados y, evidentemente, no resultarían eficaces para el tratamiento de individuos infectados. El desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento del ántrax es, por tanto, una prioridad para contrarrestar la amenaza de una posible guerra bacteriológica.

Recientes estudios han puesto de manifiesto que el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas debe centrarse, más que en la obtención de agentes terapéuticos que ataquen la viabilidad del agente infeccioso (antibióticos convencionales), en bloquear las funciones esenciales para su infección (toxinas o factores virulentos).¹¹¹ Esta observación es especialmente acertada en el caso del ántrax que, adicionalmente, puede considerarse como un modelo paradigmático para el diseño de antitoxinas desde un punto de vista académico. El diseño racional de antitoxinas contra el ántrax, pasa por conocer en detalle la estructura de su toxina y entender en profundidad el mecanismo por el cual se internaliza y actúa en la célula.

3.2. La toxina del ántrax: estructura y modo de acción

La toxina del ántrax, descubierta a mediados del siglo XX, está constituida por tres proteínas: un factor letal (FL), un factor de edema (FE)¹¹² y un antígeno protector (AP). Ninguna de las tres tiene propiedades tóxicas individualmente, sin embargo, la combinación de cualquiera de las dos primeras con AP sí. Así, la combinación de FL con AP puede causar la muerte en animales de laboratorio y la de FE con AP origina edemas en la zona de inyección. Estas características sugieren que la toxina del ántrax es una toxina tipo AB, en la cual FL y FE son las unidades con acción enzimática (unidades A) y AP es un dispositivo que facilita su acceso al citoplasma (unidad B). FE y FL guardan en común su afinidad por el AP, pero poseen distinta actividad enzimática. El factor de edema (FE) es una adenilato ciclasa dependiente de calcio y calmodulina¹¹³ (CaM) cuya acción conduce a un aumento de la concentración intracelular de adenosin monofosfato cíclico (cAMP), un modo de acción bastante extendido entre las bacterias,¹¹⁴ ya que la acumulación en macrófagos de cAMP (asociado a un alto consumo de ATP) inhibe la fagocitosis de bacterias.¹¹⁵

El factor letal (FL), por su parte, es una metalo-proteasa de 90 kD dependiente de zinc capaz de hidrolizar con una selectividad absoluta el extremo N-terminal del dominio de reconocimiento las quinasas de proteína quinasa activadas por mitógeno (MAPKKs).¹¹⁶ Las MAPKKs juegan un papel fundamental en el mecanismo de defensa frente a antígenos. Su hidrólisis impide el correcto reconocimiento de sus substratos y bloquea la cascada de señales biológicas que activan los mecanismos tanto de respuesta inmune innata como adaptativa. La acción del FL conduce a hipoxia, consumo anómalo de ATP, aumento de la permeabilidad a iones en distintos tejidos¹¹⁷ (en macrófagos incluso induce la lisis celular)¹¹⁸ y, en última instancia, a la muerte del anfitrión.

El antígeno protector (AP), denominado así por facilitar la acción de FL y FE, es el vehículo que emplean dichos factores para acceder al citosol. Ésta es una función compleja que hace que su estructura varíe significativamente en las diferentes etapas de la

infección. El proceso por el cual los factores tóxicos (FE y FL) entran en la célula está relativamente bien caracterizado en la actualidad (Figura 14).¹¹⁹

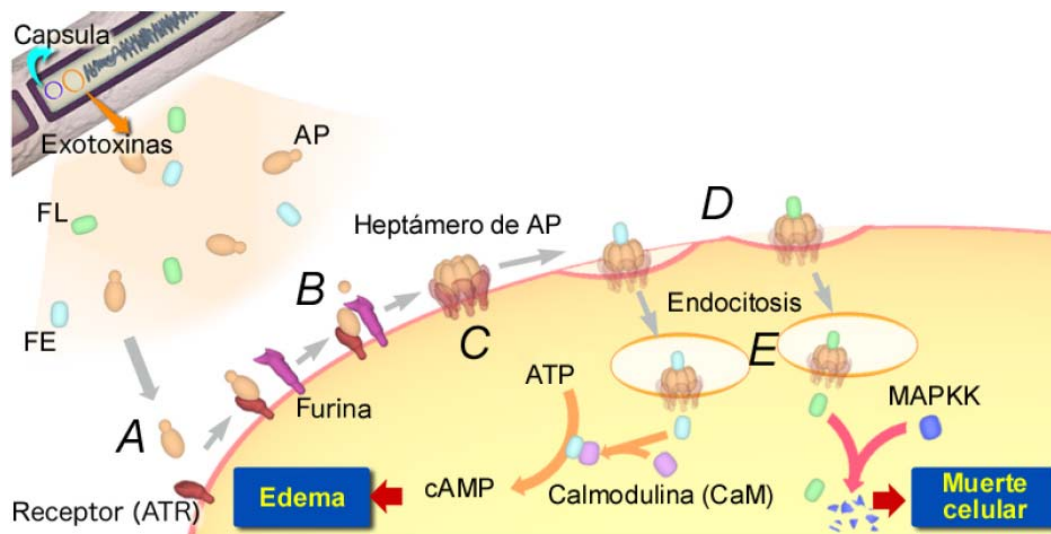


Figura 14. Representación esquemática del mecanismo de acción de la toxina del ántrax.

La acción comienza cuando el AP, excretado por la bacteria en su forma íntegra (AP_{83}),¹²⁰ es reconocido por ciertos receptores específicos de la membrana celular (A en Figura 14). Hay estudios en la bibliografía que demuestran que algunos de estos receptores¹²¹ están presentes de forma generalizada en la mayoría de las células eucariotas y, eventualmente, con altos niveles de expresión.¹²² AP_{83} no es funcional por sí mismo y necesita ser proteolíticamente activado (B en Figura 14). Una vez unido al receptor, AP_{83} es hidrolizado por una proteasa (furina) produciendo dos fragmentos: AP_{20} y AP_{63} . El primero de ellos se disocia mientras que el segundo, que constituye la forma activa el antígeno protector, permanece asociado a su receptor celular. El AP_{63} oligomeriza espontáneamente para formar un complejo de simetría heptamérica (C en Figura 14).¹²³

Una vez formada la estructura heptamérica se despliega uno de sus dominios para insertarse en la membrana en un proceso dependiente del pH. Dicho proceso ocurre en los endosomas ya que en ellos se crea un entorno ligeramente ácido ($pH \sim 6$) que desencadena el cambio conformacional. Esto permite a las siete unidades crear una

estructura de barril- β de 14 cadenas peptídicas que atraviesa la membrana del endosoma (Figura 15b).¹²⁴ Los factores FL y FE se pueden asociar competitivamente al pre-poro, formando complejos que incorporan hasta tres moléculas de FL o FE indistintamente (*D* en Figura 14).¹²⁵

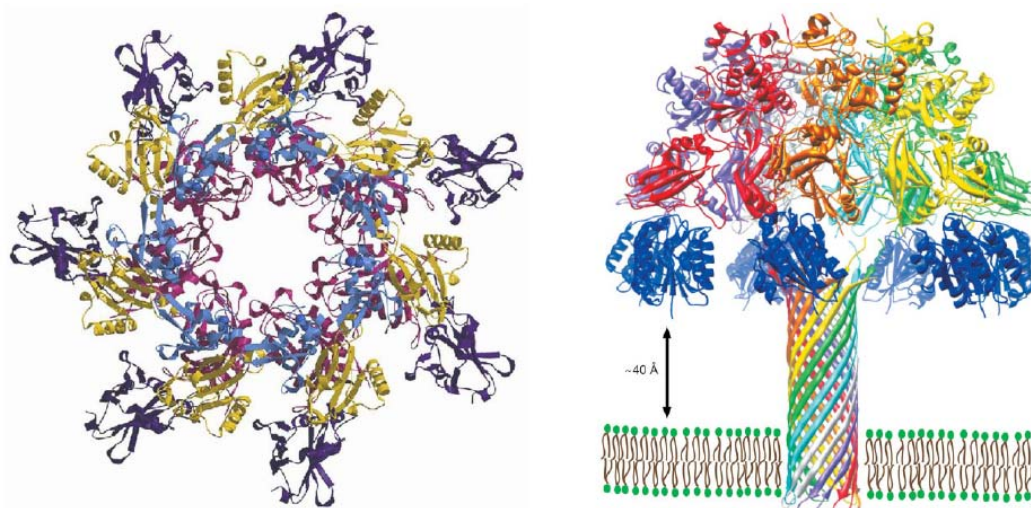


Figura 15. Estructura heptamérica formada por AP₆₃ ([AP₆₃]₇): A, vista axial; B, vista lateral del conjunto desplegado a través de la membrana.

La oligomerización de AP₆₃ y su interacción con los factores tóxicos promueven la endocitosis del complejo, que sufre el cambio conformacional al disminuir el pH en el endosoma y lo convierte en un canal de conducción iónica que atraviesa la membrana del mismo (*E* en Figura 14).¹²⁶ La translocación de FE y FL, a través de este canal, hacia el citosol está ligada a dicho cambio conformacional; sin embargo el mecanismo a través del cual esto sucede no está claro.¹²⁷ Una vez en el citosol, FE cataliza la conversión de ATP en cAMP y FL actúa proteolíticamente sobre MAPKKs. Aunque este mecanismo se ha observado en distintos tipos de células, en el caso de macrófagos y fagocitos resulta especialmente eficaz.

3.2.1. Estrategias frente a la toxina del ántrax

La evolución de cepas resistentes frente a la práctica totalidad de los antibióticos descritos, junto a las peculiaridades anteriormente comentadas del modo de acción del *Bacillus anthracis* y su toxina, han orientado la estrategia a seguir para combatir el ántrax hacia el diseño de antitoxinas. El conocimiento de su complejo mecanismo de acción ha permitido identificar una serie de etapas cuyo bloqueo podría conducir a la detención del proceso infeccioso.¹²⁸ Estas son, por el orden en que acontecen, la etapa de reconocimiento del AP (AP_{83}) por los receptores celulares (*A* en Figura 16), la activación proteolítica del AP ($AP_{83} \rightarrow AP_{63}$) (*B* en Figura 16), el acoplamiento de los factores tóxicos (FE y FL) al pre-poro (*C* en Figura 16), la etapa de translocación de estos hacia el citosol (*D* en Figura 16) y su acción enzimática independiente (*E* en Figura 16).

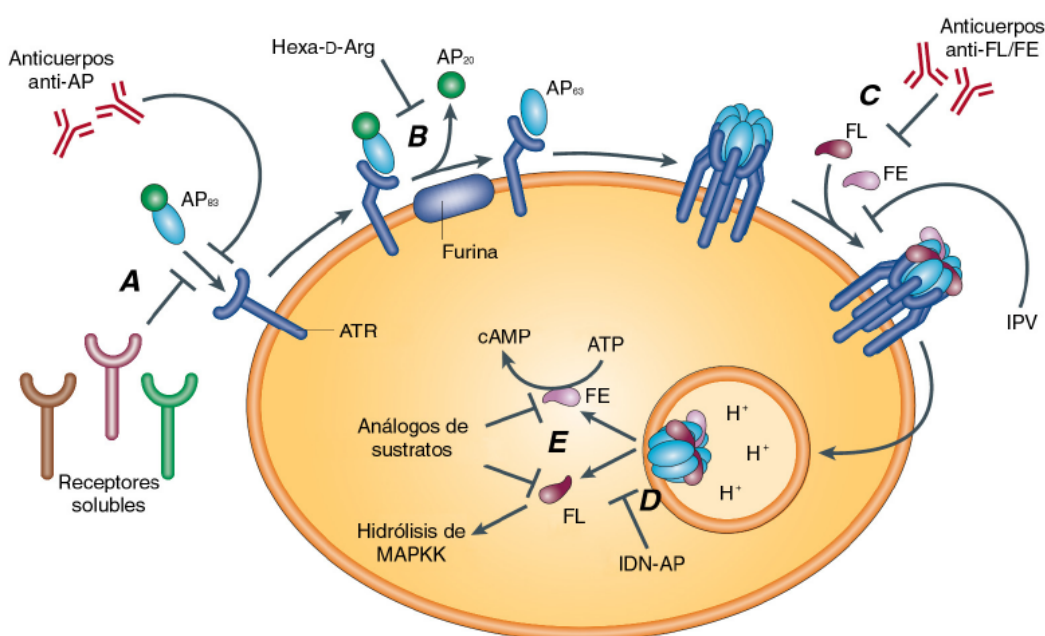


Figura 16. Representación esquemática del mecanismo de infección de la toxina del ántrax y las etapas en las que se puede interferir mediante el uso de antitoxinas.

Tabla 2. Tipos de antitoxinas actualmente en desarrollo (n.d. no determinado).

Antitoxina	Modo de acción (etapa bloqueada)	K_i	Estado de desarrollo	Ref .
Anticuerpos anti-AP	Interacción AP-receptor	100 pM	Ensayos en animales	129
Receptores solubles	Interacción AP-receptor	n.d.	Estudios en cultivos	121
Hexa-D-arginina	Procesado de AP	n.d.	Ensayos en animales	130
Inhibidor polivalente (IPV)	Interacción AP-LF/FE	n.d.	Ensayos en animales	131
Anticuerpos anti-FL	Neutralización de FL	n.d.	Ensayos en animales	132
Mutante dominante negativo del AP	Translocación de FL/FE	n.d.	Ensayos en animales	133
MKARRKKVYP-hidroxiato	Análogo de sustrato de FL	1.1 μ M	Estudios in vitro	136
NSC 12155	Inhibidor de FL	500 nM	Estudios en cultivos	137
DS-998	Inhibidor de FL	1.1 μ M	Estudios en cultivos	138
EGCG	Inhibidor de FL	n.d.	Ensayos en animales	139
GM6001	Inhibidor de FL	2.1 μ M	Estudios en cultivos	136
119804	Inhibidor de FE	20 μ M	Estudios en cultivos	140
Adefovir	Inhibidor de FE	27 nM	Estudios en cultivos	141
IFL	Inhibidor de FL	n.d.	Ensayos en animales	142

Para cada uno de estos procesos clave se vienen desarrollando distintos tipos de antitoxinas (Tabla 2). La etapa de reconocimiento de AP₈₃ por los receptores de la superficie celular se ha logrado bloquear mediante la administración de versiones solubles de los receptores celulares implicados.¹²¹ Anticuerpos desarrollados contra el AP pueden proteger de la infección *in vivo* y, de hecho, esta estrategia constituye la base de la única vacuna licenciada contra el ántrax en la actualidad (*Anthrax Vaccine Adsorbed*, AVA).¹²⁹

Oligopéptidos ricos en arginina (Arg) han mostrado ser inhibidores eficaces de la furin-proteasa implicada en el procesado y activación de AP y, en particular, la hexa-D-Arg es capaz de retrasar la aparición de efectos tóxicos en ratas.¹³⁰ El descubrimiento de péptidos que interfieren en el ensamblaje de los factores tóxicos al AP y su instalación sobre una estructura polimérica ha permitido desarrollar una serie de inhibidores

polivalentes (IPV) capaces de proteger del efecto letal de la toxina en roedores (ver Figura 20 más adelante).¹³¹ Asimismo, anticuerpos específicos contra FL y FE han demostrado su utilidad para interferir en el reconocimiento y ensamblaje de los componentes de la toxina y, de hecho, han resultado eficaces para proteger a roedores de efectos letales.¹³²

El mecanismo de infección del ántrax también se ha podido bloquear mediante la administración de mutantes dominantes negativos de AP (*dominant-negative mutants*), en los que la alteración de uno o varios amino ácidos provocan la incapacidad del AP para promover los cambios conformacionales adecuados que son necesarios para conseguir la plena funcionalidad de la toxina.¹³³ La efectividad de este método se puede determinar mediante la medida de la conductividad a través del canal debida a pequeñas moléculas que pueden atravesarlo o no en función de su conformación (abierta o cerrada).¹³⁴

Finalmente, el desarrollo clásico de inhibidores de la acción enzimática de FL y FE ha proporcionado diferentes medios para bloquear la toxina.¹³⁵ En base a la estructura del sustrato de FL se han descrito varios inhibidores que conservan secuencias peptídicas comunes a diversas MAPKKs.¹³⁶ Asimismo, las técnicas de alto rendimiento para la síntesis y evaluación biológica de quimiotecas han permitido identificar una diversidad de moléculas pequeñas que anulan la actividad de FL^{137,138,139} o FE^{140,141} en ensayos *in vitro*, eventualmente con una gran eficacia (Figura 17).¹⁴²

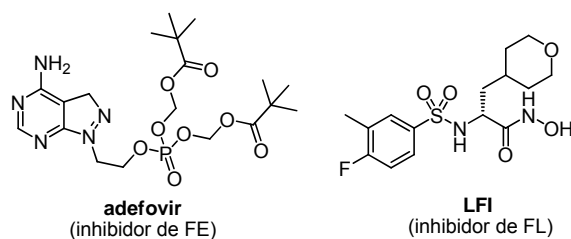


Figura 17. Estructura de algunos de los inhibidores más eficaces de los factores de toxicidad del ántrax.

3.2.2. La toxina del ántrax como modelo en el diseño de agentes terapéuticos polivalentes

El caso de la toxina del ántrax no es anecdótico, precisamente se trata de uno de los mejores ejemplos del potencial que encierran proteínas con capacidad de autoensamblaje como herramientas para la adaptación al medio de diversos microorganismos.¹⁴³ La membrana celular es la barrera fundamental que tiene un organismo frente a su entorno y no resulta extraño que algunos patógenos hayan adquirido la capacidad de alterar su permeabilidad, por ejemplo, formando poros a través de ella, como sucede en el caso del ántrax. Una estrategia muy similar utilizan otros patógenos como *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus* o *Streptococcus pneumoniae* para internalizar los factores de virulencia en sus víctimas (Figura 18). Del mismo modo que sucede con el AP de la toxina del ántrax, esto suele ocurrir a través de un proceso de autoensamblaje de monómeros (individualmente inactivos) para dar lugar a una superestructura, normalmente de simetría definida,¹⁴⁴ que es la que presenta funcionalidad biológica.

Las proteínas capaces de formar poros en la membrana celular se han clasificado en base a su función, al mecanismo de penetración en la membrana o a su estructura.¹⁴⁵ Desde el punto de vista molecular, esta última es la más útil. Por un lado ha permitido encontrar características comunes entre organismos evolutivamente distantes y, sobre todo, parámetros como el tamaño, simetría o balance hidrófobo-hidrófilo de la estructura del poro pueden resultar muy útiles en el diseño de agentes que interfieran en su mecanismo de actuación.

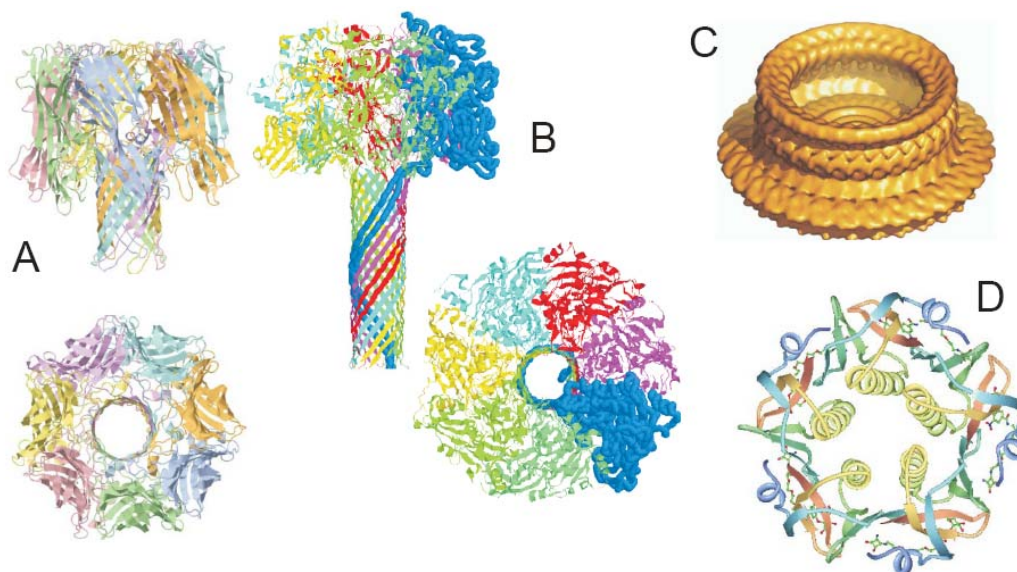


Figura 18. Ejemplos representativos de proteínas (toxinas) capaces de formar poros: A, α -hemolisina de *Staphylococcus aureus*; B, antígeno protector del ántrax; C, pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*; D, toxina del cólera.

La presentación multivalente de elementos de reconocimiento capaces de interactuar simultáneamente con sitios de reconocimiento idénticos en cada uno de los monómeros, da lugar a un aumento de la afinidad mucho mayor del que cabría esperar de la suma de las interacciones individuales, un fenómeno conocido como efecto quelato.^{54,146} En este sentido, es razonable plantear el concepto de *complementariedad de simetría* como herramienta para implementar el diseño de antitoxinas. Los diseños de Fan⁵⁶ y Bundle⁵⁷ frente a la toxina tipo Shiga y la del cólera, comentados en el capítulo anterior, constituyen buenos ejemplos de la validez de esta hipótesis.

3.2.3. Diseño de inhibidores multivalentes de la toxina del ántrax

La primera aplicación del concepto de interacción multivalente en el diseño de antitoxinas frente al ántrax la propuso Mourez. La polimerización de un polipéptido que mostraba una moderada afinidad por AP₆₃ sobre un esqueleto de acrilamida condujo a un aumento de hasta cuatro órdenes de magnitud en la afinidad por [AP₆₃]₇, suficiente para bloquear la toxina en modelos animales (Figura 19).¹³¹

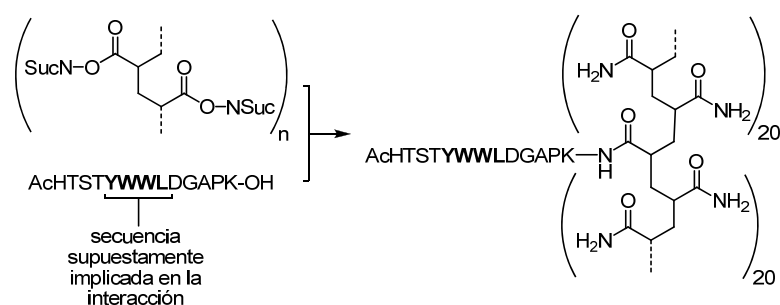


Figura 19. Estructura del inhibidor multivalente de la toxina del ántrax diseñado por Mourez.¹³¹

La simplicidad del diseño y su eficacia han dado un impulso importante al desarrollo de antitoxinas multivalentes.¹⁴⁷ Inspirados en este trabajo, Kane y colaboradores, han estudiado la relación estructura-actividad empleando una variedad de plataformas poliméricas¹⁴⁸ entre las que se incluían liposomas.¹⁴⁹ Otros autores han aplicado el mismo concepto para desarrollar inhibidores poliméricos de otras toxinas con un modo de acción similar.¹⁵⁰ Sin embargo, el empleo de estructuras poliméricas, inherentemente poco definidas, dificulta seriamente extraer conclusiones precisas que permitan deducir los requisitos estructurales óptimos que, a nivel atómico, debe presentar el inhibidor. Adicionalmente, incluso para los candidatos con mejores propiedades, su relevancia clínica puede estar seriamente amenazada por las complejas regulaciones legales que un agente terapéutico de naturaleza polimérica debe superar antes de llegar al mercado.^{49,151}

Alternativamente, se han descrito aproximaciones que emplean como plataformas multivalentes virus poliédricos, como el virus Flock House (FHV), de geometría icosaédrica.¹⁵² Pero, curiosamente, el desarrollo de inhibidores basados en moléculas de diseño (o inspiradas en la estructura de la diana biológica) no ha recibido tanta atención. Una estrategia basada en el conocimiento de la estructura de la diana terapéutica y la explotación del concepto *complementariedad de simetría* parece, en el caso de la toxina del ántrax, más adecuada. En este sentido, la simetría de orden 7 del oligómero de AP₆₃ responsable de la translocación de los factores tóxicos del ántrax, aunque no está muy extendida en la naturaleza a nivel molecular, resulta perfectamente compatible con la de la β-ciclodextrina (βCD, Figura 1, Introducción General). La complementariedad simétrica y la versatilidad sintética de la βCD han sido recientemente aprovechadas por Karginov y colaboradores (Innovative Biologics Inc., EE.UU.) para diseñar inhibidores de la toxina del ántrax (Figura 20).

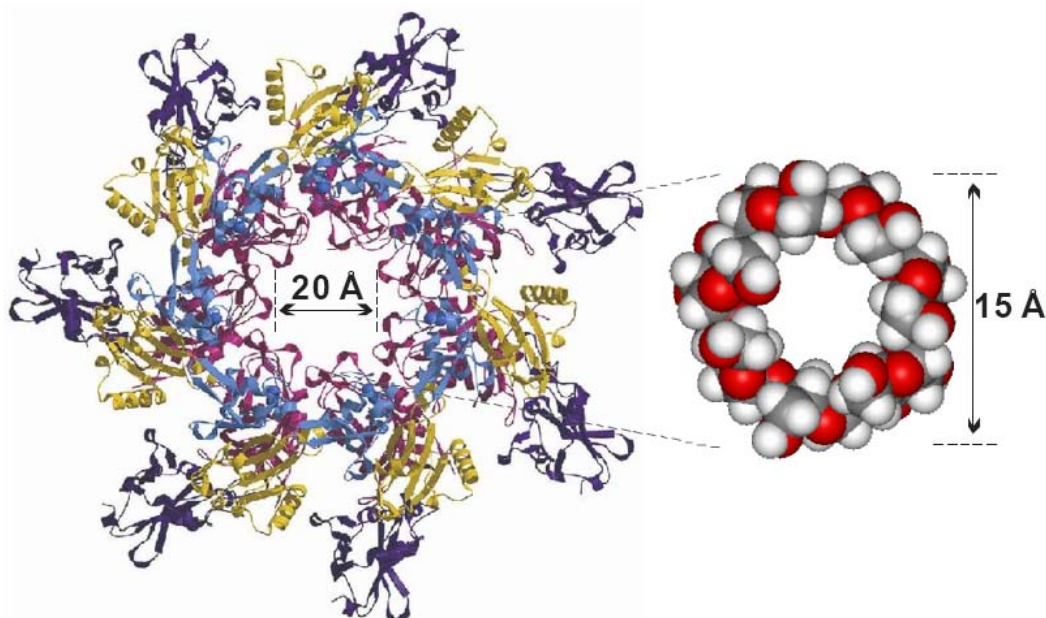


Figura 20. Comparación entre las estructuras de [AP₆₃]₇ y la βCD, con indicación de los diámetros interno y externo, respectivamente.

El concepto de diseño es realmente sencillo y se fundamenta sobre la base de que una determinada región del interior de $[AP_{63}]_7$ es rica en aminoácidos cargados negativamente (Glu, Asp) que participan en la estabilización del oligómero formando puentes salinos con otros de carga complementaria en la subunidad contigua. La funcionalización de la β CD, con un diámetro exterior menor que el interior de $[AP_{63}]_7$ (Figura 20), con grupos cargados capaces de interferir en esta interacción debe bloquear el funcionamiento del mecanismo de translocación. Así, Karginov y colaboradores han diseñado una serie de poliamino- β CDs (Figura 21) capaces de anular el tráfico iónico a través del poro.^{153,154} La administración de estos anticuerpos artificiales de AP, en combinación con antibióticos (ciprofloxacina), proporcionan una protección eficaz frente a la infección en roedores.¹⁵⁵

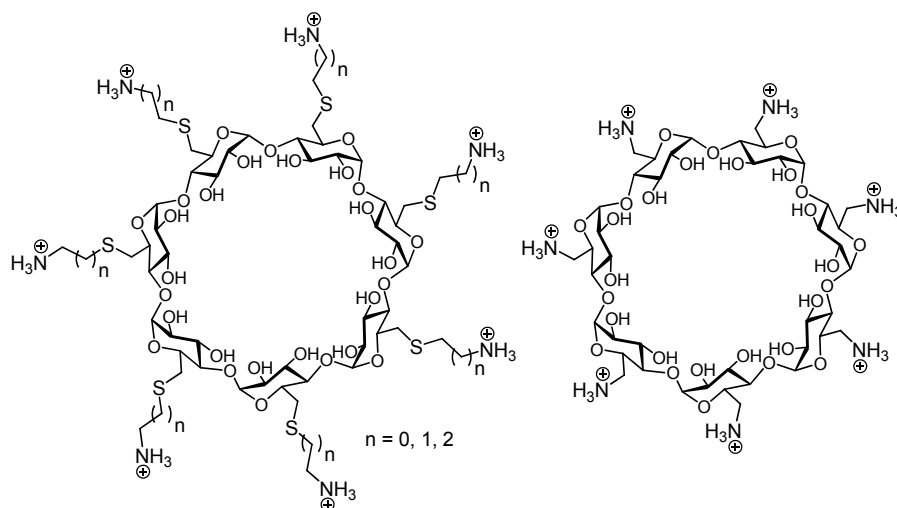


Figura 21. Estructura general de los derivados policatiónicos de β CD estudiadas por Karginov y colaboradores.¹⁵³

Los resultados de Karginov ponen de manifiesto la necesidad de disponer de grupos cargados positivamente sobre la corona primara de la β CD. Sin embargo, su estrategia sintética presenta limitaciones a la hora de acceder a una amplia variedad de motivos estructurales. La estrategia se basa en la incorporación de ω -aminotioles, no siempre fácilmente accesibles, sobre la cara primaria de la β CD. En colaboración con el equipo del Dr. Karginov, en esta Tesis nos hemos propuesto investigar los aspectos estructurales que influyen en las propiedades de esta familia de anticuerpos artificiales del antígeno protector del ántrax. Para ello se ha tratado de desarrollar una estrategia sintética que permita ampliar el abanico estructural accesible.

3.3. Resultados y discusión

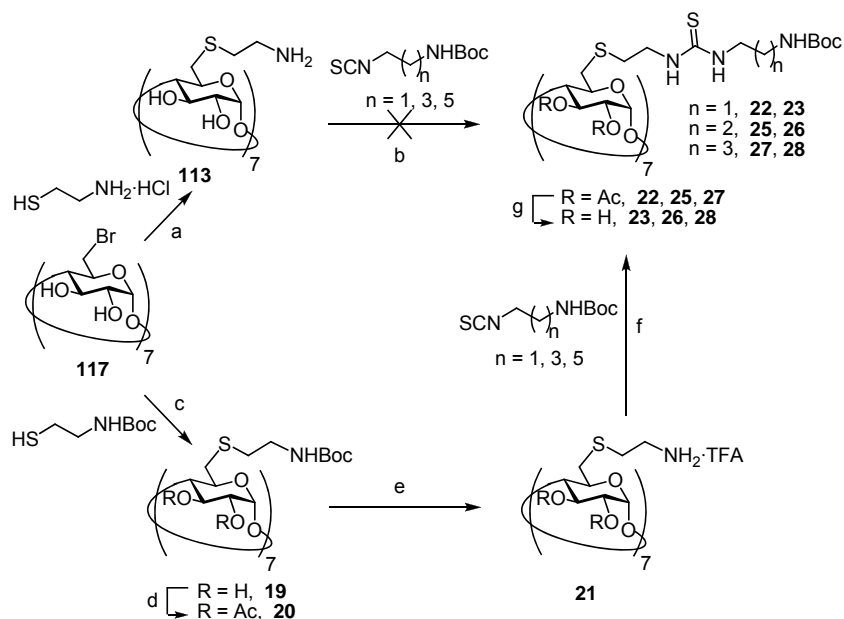
La estrategia sintética desarrollada explota la reacción de formación de tioureas¹⁵⁶ para crear diversidad en el modo de presentación de la corona catiónica. Esta reacción de acoplamiento entre aminas e isotiocianatos no solo funciona con un alto rendimiento y total quimioselectividad sino que es compatible con una amplia variedad de grupos funcionales adicionales. Una muestra de su extraordinaria versatilidad, por ejemplo, es su aplicación a la preparación de derivados hiperramificados de CDs.^{24,25,27,62} Adicionalmente, el grupo tiourea presenta excelentes propiedades como donador de enlaces de hidrógeno y podría participar en interacciones cooperativas con grupos aniónicos situados en el interior de $[AP_{63}]_7$ en buena medida responsables de la funcionalidad del poro.

Como producto de partida se ha empleado una de las estructuras privilegiadas para la inactivación de la funcionalidad de $[AP_{63}]_7$ encontradas por Karginov, la heptakis[6-(2-aminoetiltilio)]ciclomaltoheptaosa (**113**) (Figura 21, n = 1). A diferencia de otros derivados de β CD funcionalizados con aminotioles en la cara primaria, la heptaamina **113** se puede obtener a gran escala mediante sustitución nucleófila de 6-desoxi-6-halo- β CD por cisteamina libre.²⁸ Además, la incorporación del segmento etiltio (SCH_2CH_2) entre el núcleo de β CD y el grupo amino facilita la accesibilidad de éste y su reactividad.

3.3.1. Conjugados moleculares de CDs policatiónicas

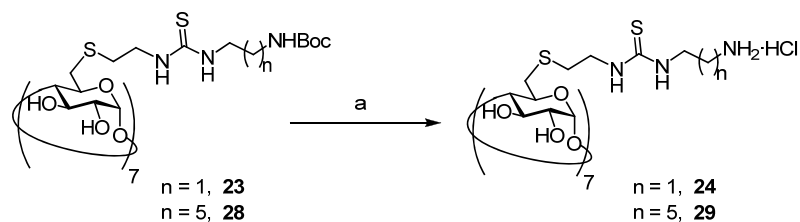
Para explorar la estrategia sintética se ha elegido una primera serie de ω -aminoalquilisotiocianatos convenientemente protegidos (**114**, **115** y **116**, Esquema 12, n = 1, 3 y 5, respectivamente) y se han optimizado las condiciones de acoplamiento sobre la cara primaria de la β CD. En principio, la quimioselectividad de la reacción de formación de tioureas debería permitir llevar a cabo el acoplamiento sin necesidad de proteger los

grupos hidroxilo de la cara secundaria de la CD, como se ha descrito anteriormente.²⁸ Sin embargo, en este caso, los productos de adición parcial de isotiocianatos a **113** precipitan en el medio de reacción impidiendo que la reacción se complete. Para lograr una mejor solubilidad de reactivos y productos se ha diseñado una ruta alternativa basada en la protección de los hidroxilos de la cara secundaria de la β CD. Así, el derivado heptacisteaminilado **20** se preparó a partir del 6-bromo derivado **117**¹⁵⁷ por sustitución nucleófila de las posiciones primarias (\rightarrow **19**) y consiguiente acetilación de los hidroxilos de la cara secundaria con un rendimiento global del 80% (Esquema 12). El tratamiento de **20** con una mezcla de TFA y CH_2Cl_2 condujo cuantitativamente a la heptaamina **21**, soluble en disolventes orgánicos. La reacción de acoplamiento catalizada por Et_3N de **21** con los isotiocianatos **114**, **115** y **116** ($n = 1, 3$ y 5 , respectivamente) en CH_2Cl_2 , seguida de desacetilación de los grupos hidroxilo de la cara secundaria condujo a los conjugados **22**, **25** y **27** con excelentes rendimientos (70-78%).



Esquema 12. Estrategias de síntesis de las tioureido-CDs policatiónicas **23**, **26** y **28**. Reactivos y condiciones: a) $\text{HS(CH}_2)_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$, Et_3N , DMF, 15 h, 99%. b) **114** (\rightarrow **22**), **115** (\rightarrow **25**), o **116** (\rightarrow **27**), $\text{Py-H}_2\text{O}$ (1:1), 24 h. c) $\text{HS(CH}_2)_2\text{NHBoc}$, Cs_2CO_3 , DMF, 60 °C, 48 h, 99%. d) Ac_2O , Py , 0 °C, 20 h, 81%. e) $\text{TFA-CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1), 2 h, 99%. f) **114** (\rightarrow **22**), **115** (\rightarrow **25**), o **116** (\rightarrow **27**), Et_3N , CH_2Cl_2 , 24 h, 70-78%. g) MeONa , MeOH , 18 h, 98%.

La hidrólisis ácida de los grupos carbamato de **23**, **26** y **28** resultó ser una operación delicada. El tratamiento exhaustivo con TFA, aunque eliminó eficazmente los grupos protectores, condujo a productos heterogéneos, posiblemente debido a la hidrólisis de enlaces glicosídicos en el anillo de β CD. Un compromiso entre la desprotección completa de los grupos amino y la estabilidad de la plataforma se logró empleando una mezcla 1:1 de $\text{TFA-H}_2\text{O}$ durante 1 h a t.a. Así se pudieron obtener las tioureido-CDs policatiónicas **24** y **29** (Esquema 13) cuya homogeneidad se confirmó mediante EM-ESI y RMN.



Esquema 13. Estrategias de síntesis de tioureido-CDs policatiónicas **24** y **29**. Reactivos y condiciones: a) TFA-H₂O (1:1), 1 h, 99%.

En colaboración con el Dr. Karginov se realizaron ensayos preliminares para conocer el efecto que los compuestos **24** y **29** tenían sobre células RAW264.7 (macrófago de ratón) y su eficacia para protegerlas frente a dosis letales de la toxina del ántrax (LeTx) (Figura 22). Para ello, se trataron células RAW264.7 por separado con concentraciones crecientes de las ciclodextrinas en ausencia (barras blancas) o presencia (barras negras) de dosis letales de la toxina y se monitorizó la viabilidad celular espectrofotométricamente determinando la absorbancia a 570 o 590 nm (densidad óptica, D.O.). Es destacable que ninguna de las CDs tiene un efecto negativo sobre la viabilidad celular, sin embargo su actividad bloqueadora de LeTx fue muy distinta. Mientras que **24** (Figura 22a) no es capaz de evitar la muerte celular más allá de un 15% a concentraciones superiores a 50 μ M, el derivado **29** (Figura 22b) mejora significativamente los resultados observados para **113** (Figura 22c) (IC₅₀ 6.3 frente a 12.1 μ M,¹⁵⁴ respectivamente).

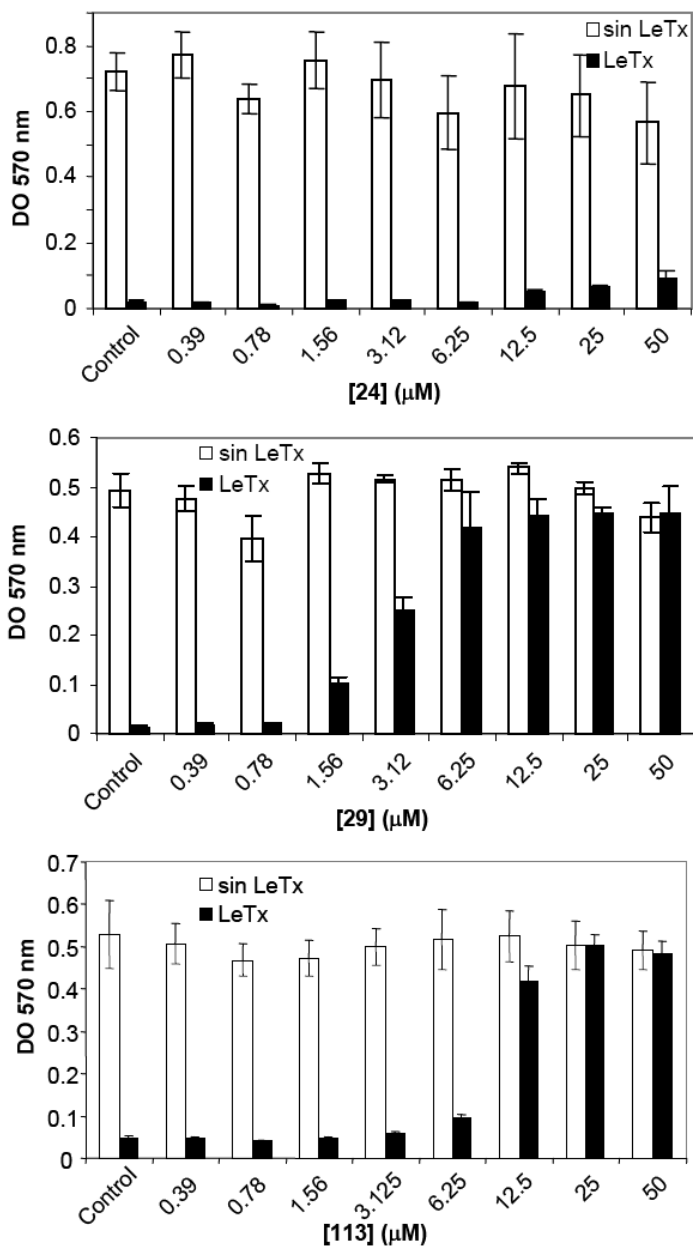
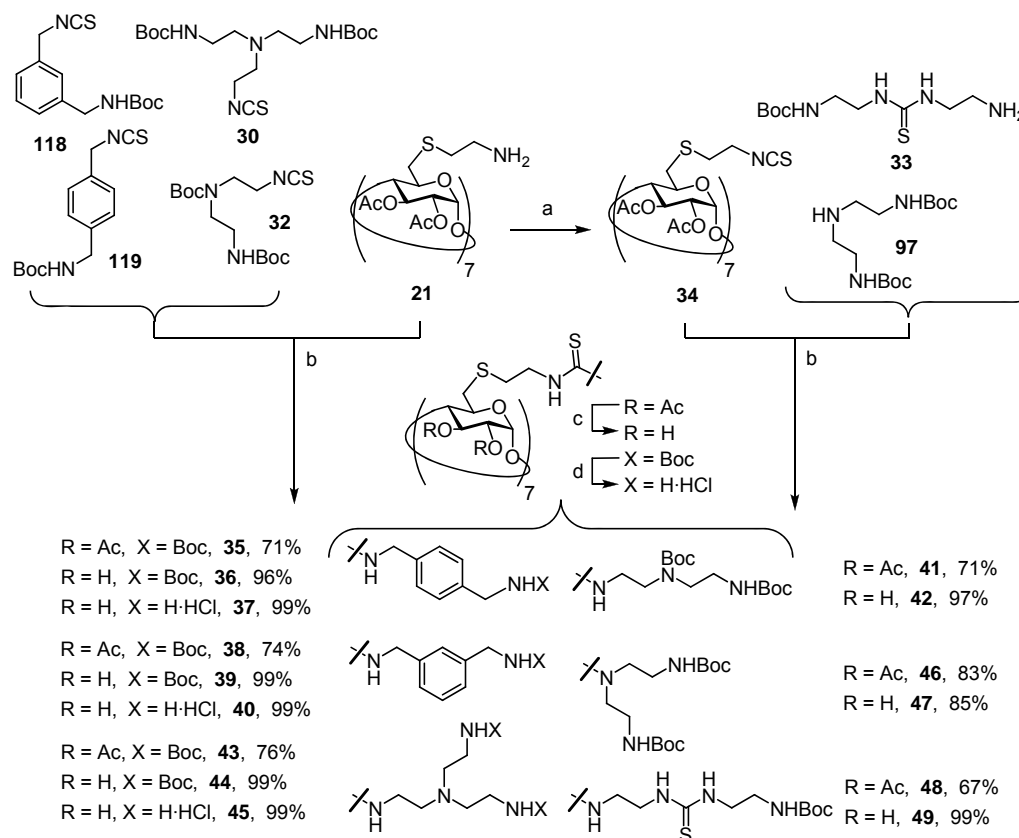


Figura 22. Protección de células RAW264.7 frente a LeTx inducida por tioureido-CDs policatiónicas **24** y **29** en comparación con **113**.



Esquema 14. Preparación de las tioureido-CDs policatiónicas **36**, **39**, **42**, **44**, **47** y **49**. Reactivos y condiciones: a) CSCl_2 , CaCO_3 , CH_2Cl_2 - H_2O (1:1), 1 h, 90%. b) Et_3N , CH_2Cl_2 , 24 h. c) MeONa , MeOH , 18 h. d) TFA - H_2O (1:1), 2 h.

En base a estos resultados preliminares y teniendo en cuenta que el poro creado por $[\text{AP}_{63}]_7$ presenta más grupos cargados negativamente y otra serie de aminoácidos que podrían explotarse para aumentar la eficacia del bloqueo de la toxina, se ha elaborado una nueva colección de compuestos que presenta una mayor diversidad estructural. Se seleccionaron una serie de elementos de base para evaluar el efecto del número y disposición de los grupos cargados y la naturaleza de los espaciadores que los unen (Esquema 14). Dado que la heptaamina **21** se puede transformar eficazmente en el

isotiocianato **34** por tratamiento con tiofosgeno, esta serie de elementos de base contiene tanto isotiocianatos (**118**, **119**, **30** y **32**) como aminas (**33** y **97**). La obtención de estos compuestos se describe en la parte experimental de esta Tesis.

El acoplamiento en CH_2Cl_2 catalizado por Et_3N de los isotiocianatos y aminas sobre **21** o **34**, respectivamente, y posterior desacetilación permitió obtener los correspondientes heptaconjugados completamente homogéneos con buenos rendimientos para reacciones en las que ocurren 7 acoplamientos por molécula (67-83%) (Esquema 14).

El tratamiento de **36** y **39** con una mezcla 1:1 de TFA- H_2O durante 2 h permitió aislar los aductos heptacatiónicos **37** y **40** completamente homogéneos con rendimiento cuantitativo. Sin embargo la eficacia de los derivados con espaciadores rígidos para bloquear la toxina del ántrax resultó bastante más pobre (IC_{50} 24.6 μM para **37**).

Desafortunadamente, las mismas condiciones de desprotección dieron lugar a mezclas complejas en el caso de los compuestos con 14 grupos carbamato o tiourea. El resultado obtenido no mejora al llevar a cabo las reacciones con menor proporción de ácido. Tiempos de reacción más cortos reducen en cierta medida la heterogeneidad, pero no la evitan. Mezclas de TFA- CH_2Cl_2 o soluciones diluidas de ácido clorhídrico tampoco permitieron obtener productos homogéneos. Ensayos celulares han mostrado además que los productos heterogéneos son ineficaces frente a LeTx, además de ser tóxicos para las células (Figura 23). El compuesto **45**, obtenido por desprotección de **44**, sólo protege a las células a concentraciones en las que la supervivencia celular es menor del 30% (> 50 μM).

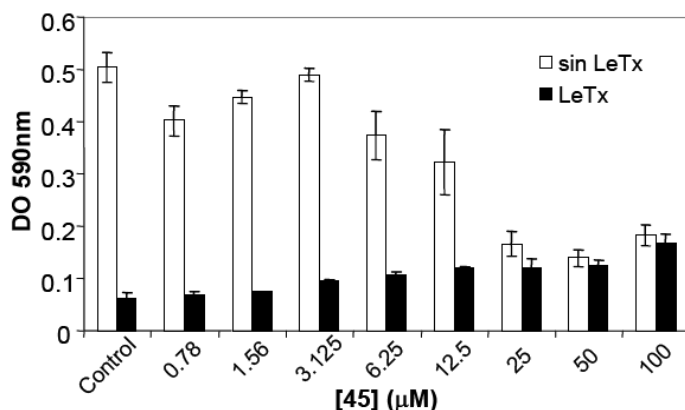


Figura 23. Protección de células RAW264.7 frente a LeTx inducida por el derivado tetradecacatiónico de β CD 45.

Probablemente la hidrólisis ácida de los enlaces glicosídicos, y la consiguiente rotura de la simetría molecular, está en el origen de este problema. El hecho de que condiciones como las ensayadas en esta serie de compuestos hayan sido empleadas con éxito previamente para la hidrólisis de carbamatos en derivados estructuralmente relacionados, sin puentes de tiourea,¹⁵⁸ podría indicar que el grupo tiourea participa activamente en esta hidrólisis. Este inconveniente ha impedido evaluar la eficacia frente a la toxina de este tipo de presentaciones multitópicas.

3.3.2. Conjugados supramoleculares de CDs policationicas

Un modo de salvar este escollo para evaluar el efecto de la multiplicación de elementos catiónicos en la inhibición de LeTx ha sido aprovechar la capacidad de inclusión molecular de las CDs para promover la formación de complejos de estequiometría controlada. En principio, empleando un huésped que favorezca la formación de complejos de estequiometría 2:1 CD:huésped, sería posible imitar presentaciones como las que se pretendían con las estructuras del Esquema 14.

Para confirmar la validez de esta hipótesis se prepararon los complejos de **113** y **24** con 6-*p*-toluidino-2-naftalensulfonato sódico (TNS). El TNS es una sonda fluorescente ampliamente empleada para monitorizar procesos biológicos cuya intensidad de fluorescencia está íntimamente ligada a la polaridad del entorno en que se encuentra, aumentando en la medida en que aumenta la hidrofobia.¹⁵⁹ El TNS forma un fuerte complejo de inclusión molecular con **113**, lo que se traduce en un aumento de la intensidad de fluorescencia. Mediante espectroscopía de fluorescencia se pudo determinar una constante para el complejo de estequiometría 2:1 de $9.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-2}$ (Figura 24), aunque los datos experimentales no descartan una proporción relevante del complejo de estequiometría 1:1.

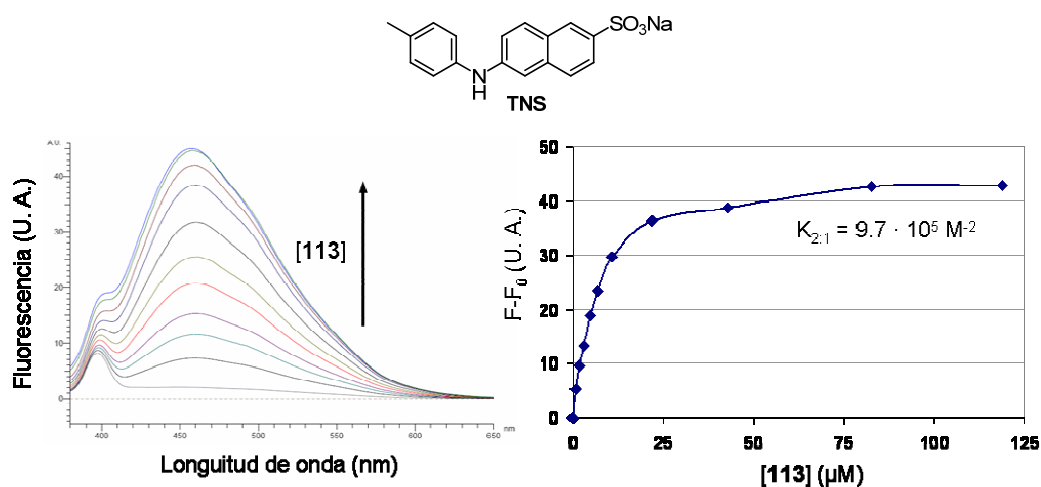


Figura 24. Espectros de fluorescencia (izquierda) e isoterma de complejación (derecha) para el complejo **113**:TNS ([TNS] = 10 μM), con indicación de la estequiometría y $K_{a(2:1)}$ observada.

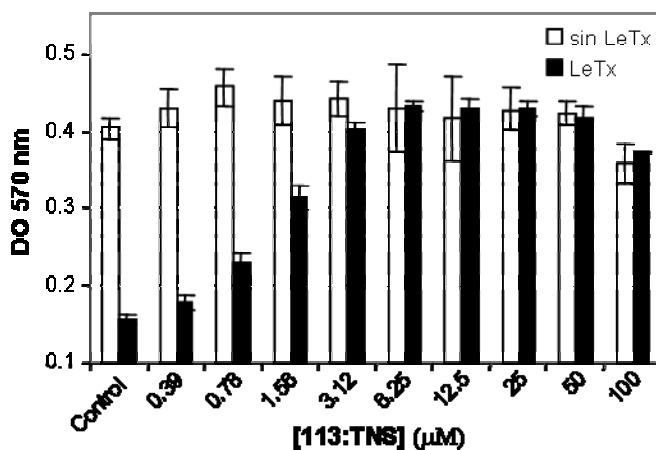
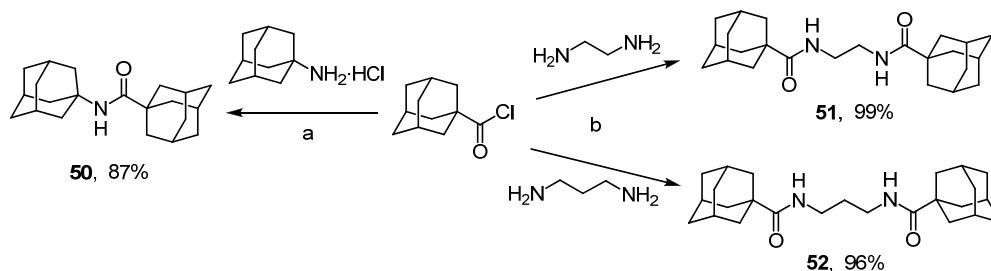


Figura 25. Protección de células RAW264.7 frente a LeTx inducida por los complejos 2:1 **113:TNS**.

Aunque el complejo no permitió visualizar el proceso de interacción con el poro, el valor de IC_{50} fue significativamente mejor que los resultados previamente obtenidos para **113** (0.78 μ M frente a 12.1 μ M, respectivamente) (Figura 25). Algo parecido se observó para el complejo **24:TNS** (IC_{50} 6.0 μ M con el complejo frente a > 50 μ M para el producto libre). Incluso a pesar de que a las concentraciones empleadas en el ensayo una parte importante del complejo debe estar disociado.

Este prometedor resultado ha impulsado el diseño de huéspedes que favorezcan la formación de complejos de estequiometría definida 2:1 CD:huésped y para ello se han preparado una serie de dímeros de adamantano unidos a través de espaciadores de diferente longitud (Esquema 15). El adamantano es una molécula privilegiada para formar complejos de inclusión con derivados de β CD por su tamaño e hidrofobia.¹⁶⁰



Esquema 15. Síntesis de dímeros de adamantano **50**, **51** y **52**. Reactivos y condiciones: a) Hidrocloruro de adamantanilamina, DIPEA, CH_2Cl_2 , 2.5 h. b) EDA (\rightarrow **51**) o 1,3-diaminopropano (\rightarrow **52**), DIPEA, CH_2Cl_2 , 2.5 h.

Los dímeros se prepararon a partir del cloruro de 1-adamantanocarboxilato mediante reacción con 1-adamantanilamina (\rightarrow **50**), 1,2-etilendiamina, (\rightarrow **51**) o 1,3-propilendiamina (\rightarrow **52**) con excelentes rendimientos (Esquema 15). La baja solubilidad de los dímeros en la mayoría de los disolventes ha dificultado la caracterización de sus complejos con **113**. En el caso de **52**, la estabilidad y estequiometría del complejo con **113** se ha podido comprobar mediante RMN ($K_{a(2:1)} 2.48 \cdot 10^8 \text{ M}^{-2}$). En los casos de **50** y **51** se observó al menos un aumento significativo de su solubilidad en presencia de **113** y un desplazamiento a campo alto de las señales de H-3 y H-5 de la CD, lo cual es consistente con el fenómeno de inclusión.

Los complejos de los dímeros de adamantano **50**, **51** y **52** con **113** (proporción CD-huésped 2:1) mostraron una eficacia en el bloqueo de LeTx significativamente mayor que la del derivado de βCD por si solo (Figura 26). Resulta interesante el hecho de que este aumento de eficacia depende de la naturaleza del espaciador del dímero de adamantano. Cuando solo hay un grupo amida (**50**) el aumento de eficacia es solo moderado (IC_{50} 4.5 μM frente a 12.1 μM). Con espaciadores más largos (**51** y **52**) el aumento de eficacia llega a ser de un orden de magnitud (IC_{50} aprox. 1.6 μM).

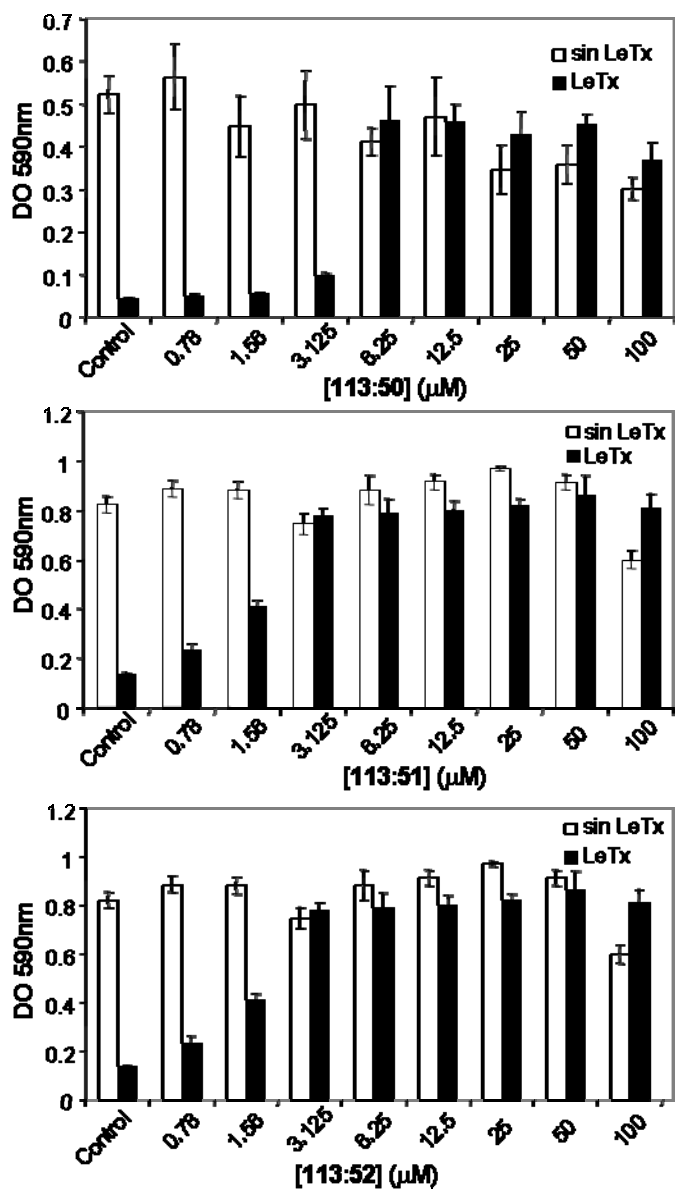


Figura 26. Protección de células RAW 264.7 frente a LeTx inducida por los complejos 2:1 113:50, 113:51 y 113:52.

Hay que destacar asimismo que estos complejos presentan cierta toxicidad a concentraciones a las que el derivado de β CD por sí solo carecía de ella (aprox. 50 μ M). La formación de complejos con una carga formal doble (14 grupos catiónicos) puede estar en el origen de esta toxicidad. En cualquier caso, la concentración a la que se observa la disminución en la viabilidad celular (> 50 μ M para el complejo **113:52**) es mucho mayor que la necesaria para proteger del efecto de la toxina.

Los resultados descritos en este capítulo ponen de manifiesto la utilidad del concepto de la complementariedad simétrica para el diseño ligandos de alta afinidad por receptores biológicos implicados en procesos patológicos como la toxina del ántrax. Un modelo basado solo en la funcionalización con grupos cargados sobre una plataforma adecuada como la β CD resulta suficiente para lograr una eficacia significativa en comparación con otras estrategias descritas (ver Tabla 2). Sin embargo, la inespecificidad de las interacciones puramente electrostáticas puede resultar un inconveniente para la aplicación de estos conjugados. Resultaría necesario identificar los motivos estructurales básicos para los cuales se puedan diseñar ligandos específicos sobre la base de plataformas de simetría compatible.

4. DISEÑO DE VECTORES DE TRANSFECCIÓN

4. Diseño de vectores de genes para transfección celular basados en ciclodextrinas

4.1. La terapia génica

La terapia génica es una modalidad de la medicina molecular de la que se espera que permita influenciar significativamente la salud humana en este siglo. En principio puede ser adaptada al tratamiento de enfermedades tanto congénitas como adquiridas.¹⁶¹ Su objetivo fundamental es relativamente simple. Consiste en transferir al interior celular, donde se dispone la maquinaria completa de procesamiento de material genético, un gen capaz de interferir en la biosíntesis de alguna proteína directamente implicada (por su presencia o ausencia) en el desarrollo de una enfermedad (Figura 27). La terapia génica, entendida como la *administración* de un gen al paciente para obtener un beneficio terapéutico, representa, en potencia, un modo de curación permanente de enfermedades. Una ventaja significativa de este tipo de agentes terapéuticos basados en ácidos nucleicos frente a los fármacos clásicos es el reconocimiento selectivo de su diana terapéutica, que les dota de una extraordinaria especificidad de acción. De este modo el desarrollo de efectos secundarios indeseables debe estar minimizado.

Aunque el concepto básico data de los años 60, la terapia génica como disciplina moderna en medicina molecular, es mucho más reciente. El punto de partida de su desarrollo es 1989, con el primer ensayo clínico de transferencia, a linfocitos de pacientes humanos, de un gen que estimulaba la resistencia frente a fármacos utilizados en un tratamiento contra el cáncer.¹⁶² Este y otros ensayos posteriores, utilizando retrovirus de primera generación como vectores, pusieron de manifiesto el potencial terapéutico de la terapia génica pero, al mismo tiempo, llamó la atención sobre la necesidad de avanzar en el conocimiento de las dianas terapéuticas de multitud de enfermedades, en el desarrollo de principios activos basados en ácidos nucleicos y de protocolos de transfección más eficaces y en el estudio de los mecanismos de internalización, biodistribución y rutas metabólicas involucradas en este tipo de terapias.

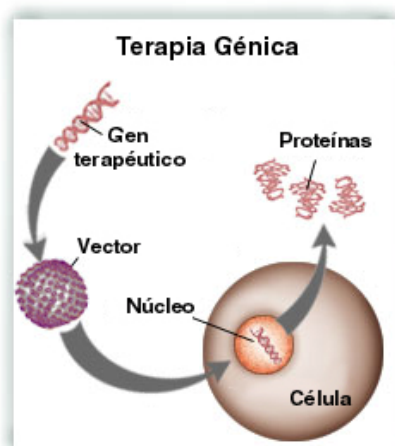


Figura 27. Representación esquemática del concepto de la *terapia génica*.

El esfuerzo realizado en diferentes áreas en los últimos 20 años, junto a la identificación de genes implicados en ciertas enfermedades a través de la elucidación del genoma humano, ha conseguido transformar una tecnología experimental como la terapia génica en una estrategia viable para el desarrollo de nuevos fármacos. De hecho, en la actualidad ya existe una amplia diversidad de agentes terapéuticos basados en ácidos nucleicos que se pueden agrupar en las siguientes categorías:

- Plásmidos,¹⁶³ macromoléculas de ADN en forma de doble hélice que contienen genes (transgenes, cuando estos son exógenos o ajenos al organismo) completos que codifican proteínas con utilidad terapéutica.
- Oligonucleótidos,¹⁶⁴ segmentos cortos de ADN, normalmente en forma de cadena simple, que suelen emplearse para inhibir selectivamente la expresión de una proteína (terapias antisentido y aplicaciones como antígenos).
- Ribozimas,¹⁶⁵ moléculas de ARN capaces de reconocer secuencias específicas de ARN mensajero (ARNm) y promover su hidrólisis.
- ADNzimas,¹⁶⁶ análogos de ribozimas basados en ADN, lo cual les proporciona una mayor estabilidad a la degradación química y biológica.

- Aptámeros,¹⁶⁷ secuencias cortas de nucleótidos capaces de interactuar selectivamente con proteínas e interferir en su actividad.

Muchos de estos agentes se encuentran en fase de ensayos clínicos¹⁶⁸ y resultan candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos tratamientos frente a una variedad amplia de enfermedades, entre los que se incluyen cáncer, SIDA o desórdenes cardiovasculares y neurológicos como los síndromes de Parkinson y Alzheimer.¹⁶⁹

4.1.1. La administración de fármacos basados en ácidos nucleicos

Una de las principales limitaciones actuales de la terapia génica reside precisamente en la administración. De hecho, a pesar de sus ventajas, tanto el uso de agentes terapéuticos basados en ácidos nucleicos como su éxito han sido muy escasos en humanos.¹⁷⁰ Una combinación de propiedades inherentes a los ácidos nucleicos, tales como carga, tamaño e inestabilidad química y biológica son, en buena medida, responsables de esta situación (Figura 28).

Desde un punto de vista evolutivo, es una ventaja que existan barreras fisiológicas que limiten el flujo de material génico, ya que esto preserva el genoma del individuo y lo protege de contaminaciones externas, pero para el desarrollo de la terapia génica es, sin duda, el mayor obstáculo. La internalización celular está limitada por el tamaño de estas macromoléculas, especialmente en el caso de plásmidos (> 200 nm) y por la repulsión electrostática entre los fosfolípidos de la membrana celular y el esqueleto de grupos fosfato de los ácidos nucleicos, ambos cargados negativamente. Juega también en contra su baja estabilidad *in vivo*, debido a la abundancia de endo- y exonucleasas, enzimas especializadas en la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de la cadena oligonucleotídica.¹⁷¹ Por todo ello, el transporte y la internalización celular están muy limitados. A pesar de ello, se ha observado que algunas moléculas de ADN son capaces no solo de internalizarse en células musculares,¹⁷² sino incluso de alcanzar la maquinaria replicante manteniendo su funcionalidad.

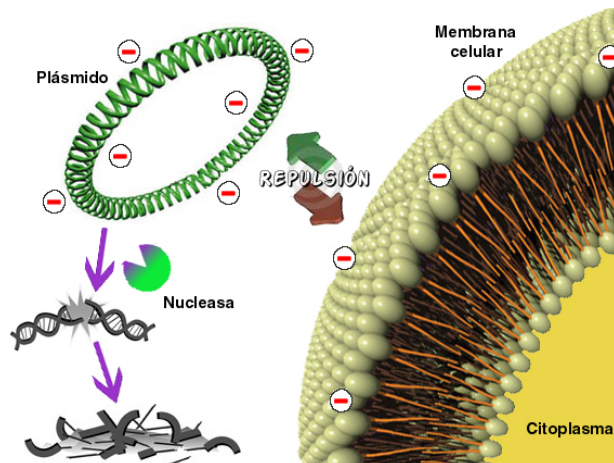


Figura 28. Representación esquemática de las limitaciones farmacocinéticas de los agentes terapéuticos basados en ácidos nucleicos.

El éxito de la terapia génica está íntimamente asociado al desarrollo de estrategias que faciliten la administración de los ácidos nucleicos y que, en definitiva, aumenten su biodisponibilidad. Sin embargo, las propiedades que un sistema eficaz de transporte de genes debe presentar resultan bastante diferentes, normalmente más exigentes, que las de los sistemas de transporte de fármacos convencionales.¹⁷³ El amplio espectro de aproximaciones que han sido propuestas, cada una con sus ventajas e inconvenientes, da fe de las dificultades para promover que estas macromoléculas superen las barreras fisiológicas. En función de las técnicas empleadas, los métodos descritos para facilitar la administración de fármacos basados en ácidos nucleicos pueden clasificarse en dos grandes tipos:

- Técnicas físicas.
- Técnicas asistidas por vectores.

4.2. Técnicas físicas de transfección celular

Las *técnicas físicas* hacen uso de estímulos mecánicos o eléctricos para facilitar la internalización del material génico en la célula e incluyen procesos como *microinyección*, *transfección biobalística* (bombardeo con nanopartículas), *electroporación*, o aplicación de *ultrasonidos* y *gradientes de presión*, entre otras (Figura 29).¹⁷⁴

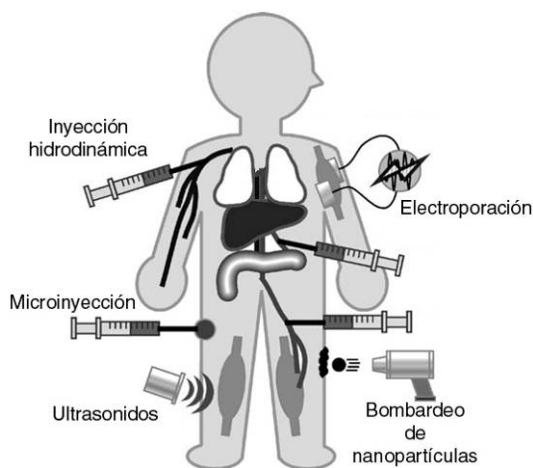


Figura 29. Métodos físicos empleados en terapia génica.

La *microinyección* es una técnica tan simple como eficaz, ya que se trabaja sobre células individuales, sin embargo la precisión y, en última instancia, la eficacia solo se consigue a costa del tiempo invertido.¹⁷⁵ La *transfección biobalística* se realiza mediante el bombardeo con nanopartículas (p. e. partículas mixtas de ADN-oro) empleando un dispositivo denominado “pistola de genes” (*gene gun*).¹⁷⁶ Evidentemente, como requiere una exposición directa del tejido, solo es concebible su aplicación directa sobre dermis, mucosas o músculos, dependiendo cualquier otra de un acceso quirúrgico. La *electroporación* emplea corrientes de alto voltaje con el fin de crear poros transitoriamente en la membrana celular que faciliten el acceso del gen.¹⁷⁷ Como cabe suponer, la viabilidad celular del tejido tratado es baja, lo cual limita su uso clínico. Alternativamente, la aplicación de *ultrasonidos* también puede incrementar la

permeabilidad de la membrana celular a macromoléculas como ADN, siendo mucho menos agresiva que la electroporación.¹⁷⁸ La *inyección hidrodinámica* es capaz de inducir un alto nivel de transfección celular en órganos internos (especialmente hígado) aprovechando el gradiente de presión originado alrededor del tejido durante la inyección de un gran volumen de líquidos.¹⁷⁹

Pese a haber conseguido niveles aceptables de transfección celular,¹⁸⁰ la estandarización clínica de las técnicas físicas no resulta nada sencilla, lo cual es un serio inconveniente para su aplicación terapéutica.

4.3. Técnicas de transfección celular asistidas por vectores

Las *técnicas asistidas por vectores* engloban una amplia serie de métodos que emplean sistemas de transporte más o menos elaborados para facilitar el paso a través de las diferentes barreras fisiológicas entre el punto de administración y la diana terapéutica del gen. Por lo general, el *vector de genes* debe desarrollar varias funciones, comenzando por encapsular el material génico en una estructura supramolecular de dimensiones nanométricas que lo proteja del entorno en su tránsito hasta la célula objetivo y que lo dirija a ella selectivamente. El vector debe promover a continuación la internalización celular a través de algún mecanismo. Y, finalmente, debe permitir la liberación en el lugar adecuado del material génico para que pueda acceder a la maquinaria celular encargada de transcribir y traducir la información que porta.

De hecho, durante la última década, la atención que han atraído ha ido en continuo aumento, probablemente impulsados en parte por las limitaciones asociadas a las técnicas físicas anteriormente comentadas.¹⁸¹ Algunas propiedades que un vector de genes debe presentar para lograr un fin terapéutico son: una alta eficacia de transfección unida a la selectividad por un tipo particular de célula o tejido, una baja toxicidad e inmunogenicidad, estabilidad de sus formulaciones y rápida biodegradabilidad de sus residuos. Adicionalmente, la facilidad de manejo y formulación y la posibilidad de adaptarlo de una manera versátil a diferentes cargas y dianas también están entre las

propiedades más deseables. Los sistemas de transporte de genes y transfección actualmente disponibles se pueden clasificar en dos grandes tipos:

- *Vectores virales.*
- *Vectores sintéticos.*

4.4. Vectores virales de genes para transfección celular

El transporte de material genético exógeno y su transfección, elementos fundamentales de la terapia génica, es una labor para la que la naturaleza cuenta con sus propias herramientas especializadas: los *virus*. Considerados por algunos como la forma más simple de vida, los virus representan una variada serie de sistemas naturales de transporte de material genético. A través de millones de años de evolución, los virus han desarrollado mecanismos extraordinariamente eficaces para transferir su carga génica a células. Evidentemente, esta característica no ha pasado desapercibida para la terapia génica, que desde sus comienzos ha tratado de utilizar virus no replicantes como vectores de material genético, en especial de plásmidos.^{182,183}

La producción de virus no replicantes constituye un verdadero reto para el desarrollo de la terapia génica que la ingeniería genética solo puede afrontar, por el momento, con virus relativamente simples.¹⁸⁴ Así retrovirus,¹⁸⁵ adenovirus,¹⁸⁶ virus adenoasociados,¹⁸⁷ el virus de la viruela (*poxvirus*),¹⁸⁸ el virus vacuna (*vaccinia virus*)¹⁸⁹ y el del herpes simple¹⁹⁰ han sido los más investigados (Figura 30).

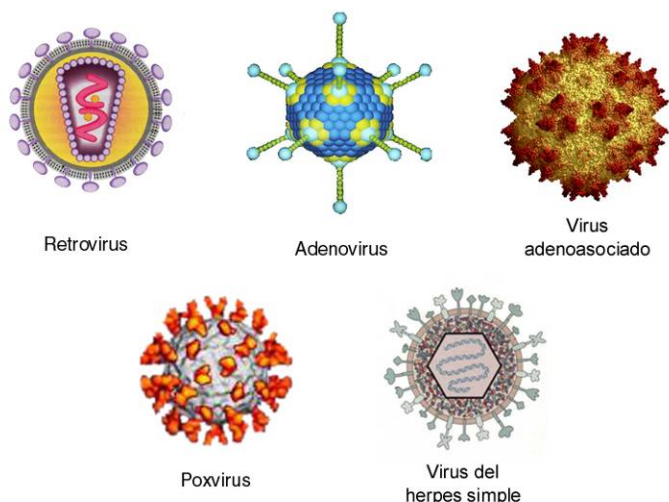


Figura 30. Algunos vectores vírales empleados en terapia génica.

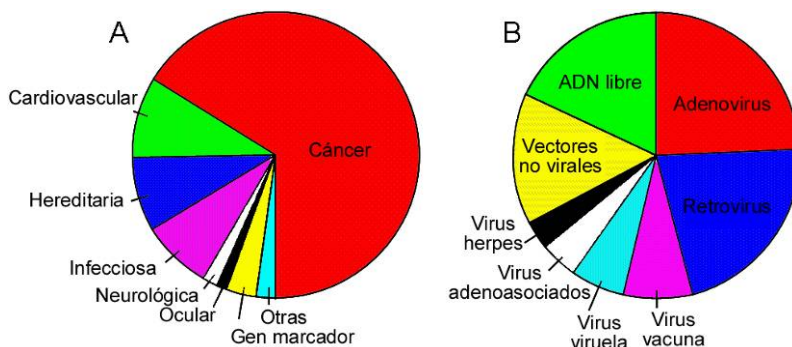


Figura 31. Clasificación de ensayos clínicos de terapias génicas a nivel mundial en función de (A) tipo de indicación y (B) tipo de vector (datos actualizados en Marzo de 2009).

Versiones recombinantes de algunos de estos virus han permitido alcanzar niveles terapéuticamente relevantes de expresión de su carga en diferentes órganos y tejidos, incluyendo riñón,¹⁹¹ ovario¹⁹² y tejido ocular¹⁹³ o muscular.¹⁹⁴ Más del 70% de los ensayos clínicos que están actualmente en marcha a nivel mundial (aproximadamente 1500) emplean vectores virales (Figura 31).¹⁹⁵ La terapia génica empleando vectores

virales ha realizado considerables progresos para el tratamiento de enfermedades tales como la distrofia muscular,¹⁹⁴ el SIDA,¹⁹⁶ las enfermedades cardiovasculares y, fundamentalmente, el cáncer,¹⁹⁷ que es el objetivo de dos tercios de las terapias en desarrollo.

Sin embargo, a pesar de los datos estadísticos, aún quedan sin resolver varios aspectos acerca del uso de vectores virales para terapia génica en seres humanos. El principal de ellos es la toxicidad y la posibilidad de desarrollar una respuesta inmune debida a la envoltura viral de proteínas. Se han descrito numerosos ejemplos de estas reacciones en animales¹⁹⁸ e incluso han causado la muerte de pacientes humanos.¹⁹⁹

Existen, adicionalmente, otra serie de factores que limitan el uso de vectores virales en terapia génica. La integración del material terapéutico en el genoma del huésped puede tener lugar de manera aleatoria, pudiendo afectar a la normal expresión de otros genes o activar oncogenes con consecuencias potencialmente catastróficas. Además, dado que la capacidad de la cubierta viral tiene un límite, el tamaño del plásmido que puede incorporar también lo tiene. Por ejemplo, los virus adenoasociados de primera generación presentan una capacidad limitada a ~4700 pares de bases (pb).²⁰⁰ Por otro lado, la producción y escalado de virus recombinantes es costosa y no está exenta de riesgos.

Esta suma de factores complica el uso de vectores virales en terapia génica rutinaria en un futuro próximo ya que, después de dos décadas de investigación exhaustiva y numerosos ensayos clínicos, aún no se han conseguido desarrollar terapias suficientemente fiables. De hecho, actualmente existe un solo tratamiento comercializado basado en un adenovirus (Gendicine, de aplicación frente a un tipo de melanoma) y su aplicación está únicamente aprobada por las autoridades chinas.²⁰¹

4.5. Vectores sintéticos de genes para transfección

La aplicación a la medicina de los principios de la nanotecnología (*nanomedicina*), a través de la elaboración de partículas multifuncionales con propiedades biomiméticas, ha revolucionado áreas como la diagnosis y el transporte de agentes terapéuticos (Figura 32).²⁰² En particular, el empleo de nanopartículas proporciona ventajas sustanciales sobre los métodos clásicos, mejorando las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas (incremento de solubilidad y estabilidad en medios biológicos, reducción de la respuesta inmune, incremento de la selectividad o liberación controlada).

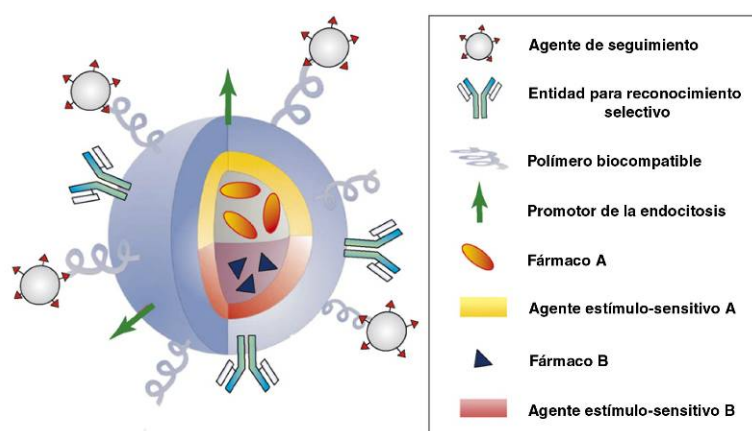


Figura 32. Representación esquemática de los componentes de una *nanopartícula multifuncional* con fines terapéuticos.

Fruto de estos avances son las innumerables aproximaciones que en la última década se han investigado como alternativas sintéticas a los vectores virales de genes.⁴⁷ Los vectores sintéticos, diseñados sobre la base de conjugados moleculares, pueden resolver algunos de los problemas inherentemente asociados a los virales. Su principal ventaja es que, en principio, a diferencia de los virus, no son inmunogénicos y por tanto, sobre el papel son más seguros. Además, su preparación y formulación es siempre mucho más sencilla que la de los vectores virales, lo cual es verdaderamente el fundamento de su

popularidad. Aunque el desarrollo de los vectores sintéticos de genes ha surgido al amparo de la nanotecnología, el primer ejemplo descrito de vector no viral para transfección se publicó hace más de 45 años.²⁰³

Los vectores sintéticos están diseñados sobre lípidos, polímeros, dendrímeros, péptidos y sus combinaciones, ofreciendo una amplia gama de estructuras capaces de compactar, proteger y transportar el material génico al interior celular. Por lo general, este proceso de asociación supramolecular entre vectores sintéticos y el material génico está dirigido por interacciones electrostáticas.²⁰⁴ Las partículas, normalmente de dimensiones nanométricas, suelen presentar una carga neta positiva en su superficie, lo cual facilita la interacción con membranas celulares y su posterior internalización. Sin embargo, a diferencia de los vectores virales, los vectores sintéticos muestran una eficacia varios órdenes de magnitud inferior que, salvo excepciones, aún debe ser resuelta.²⁰⁵ Los orígenes de esta ineficacia son diversos. Algunos vectores sintéticos interaccionan inespecíficamente con componentes de la matriz extracelular²⁰⁶ o, una vez en el interior celular, no consiguen promover la liberación de material génico en el compartimento celular o en el momento adecuado.

En la última década, el diseño de vectores sintéticos se ha orientado a la incorporación de elementos funcionales inspirados en aquellos que permiten a los virus superar estas barreras fisiológicas, es decir, a elaborar *virus artificiales*.²⁰⁷ El diseño y elaboración de vectores sintéticos es un reto complicado que requiere la integración de diversos elementos funcionales, en ocasiones incompatibles, en la estructura del vector y que estos, una vez formuladas las nanopartículas mantengan la funcionalidad de cada uno de sus componentes (Figura 33). Estos elementos funcionales pueden tener efectos a distintos niveles:

- mejorar la complejación del material génico, por ejemplo mediante la incorporación de oligopéptidos en la estructura del vector,²⁰⁸
- favorecer la internalización selectiva, por ejemplo incorporando ligandos de receptores celulares,²⁰⁹

- promover la liberación del endosoma, mediante la instalación de agentes desestabilizantes de membranas²¹⁰ o a través de cambios estructurales asociados al pH,²¹¹
- explotar los mecanismos de transporte activo a través del citoplasma,²¹²
- dotar de la capacidad para acceder al núcleo celular, mediante la instalación de antenas de localización nuclear.²¹³
- mejorar la biocompatibilidad (eventualmente la biodegradabilidad) para reducir interferencias con el sistema inmune, por ejemplo mediante la incorporación de cadenas de polietilenglicol (PEG).²¹⁴

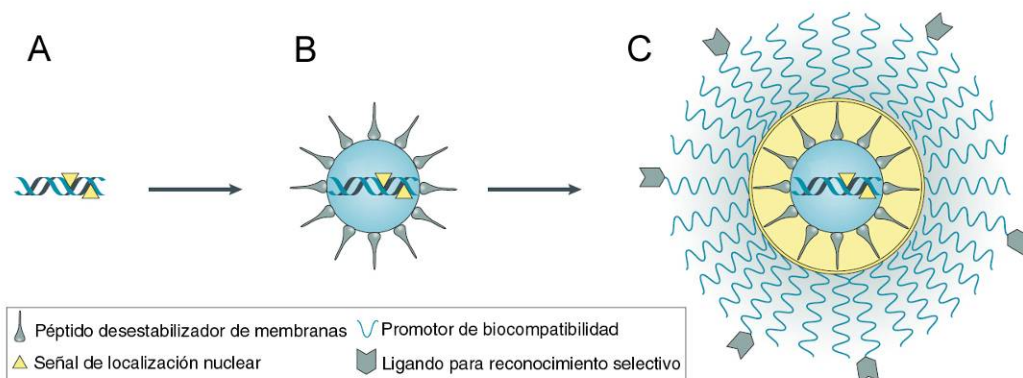


Figura 33. Representación esquemática de la construcción de un *virus artificial*. A, marcaje con sondas de señalización; B, encapsulación; C, recubrimiento con elementos biocompatibles.

La mayoría de los vectores sintéticos descritos son especies (poli)catiónicas capaces de complejar y condensar eficazmente biomacromoléculas polianiónicas como los ácidos nucleicos. Dentro de su amplia diversidad estructural, los vectores sintéticos pueden clasificarse en dos grandes grupos: *sistemas lipídicos* y *sistemas poliméricos*.

4.5.1. Sistemas lipídicos

Los lípidos, con una parte polar (o hidrófila) y otra apolar (o hidrófoba), son las moléculas anfifílicas por excelencia. Los lípidos presentan interesantes propiedades de autoorganización debido a esta propiedad. En un entorno acuoso tienden a formar bicapas que exponen al exterior la cabeza hidrófila, aislando del medio la cola apolar. En el caso de los lípidos catiónicos, esta organización supramolecular tiene la capacidad de formar complejos (*lipoplejos*) con macromoléculas de carga opuesta como el ADN a través de interacciones electrostáticas (Figura 34). Al mismo tiempo, el lipoplejo puede interactuar con otras especies cargadas negativamente, como membranas celulares, facilitando la internalización del conjunto. Estos complejos catiónicos aíslan del medio al material genético protegiéndolo del ataque de nucleasas.

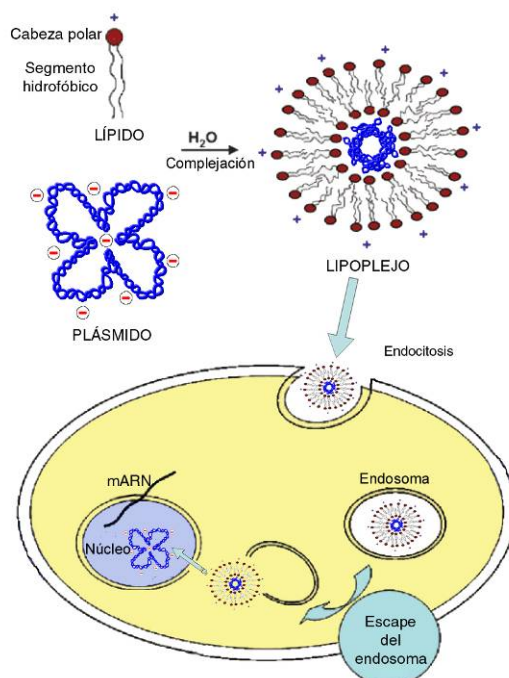


Figura 34. Representación esquemática del mecanismo propuesto para la transfección mediada por *lipoplejos*.

El grupo de Felgner describió por primera vez el uso con éxito de lípidos catiónicos (DOTMA, Figura 35A) para la vectorización de material génico.²¹⁵ Desde entonces, la estructura básica de estos lípidos, compuestos por un núcleo de glicerol con un grupo amonio y dos cadenas hidrocarbonadas (Figura 35A), se ha modificado en cada uno de sus componentes, desarrollándose un exhaustivo estudio de relación estructura-actividad para optimizar la capacidad de transfección frente a diferentes líneas celulares.²¹⁶

En este sentido, Huang y colaboradores han descrito el primer ejemplo de formulación de lipoplejos con lípidos derivados de colesterol (DC-Chol, Figura 35B). La menor toxicidad de este sistema le ha permitido ser el primer lípido catiónico empleado en ensayos clínicos.²¹⁷

Behr ha diseñado los lípidos policatiónicos DOGS (Figura 35C) Aprovechando poliaminas que están involucradas en procesos naturales de compactación del ADN.²¹⁸ La protección adicional que estos lípidos policatiónicos aportan al ADN permite alcanzar niveles destacados de expresión sin necesidad de usar coformulaciones complejas con otros lípidos.²¹⁹

Con el fin de reforzar la interacción lípido-ADN se han descrito numerosos ejemplos de lipoplejos funcionalizados con (oligo)nucleótidos,²²⁰ péptidos²²¹ y carbohidratos²²² (Figura 35D). Aunque la formación de lípidos con estas estructuras es más compleja desde el punto de vista sintético, resulta interesante que, en función del ligando elegido, se podría conseguir una transfección selectiva de determinadas células o tejidos. Por ejemplo, Hashida y colaboradores han descrito lípidos funcionalizados con galactosa que transfectan específicamente células hepáticas que sobreexpresan receptores para este tipo de carbohidratos.²²³ Otros ligandos que han sido explotados para conseguir vectores selectivos son el ácido fólico (cuyo receptor se sobreexpresa en algunas células cancerígenas),²²⁴ estradiol,²²⁵ haloperidol²²⁶ o anisamida.²²⁷

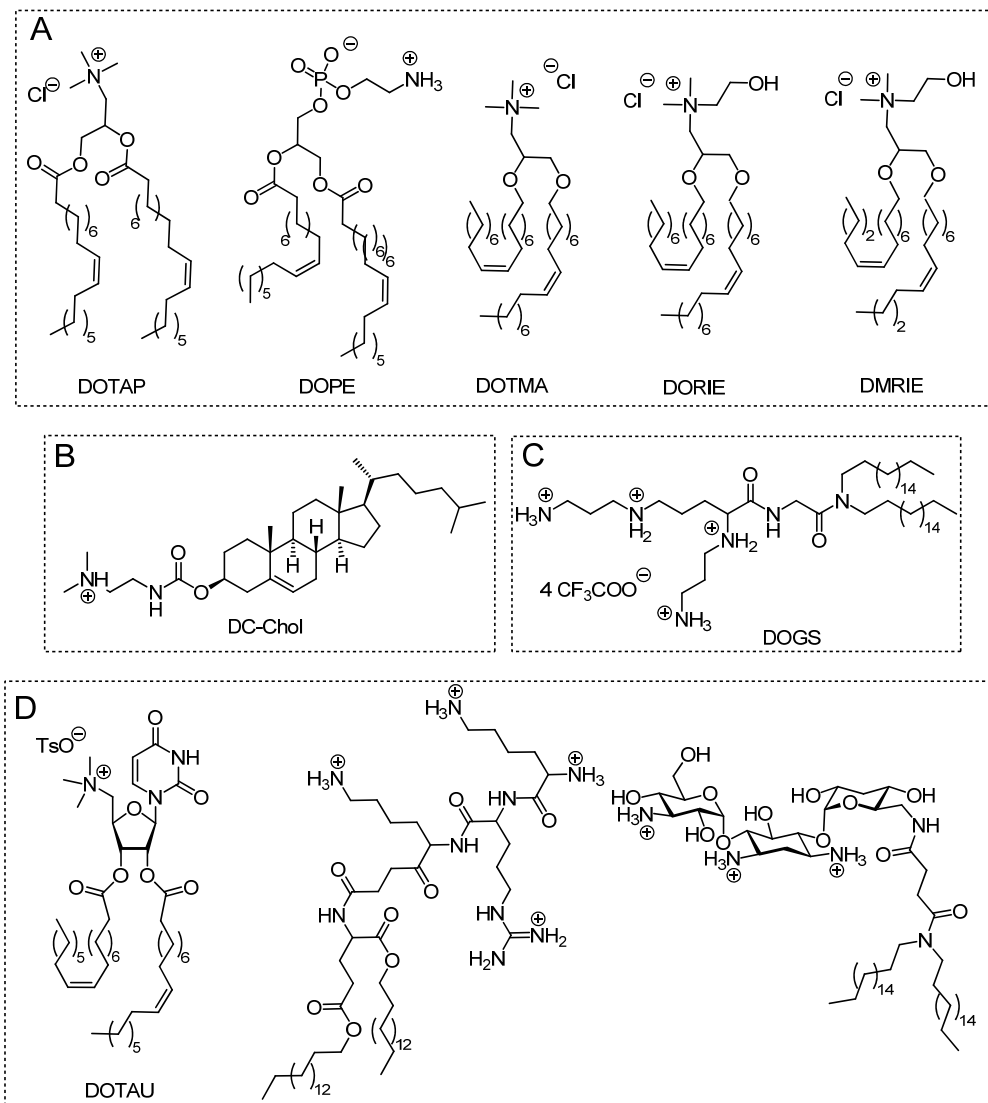


Figura 35. Estructura de algunos lípidos empleados como vectores sintéticos: A, lípidos basados en glicerol; B, lípidos basados en colesterol; C, lípidos policatiónicos basados en poliaminas; D, lípidos funcionalizados con nucleótidos, péptidos y carbohidratos.

Aunque la interacción entre los componentes del lipoplejo se supone que es básicamente electrostática, recientemente Leblond y colaboradores²²⁸ han descrito una nueva serie de lípidos neutros (lipopolitioureas, Figura 36) capaces de promover la asociación con plásmidos explotando la fuerte interacción, incluso en agua, entre tioureas y fosfatos.²²⁹ Es destacable la baja toxicidad de estos lípidos, probablemente debido a la ausencia de interacciones electrostáticas inespecíficas. Sin embargo, la menor estabilidad de las nanopartículas correspondientes hace que los niveles de expresión alcanzados sean solo moderados.

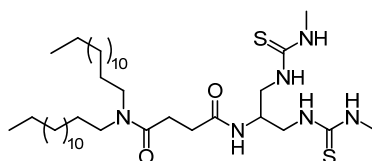


Figura 36. Ejemplo de lipopolitiourea neutra descrita por Herscovici y colaboradores.²²⁸

Zuber y colaboradores han descrito una estrategia para producir lipoplejos más estables y homogéneos basada en el uso de lípidos policationicos dimerizables (Figura 37).²³⁰ Una vez formulado el lipoplejo, la oxidación al aire de tioles libres presentes en su estructura, forma puentes disulfuro que estabilizan la partícula. La mayor concentración de glutatión en el interior celular debe revertir la reacción, facilitando la liberación del plásmido. Una aproximación similar ha sido descrita por Vierling y colaboradores empleando lípidos con cadenas fluorocarbonadas con las que es posible modificar el balance de hidrofilia/hidrofobia.²³¹

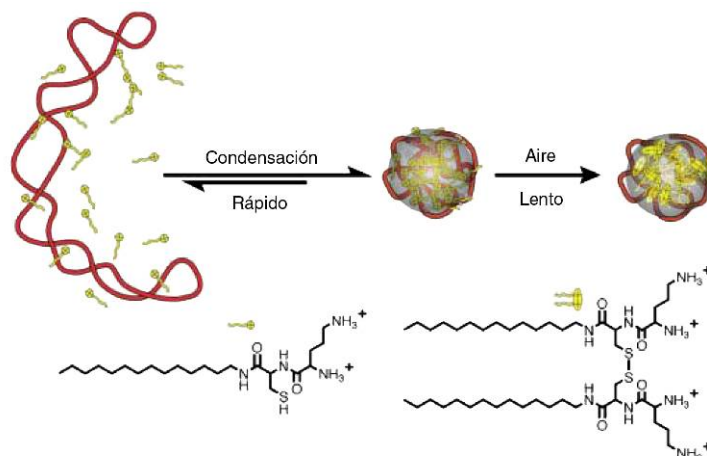


Figura 37. Lípidos policationicos dimerizables descritos por Zuber y colaboradores.²³⁰

Un problema inherente al uso de vectores formados por lípidos catiónicos es la baja compatibilidad con el suero y otros fluidos biológicos, lo cual limita significativamente sus posibles aplicaciones *in vivo*. Este inconveniente se ha intentado evitar mediante la funcionalización de los lipoplejos con cadenas de polietilenglicol (PEG).²³² El escudo hidrófilo que proporciona el PEG mejora la biodisponibilidad de las formulaciones pero, como contrapartida, disminuye la eficacia del vector, probablemente porque dificulta el escape del endosoma. Sin embargo, a pesar de estos inconvenientes, la accesibilidad sintética, la versatilidad y la estandarización de las formulaciones, normalmente combinación de varios lípidos catiónicos y neutros (p. e. lipofectina, lipofectamina 2000™), han popularizado su uso en aplicaciones *in vitro*.

4.5.2. Sistemas poliméricos

Las especies policationicas se han venido empleando para la inserción de ADN en células desde los años 70,²³³ sin embargo, el progreso de estos vectores fue marginal hasta la introducción, por parte de Behr y colaboradores, de las polietileniminas (PEI) en 1995.²³⁴ El mecanismo general de acción de los polímeros policationicos se basa en la

formación de un complejo con carga global positiva (*poliplejo*) debido a la interacción electrostática con el material génico aniónico. Los poliplejos son superiores a los lipoplejos en varios aspectos. La versatilidad en la manipulación de las propiedades físicoquímicas es la principal ventaja. Parámetros fundamentales como tamaño, forma y estabilidad, así como las interacciones con otros componentes del medio, son más fácilmente controlables en poliplejos al no producirse interacciones entre las propias moléculas del vector como ocurre en los lípidos. Además, la variedad de matrices poliméricas, cada una con propiedades diferentes (rangos de masa molecular, grado de entrecruzamiento o densidad de carga), ofrecen opciones prácticamente ilimitadas.

La poli-L-lisina (PLL) fue el primer polímero catiónico sistemáticamente evaluado como vector polimérico de ADN (Figura 38A). Laemmli demostró en 1975 su excepcional capacidad para condensar ADN.²³⁵ Los poliplejos de PLL:ADN se internalizan eficazmente en distintas líneas celulares, pero los niveles de expresión son moderados debido a su lenta liberación del endosoma. Akinc y Langer han demostrado que esta ineficacia para liberarse del endosoma está asociada al alto grado de protonación de los grupos amino de PLL a pH fisiológico.²³⁶ PLLs de alto peso molecular (> 3000 Da) presentan una mayor eficacia, pero conducen paralelamente a niveles de toxicidad inaceptables.²³⁷ La modificación de la cadena de PLL con grupos imidazol²³⁸ o la construcción de dendrímeros de PLL²³⁹ reduce dicha toxicidad.

Debido a su carga inherente, el poli[metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo] (PDMAEMA, Figura 38B) ha sido también considerado un buen candidato para desarrollar vectores sintéticos de genes. La alta capacidad de transfección *in vitro* de PDMAEMA de alto peso molecular (> 300 kDa) está aparentemente asociada a un eficiente mecanismo de liberación del endosoma.²⁴⁰ Desafortunadamente, los pobres resultados *in vivo* no han respaldado su progreso.²⁴¹

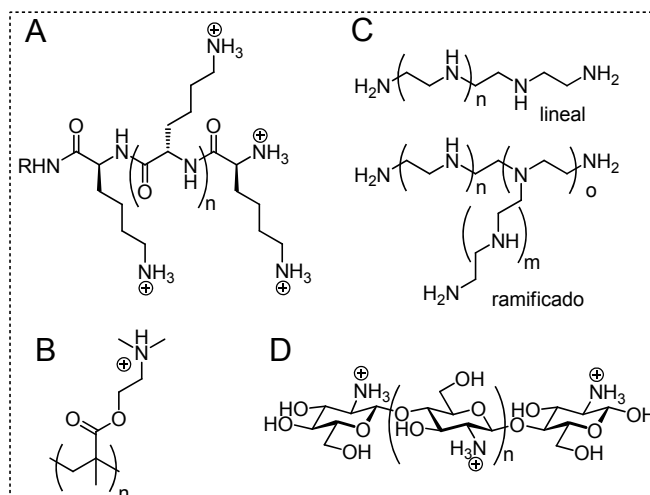


Figura 38. Estructura de algunos polímeros policationicos empleados como vectores sintéticos. A, poli-L-lisina (PLL); B, poli[metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo] (PDMAEMA); C, polietilenimina lineal (PEI) y ramificada (bPEI); D, quitosana.

La polietilenimina (PEI, Figura 38C) es el representante más destacado de los vectores poliméricos. Desde su introducción por Behr y colaboradores, innumerables modificaciones han ayudado a mejorar y comprender sus propiedades fisicoquímicas. Hoy día están disponibles en el mercado varios productos basados en PEI (*jetPEI*[™] de Polyplus, Francia y *ExGen500* de Fermentas, Canadá).²⁴² La PEI es un polímero con un alto potencial catiónico capaz de alcanzar niveles excelentes de transfección, sin embargo también su toxicidad puede llegar a ser elevada, sobre todo en el caso de polímeros de alto peso molecular, al contrario de lo que ocurre con PDMAEMA.²⁴³ Esta elevada eficacia es, al menos en parte, debida a su capacidad de actuar como *esponja de protones*.²¹¹ Esta teoría, no completamente aceptada ni válida para todos los vectores policationicos (p. e. PDMAEMA), atribuye la rápida liberación de los complejos PEI:ADN del endosoma a la capacidad de la PEI para tamponar el pH. La PEI (solo el 20% de sus grupos amino están protonados a pH 5) es capaz de compensar la acidificación que ocurre en el endosoma una vez internalizado, lo que está asociado a un

aumento de volumen que la membrana del endosoma no es capaz de tolerar y se rompe liberando los poliplexos (Figura 39).

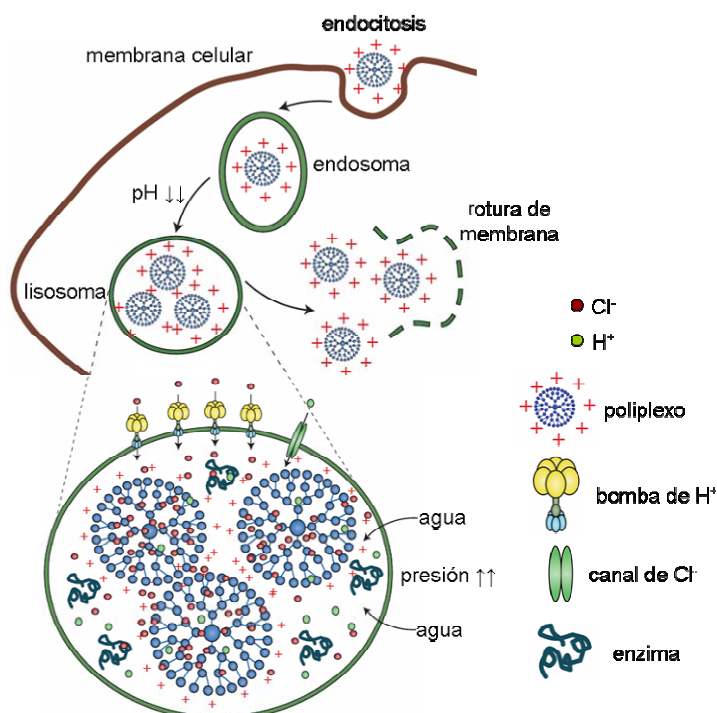


Figura 39. Mecanismo de escape del endosoma basado en el concepto de la *esponja de protones*.²¹¹

Se han descrito múltiples variaciones de la estructura de PEI, la mayoría de ellas tratando de minimizar los efectos tóxicos. Entre ellas cabe destacar la funcionalización con cadenas de PEG²⁴⁴ o colesterol²⁴⁵ a través de funciones biodegradables²⁴⁶ y la alquilación controlada de grupos amino.²⁴⁷

Precisamente la biocompatibilidad y la biodegradabilidad de las quitosanas han impulsado el interés por desarrollar vectores de genes basados en estos polisacáridos catiónicos (Figura 38D).²⁴⁸ Asimismo, se han descrito polímeros mixtos PEI-schizophyllan²⁴⁹ (Figura 40A) y PEI-dextrano²⁵⁰ (Figura 40B) y

poli(glicoamidoaminas)²⁵¹ (Figura 40C). Mención especial merecen los derivados de PEI que contienen ciclodextrinas, que se comentarán en el siguiente apartado.

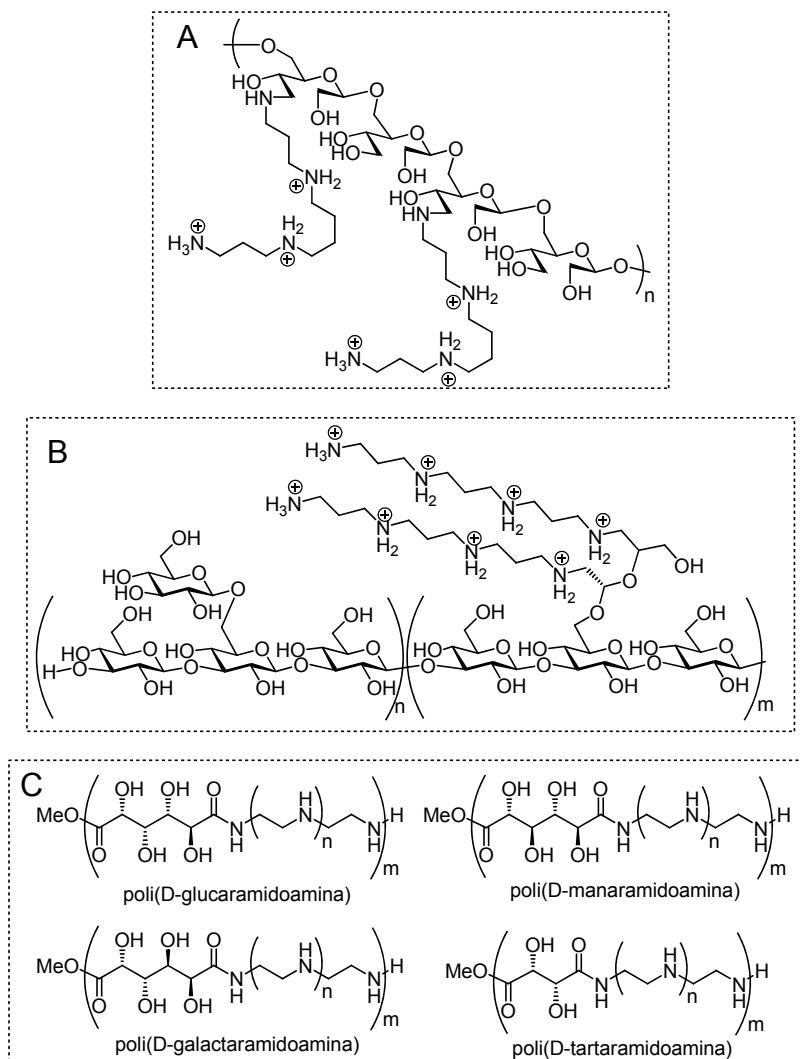


Figura 40. Polímeros policationicos derivados de carbohidratos. A, PEI-schizophyllan;²⁴⁹ B, PEI-dextrano;²⁵⁰ C, poli(glicoamidoaminas).²⁵¹

Una nueva clase de vectores sintéticos son los dendrímeros policatiónicos con núcleos de poliamidoamina (PAMAM),²⁵² polipropilenimina (PPI)²⁵³ o poli-L-lisina.²⁵⁴ A diferencia de los polímeros polidispersos, su estructura está bien controlada por el grado de ramificación y generación del dendrímero. Aunque sus propiedades no son necesariamente mejores que las que sus análogos poliméricos, su inherente monodispersidad se traduce en una mayor reproducibilidad de las formulaciones y los resultados. Pese al mayor coste sintético que lleva asociado, los beneficios asociados a la monodispersidad han justificado la comercialización de algunas de estas estructuras para su aplicación clínica (*Superfect* y *Polyfect*, Quigen, EE.UU.).

4.6. Ciclodextrinas en terapia génica

Desde un punto de vista molecular, disponer de una plataforma versátil sobre la cual ensamblar los elementos necesarios para elaborar vectores sintéticos que se comporten como virus artificiales puede resultar muy útil.

En este sentido, las ciclodextrinas (CDs) presentan características que les otorgan un puesto preferente en el desarrollo de nanopartículas multifuncionales. Con el fin de aprovechar este potencial, Davis y colaboradores han descrito una nueva clase de polímeros catiónicos que contienen CDs en su esqueleto.⁶ El propósito final de los autores era elaborar nanopartículas multifuncionales para transfección génica aprovechando la capacidad de inclusión molecular de las CDs pero, antes incluso de llegar a un estadio más avanzado, observaron ya que los complejos con polímeros conteniendo CDs eran sistemáticamente más eficaces y menos tóxicos que los análogos sin CDs.²⁵⁵ Un estudio exhaustivo de relación estructura-actividad ha permitido optimizar la formulación de estos polímeros (Figura 41).²⁵⁶

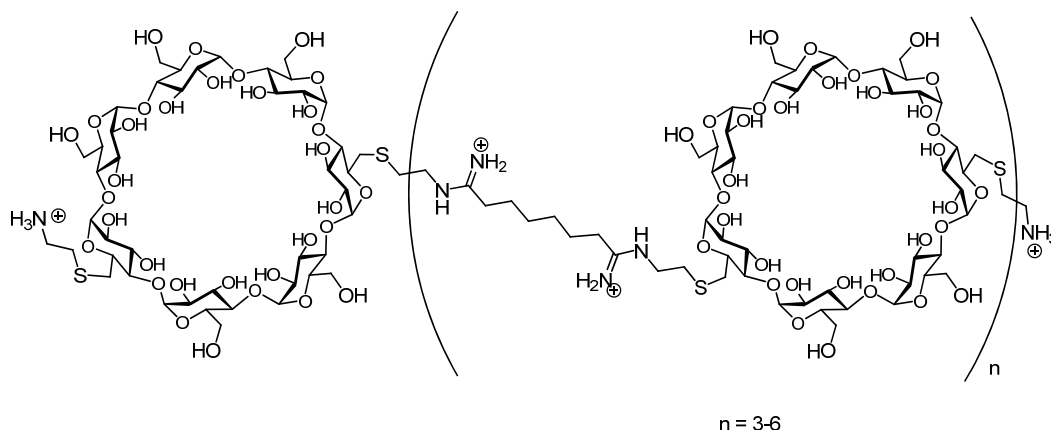


Figura 41. Estructura representativa de los polímeros policationicos derivados de CDs descritos por Davis y colaboradores.⁶

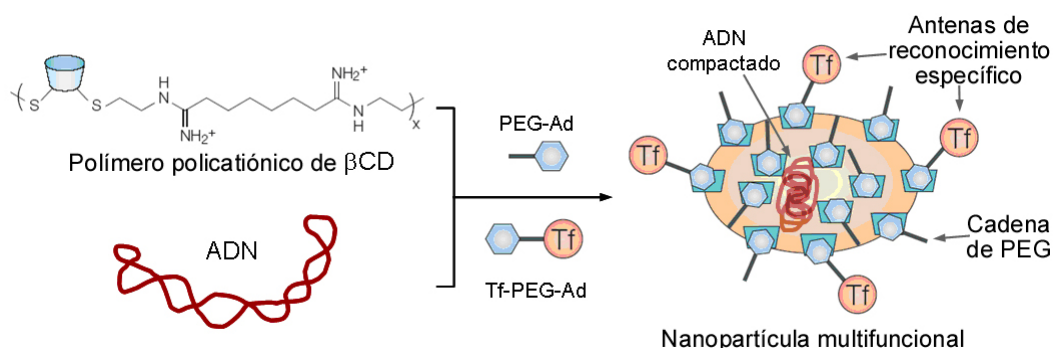


Figura 42. Representación esquemática de la elaboración de virus artificiales descrita por Pun y colaboradores.²⁵⁷

Los mismos autores han logrado introducir conjugados de transferina, uno ligando que es específicamente reconocido por algunas líneas celulares tumorales, en la superficie de las nanopartículas formadas entre el polímero y el ADN.²⁵⁷ La estrategia se basa en explotar la capacidad de inclusión de la cavidad de las CDs de la superficie de la nanopartícula, funcionalizándola de forma no covalente con un derivado de adamantano que presenta el motivo de reconocimiento en el extremo de un segmento de PEG suficientemente largo (Figura 42).²⁵⁸ Esta tecnología se ha adaptado al tratamiento de

tumores que no responden a otras terapias y, tras haber superado con éxito ensayos en animales,^{259,260} en la actualidad se encuentra en fase I de ensayos clínicos.²⁶¹

Otros autores también han explotado la derivatización de vectores policatiónicos con CDs para disminuir la toxicidad y mejorar la eficacia. Uekama y Arima han observado que la incorporación covalente y estadística de β CD a dendrímeros PAMAM contribuye a mejorar los niveles de transfección en diferentes líneas celulares de ADN²⁶² y ARN²⁶³ y reduce drásticamente la toxicidad asociada al núcleo dendrítico. Paralelamente, Yui y colaboradores han descrito una aproximación no covalente basada en la elaboración de rotaxanos. Ensartando unidades de γ CD con una cadena lineal de PEI han obtenido vectores con mucha menor toxicidad que la PEI por sí sola.²⁶⁴ Ooya²⁶⁵ y Li²⁶⁶ han descrito, independientemente, rotaxanos con diseños alternativos basados en CDs (α CD y β CD, respectivamente), funcionalizadas con grupos catiónicos y ensartadas por cadenas de PEG, con prometedoras propiedades como vectores de genes.

Simultáneamente al desarrollo de esta Tesis, los grupos de Reineke¹⁵⁸ y Yannakopoulou,²⁶⁷ conscientes de los inconvenientes asociados al empleo de vectores polidispersos, han desarrollado diferentes estrategias para sintetizar β CDs policatiónicas mediante la funcionalización de las posiciones primarias (Figura 43). Empleando la cicloadición 1,3-dipolar entre alquinos terminales y azidas, Reineke ha elaborado una pequeña familia de CDs policatiónicas (Figura 43A) con la que ha optimizado la capacidad de complejación y protección del pADN y su transfección a células HeLa y H9c2. Los mejores candidatos muestran eficacias similares a las obtenidas con jetPEI[™] y Superfect, dos de los vectores más empleados en la actualidad. Para potenciar la complejación CD:ADN, Yannakopoulou, por su parte, ha explotado la mayor afinidad que existe entre grupos guanidinio y fosfato (Figura 43B). Recientemente, una versión dendrítica de estas CDs policatiónicas monodispersas ha sido descrita por Marsura y colaboradores (Figura 43C).²⁶⁸

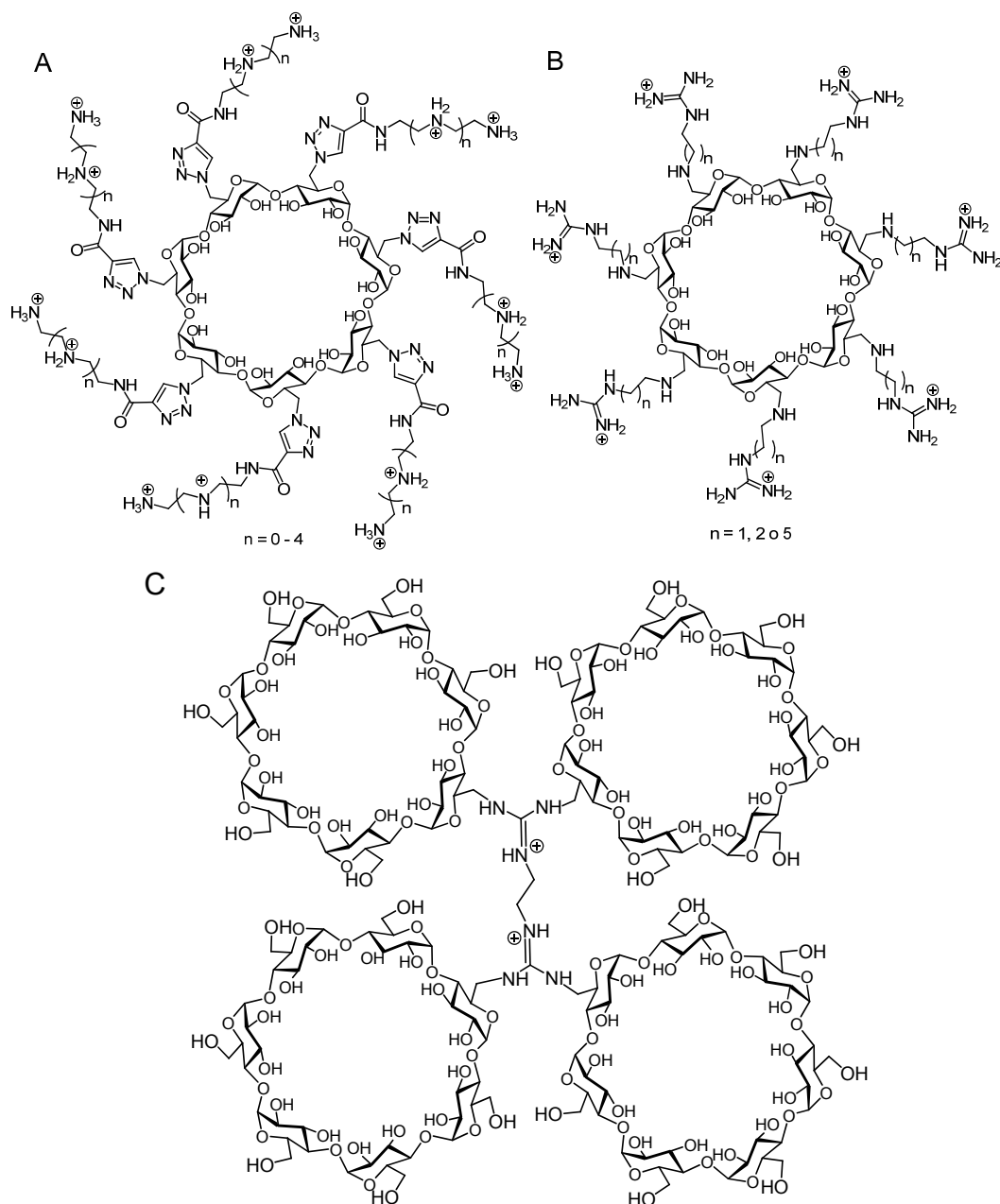


Figura 43. Ejemplos representativos de las CDs policatiónicas monodispersas descritas por Reineke (A),¹⁵⁸ Yannakopoulou (B)²⁶⁷ y Marsura (C).²⁶⁸

Aprovechando que la estructura de las CDs naturales presenta dos caras bien definidas y químicamente diferenciables, Darcy y Ravoo han desarrollado una metodología para preparar derivados anfifílicos con cadenas alquílicas sobre la corona primaria de la CD y grupos polares en la secundaria que presentan propiedades de autoorganización en medio acuoso.²⁶⁹ Estos derivados no son capaces de transfectar porque no complejan eficazmente ADN. Sin embargo, Darcy y O'Driscoll han observado que análogos catiónicos (Figura 44) lo hacen con una eficacia similar a DOTAP, uno de los lípidos catiónicos más empleados.^{270,271}

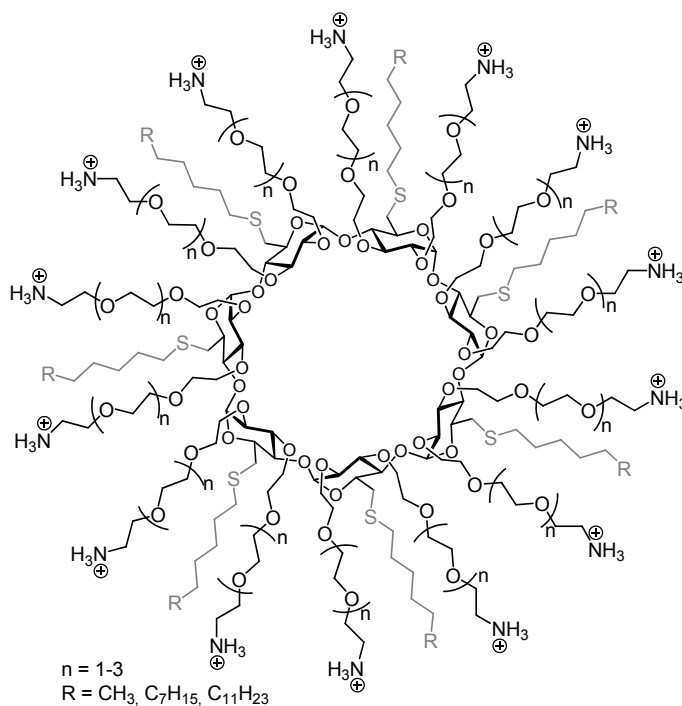


Figura 44. Estructura representativa de CDs anfifílicas descritas por McMahon y colaboradores.²⁷¹

Estos resultados ilustran el potencial de las CDs anfífilas como vectores de genes. Un inconveniente, sin embargo, es que las metodologías descritas para preparar estos compuestos no garantizan su homogeneidad.

En este sentido un objetivo primordial de esta Tesis ha sido el desarrollo de una metodología modular para la síntesis de derivados homogéneos de CDs anfífilas policatiónicas y estudiar, en base a su estructura, sus propiedades de complejación y transfección de material génico. Partiendo de la hipótesis de que las propiedades supramoleculares dependen de la estructura molecular del conjugado de CD, su capacidad de encapsulación y transporte podrían ser manipuladas químicamente, lo cual constituiría una poderosa herramienta para el diseño de nuevos vectores artificiales de genes para terapia génica. En el desarrollo del trabajo descrito a continuación, se ha contado con la colaboración del grupo del Prof. Pierre Vierling (CNRS – Univ. Niza, Francia), para la evaluación de la capacidad de complejación de pADN y transfección frente a diferentes líneas celulares y del Dr. Antonino Mazzaglia (ISMN (CNR) – Univ. di Messina, Italia), en la caracterización de los nanoagregados de CD.

4.7. Resultados y discusión

La naturaleza esencialmente polidispersa de los polímeros policatiónicos suele dificultar la extracción de conclusiones sobre la relación actividad-estructura con las que retroalimentar el diseño de nuevos vectores. Aunque hay casos excepcionales, como los polímeros basados en CDs descritos por Davis,²⁶¹ este es un problema con el que muchos diseños prometedores se han topado. Adicionalmente, incluso sistemas poliméricos que han dado prueba de su eficacia, pueden ver limitada su relevancia clínica debido a las estrictas exigencias legales a las que deben enfrentarse los materiales polidispersos para acceder a las fases de ensayos clínicos.^{49,151}

Simultáneamente al desarrollo de esta Tesis, diversos vectores molecularmente bien definidos basados en CDs^{158,267,268} han emergido como una alternativa prometedora. Estos sistemas monodispersos son susceptibles de ser modificados químicamente y su estructura puede modularse de forma sistemática. La idea subyacente tras esta aproximación general es el uso de CDs como estructuras macrocíclicas preorganizadas para obtener una disposición precisa de elementos funcionales.

Por otro lado, a pesar de no disponer de compuestos completamente homogéneos, McMahon²⁷¹ ha mostrado que las propiedades de autoorganización de los derivados anfífilos de CDs son superiores a las de los análogos no anfífilos. Un efecto similar ha sido observado por Sansone en la serie de los calixarenos.^{31,36,272}

En este contexto, nuestra estrategia para el diseño de sistemas de transfección se basa en que la incorporación de dominios policatiónicos e hidrófobos separados sobre el núcleo de la CD podría ser explotada para generar una anfifilia facial.²⁷³ La hipótesis de partida es que este carácter anfífilo dotaría al sistema de propiedades de autoensamblaje y aptitudes biomiméticas,²⁷⁴ favoreciendo la internalización a través de la membrana celular. Durante el desarrollo de esta Tesis, nuestro grupo de investigación ha demostrado la validez de esta hipótesis empleando una metodología de funcionalización facial selectiva. Así se han elaborado dos familias de CDs anfífilas policatiónicas

completamente homogéneas con patrones de funcionalización complementarios: de tipo “falda” y de tipo “medusa”, respectivamente (Figura 45).²⁷⁵

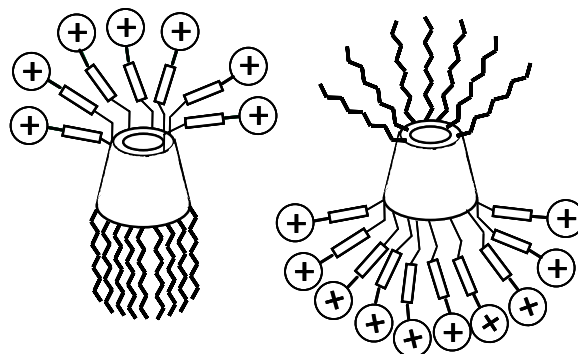


Figura 45. Representación esquemática de diseños alternativos de paCDs: tipo “falda” (izquierda) y tipo “medusa” (derecha).

Existen diferentes estrategias de funcionalización posibles para instalar los grupos catiónicos o las cadenas lipófilas en cada una de las caras de la CD. El trabajo que se presenta en esta Tesis se ha centrado en el uso de la reacción de formación de grupos tiourea. Simultáneamente, nuestro grupo de investigación (Tesis Doctoral de Alejandro Méndez Ardoy), en colaboración con el Prof. Francisco Santoyo González (Univ. Granada), ha explotado la química de formación de triazoles para acceder a derivados policationicos anfífilicos de tipo “falda” de la β CD (Figura 46a).²⁷⁶ Sus propiedades son significativamente superiores a los descritos por Reineke¹⁵⁸ en células HeLa.

La segunda familia, de tipo “medusa” (“CDs reversas”), se ha elaborado mediante un esquema de protección-desprotección de los hidroxilos de la corona primaria que permite la funcionalización de la cara secundaria. Estos compuestos presentan una disposición inversa de los elementos hidrófobos e hidrófilos (Figura 46b).²⁷⁷ Una estrategia muy similar ha sido descrita por Byrne y colaboradores recientemente.⁶³ En ambas familias, modificaciones sutiles de la estructura afectan drásticamente su capacidad de autoorganización y, consecuentemente, sus propiedades de vectorización de genes.

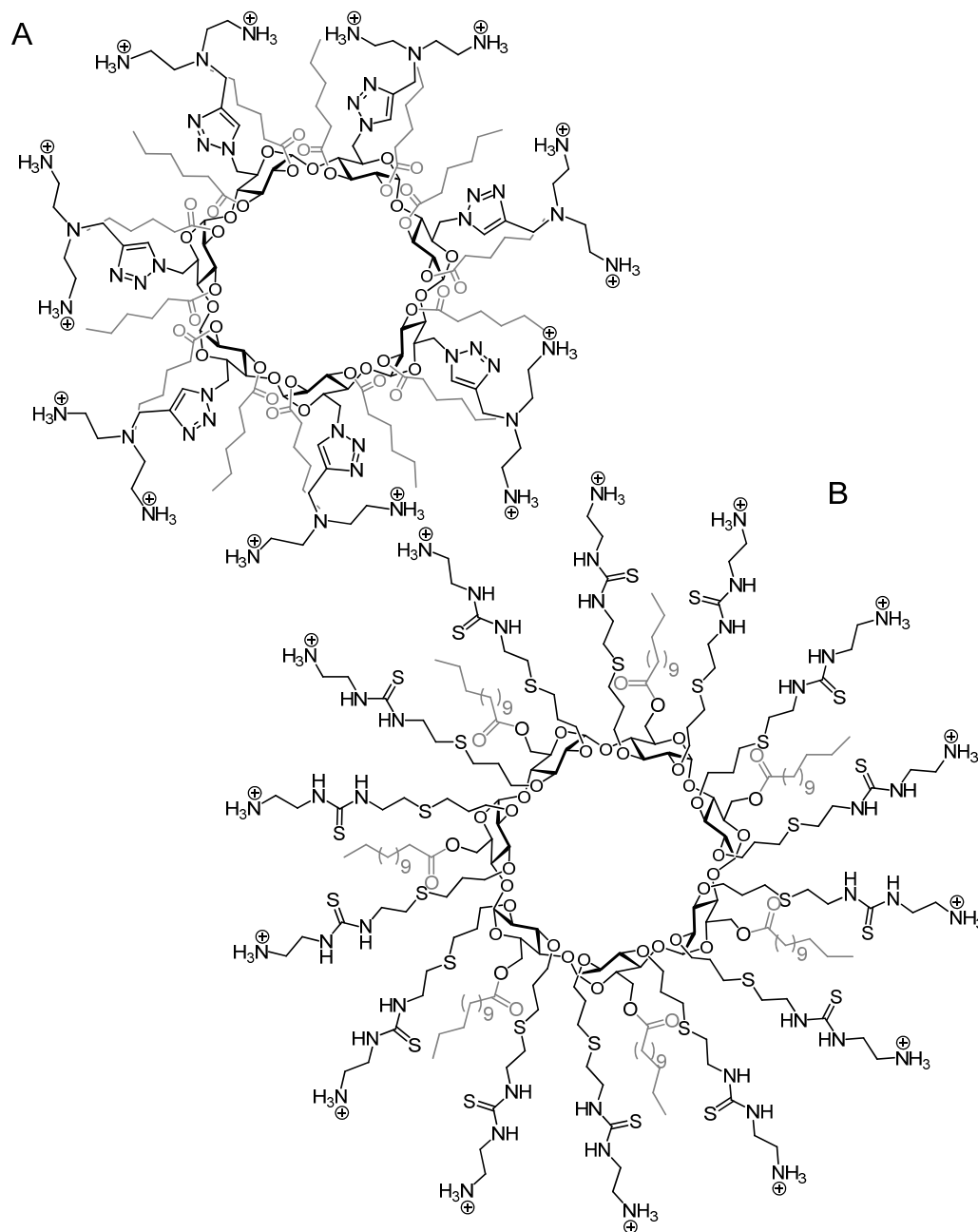


Figura 46. Estructuras representativas de CDs policationicas anfífilicas descritas en nuestro grupo de investigación.^{276,277}

En esta Tesis se ha iniciado la aplicación de este concepto para la preparación de una colección de ciclodextrinas policationicas, anfifílicas y monodispersas (*polycationic amphiphilic cyclodextrins*, paCDs) con capacidad de autoorganización en presencia de pADN para formar complejos estables de paCDs:pADN (CDplejos). Para lograrlo se ha desarrollado una estrategia sintética modular que permite la modificación sistemática de la densidad de carga, la longitud y naturaleza del espaciador y el balance hidrófilo-hidrófobo del conjunto con una alta eficiencia y manteniendo un coste sintético relativamente bajo. La influencia de las modificaciones estructurales se ha investigado, por un lado, en relación a las propiedades fisicoquímicas de los agregados en presencia y ausencia de plásmidos y, por otro, en relación a su eficacia de transfección frente a distintas líneas celulares (BNL-CL2 y COS7) en comparación con la de polímeros policationicos comerciales (bPEI, 25 kDa²⁷⁸ y JetPEI™ lineal, 22 kDa).^{234,279}

4.7.1 Criterios de diseño y síntesis

La construcción de CDs multifuncionales como las paCDs depende, de forma crítica, de la disponibilidad de métodos de derivatización eficientes y selectivos para ambas caras de la estructura. En principio, se pueden considerar los dos diseños de CDs anfifílicas (“falda” y “medusa”), dependiendo de la distribución de las cabezas catiónicas y las colas hidrófobas.²⁷⁵ La funcionalización de los hidroxilos secundarios para acceder a arquitecturas tipo “medusa” generalmente requiere proteger en primer lugar los hidroxilos primarios,^{63,277} más accesibles, lo que implica secuencias de reacción con ciclos de protección/desprotección. Por ello hemos considerado más adecuada la arquitectura de tipo “falda” para el propósito de este trabajo. Adicionalmente, dado que la manipulación selectiva de los hidroxilos de cada cara es una metodología común para los tres tipos de CDs disponibles comercialmente, la β CD, la más interesante desde el punto de vista industrial, ha sido la plataforma elegida.

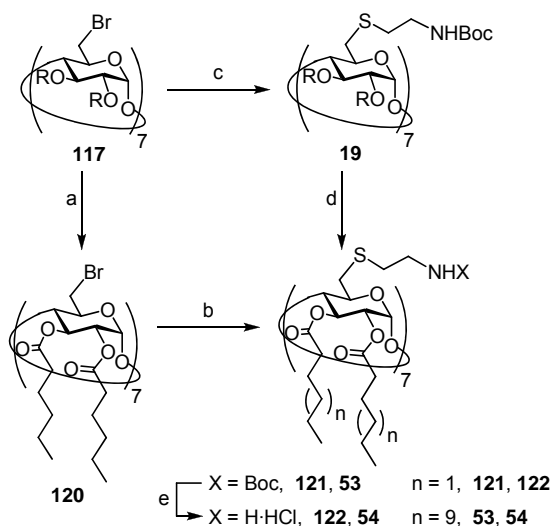
A pesar de que hay una amplia variedad de estrategias sintéticas para la manipulación homogénea y regioselectiva de los hidroxilos primarios (anillo estrecho),²³

la manipulación de los hidroxilos secundarios de la CD (anillo ancho) ha sido explorada con menor éxito.^{269,271,280} Se ha descrito que incluso las reacciones relativamente sencillas, como la acilación, no se completan, produciendo mezclas de productos de sobreacilación y acilación incompleta²⁸¹ que dificultan seriamente la purificación de los productos uniformemente sustituidos que preserven la simetría original. Este problema se ha conseguido resolver, en este caso, aplicando un método que utiliza el anhídrido de ácido y 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP) como agente acilante y catalizador, respectivamente, en lugar de los más habituales cloruro de ácido y piridina.

Estas condiciones, además de evitar las reacciones de sobreacilación, no afectan a grupos sensibles a la sustitución nucleófila y ha permitido explorar dos rutas sintéticas alternativas para acceder a la primera generación de CDs policatiónicas anfífilas, en función del orden de funcionalización de las caras del núcleo de CD (Esquema 16). A partir de la heptakis(6-bromo-6-desoxi)ciclomaltoheptaosa (**117**), obtenida en un solo paso desde la β CD comercial según el procedimiento descrito por Defaye,^{157,282} se ha investigado, en primer lugar, la acilación homogénea de la cara secundaria. La acilación de **117** con anhídrido hexanoico y DMAP en piridina, seguida de purificación en columna de gel de sílice, condujo al derivado tetradecahexanoilado **120**, cuya homogeneidad fue confirmada por RMN y EM-ESI, con un 72% de rendimiento. Cuando se emplea DMF como disolvente, sin embargo, la reacción es más lenta y es necesario emplear temperaturas superiores que producen reacciones secundarias asociadas a la sustitución nucleófila del haluro. La posterior funcionalización de la cara primaria mediante la sustitución nucleófila de los haluros con 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etanotiol se llevó a cabo en DMF en presencia de carbonato de cesio con buen rendimiento.

Alternativamente se ha investigado la estrategia contraria, consistente en llevar a cabo, en primer lugar, la funcionalización de la cara primaria de la CD para obtener el derivado **19** y, a continuación, la acilación de los hidroxilos secundarios. La sustitución de los siete átomos de bromo por 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etanotiol en presencia de carbonato de cesio transcurre con un rendimiento prácticamente cuantitativo sin necesidad de purificación mediante cromatografía en columna. En este caso, la posterior

acilación de los hidroxilos secundarios en presencia de DMAP se puede llevar a cabo sin problemas en DMF. De hecho, la reacción se ha efectuado tanto con anhídrido hexanóico (\rightarrow **121**, 76%) como con anhídrido mirístico (\rightarrow **53**, 67%), sin observarse, en estas condiciones, la formación de productos de sobreacilación por reacción del agente acilante con el nitrógeno carbámico. En ambos casos, la hidrólisis ácida de los grupos carbamato condujo de forma cuantitativa a **122** y **54**, primeros ejemplos de esta familia de paCDs (Esquema 16).

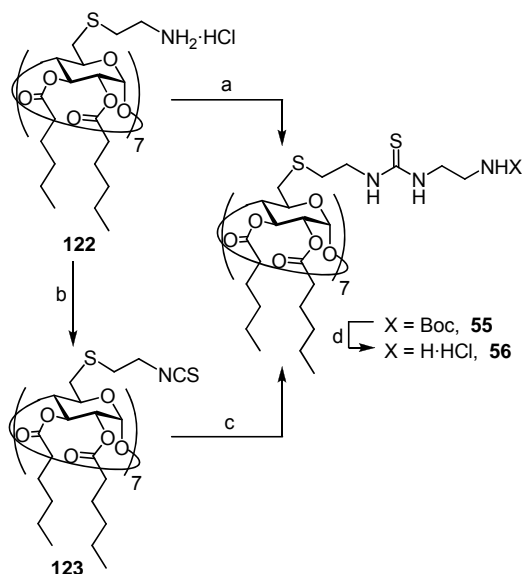


Esquema 16. Síntesis de **122** y **54**. Reactivos y condiciones: a) Anhídrido hexanóico, DMAP, Py, 16 h, 72%; b) BocHN(CH₂)₂SH, Cs₂CO₃, DMF, 60 °C, 48 h, 70%; c) BocHN(CH₂)₂SH, Cs₂CO₃, DMF, 60 °C, 48 h, 99%; d) Anhídrido hexanóico (n = 1) o mirístico (n = 9), DMAP, DMF, 70 °C, 48 h, 80 y 67%, respectivamente; e) i, 1:1 TFA-CH₂Cl₂, 2 h; ii, HCl, 99%.

Es destacable que cualquiera de las dos rutas permite acceder a los primeros derivados policatiónicos de CDs anfifílicas homogéneos en tan solo cuatro etapas desde la βCD comercial. Sin embargo, la opción más utilizada durante el desarrollo de esta Tesis ha sido la segunda (etapas c y d, Esquema 16), ya que requiere una única etapa de purificación en columna de gel de sílice.

La elección del segmento de 2-aminoetanotiol no es trivial. Resultados anteriores de nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que la nucleofilia de los grupos amino en derivados de β CD aumenta significativamente tras la inserción del espaciador etiltilio entre el átomo de nitrógeno y el núcleo de CD,²⁸ lo que debe favorecer las interacciones con los aniones fosfato en el esqueleto del pADN. La longitud de la cadena alifática, que influencia en balance hidrofilia/hidrofobia y, consiguientemente, las propiedades de autoensamblaje, también es un parámetro crítico.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, el derivado hexanoilado **122** fue elegido como arquitectura de partida para elaborar, mediante derivatización química, una colección de CDs anfífilas. Para este fin, se eligió de nuevo la reacción de acoplamiento entre aminas e isotiocianatos. Además de las virtudes comentadas en el capítulo anterior, los aductos resultantes incorporarán un conjunto de centros donadores de enlaces de hidrógeno apropiadamente localizado para interaccionar, cooperativamente con los grupos amino, con los aniones fosfato del plásmido. Es sabido que el reconocimiento de aniones y su unión en sistemas biológicos no se basan exclusivamente en la compensación de cargas sino que, frecuentemente, depende de la presencia de redes cooperativas de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas,²⁸³ hecho que es especialmente relevante en el caso de los grupos fosfato.²⁸⁴ De hecho se ha observado que oligosacáridos que incorporan tioureas como puentes intersacarídicos son capaces de complejar aniones fosfato incluso en medio acuoso.^{229,285}



Esquema 17. Síntesis de tioureido paCDs. Reactivos y condiciones: a) BocHN(CH₂)₂NCS (**114**), Et₃N, CH₂Cl₂, 16 h, 90%; b) Cl₂CS, CaCO₃, CH₂Cl₂-H₂O, 2.5 h, 64%; c) BocHN(CH₂)₂NH₂, Et₃N, CH₂Cl₂, 20 h, 85%; d) i, 1:1 TFA-CH₂Cl₂, 2 h; ii, HCl, 99%.

La ruta más directa para la formación de los grupos de enlace a fosfatos sobre el anillo primario de la CD es la adición nucleófila catalizada por base de la heptaamina **122** a aminoisotiocianatos adecuadamente funcionalizados.^{28,286} Como se muestra en el Esquema 17, el acoplamiento del 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil isotiocianato (**114**)²⁸⁷ a la estructura **122** conduce a la correspondiente politioureido CD protegida **55** con un 90% de rendimiento tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice. El compuesto **55** puede obtenerse también mediante una ruta alternativa que consiste en la isotiocianación de **122** con tiofosgeno (\rightarrow **123**) y posterior adición nucleófila de 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etilamina (85%).

A través de cualquiera de las dos rutas, la desprotección de los siete grupos aminos de **55**, catalizada por TFA, permitió obtener la poliaminotioureido CD anfífilica **56** con excelente rendimiento. La homogeneidad de la estructura se confirmó mediante RMN y EM-ESI (Figura 47).

Aunque la ruta alternativa no aporta ninguna ventaja en la síntesis de **56**, es interesante destacar que puede resultar muy útil para obtener derivados en los que el isotiocianato correspondiente sea susceptible de sufrir reacciones intramoleculares²⁸⁸ o para la preparación de tioureas *N,N',N'*-trisustituidas.

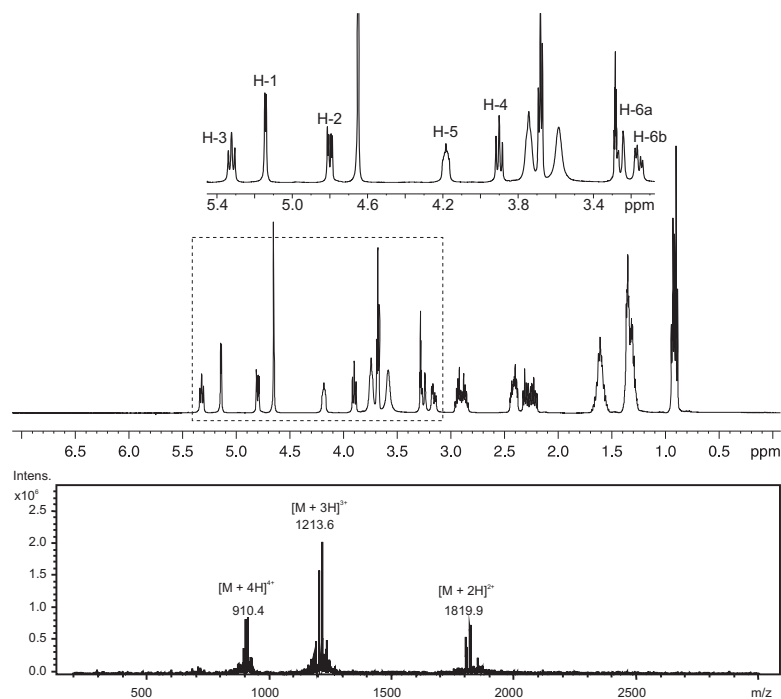


Figura 47. Espectros de ¹H RMN (500 MHz, MeOD) y EM-ESI de **56**.

Se ha elaborado una colección de compuestos homogéneos con el fin de investigar el efecto que variaciones sistemáticas en la estructura del núcleo de la CD anfífilica pudieran tener sobre sus propiedades de autoorganización. Para modificar parámetros estructurales como la distancia entre los motivos de unión a fosfatos (aminas y tioureas), su disposición relativa, la flexibilidad del espaciador y la ausencia o la presencia múltiple de cada uno de ellos, se seleccionaron una serie de aminas (**33**, **97** y **124-127**) e isotiocianatos (**30**, **32**, **114**, **118** y **119**) fácilmente asequibles (Figura 48). La mayoría de estos sintones son comerciales o se han preparado según la bibliografía,

exceptuando los compuestos **30**, **32** y **33** cuya preparación se describe en la parte experimental de esta Tesis (Apartado 8.3).

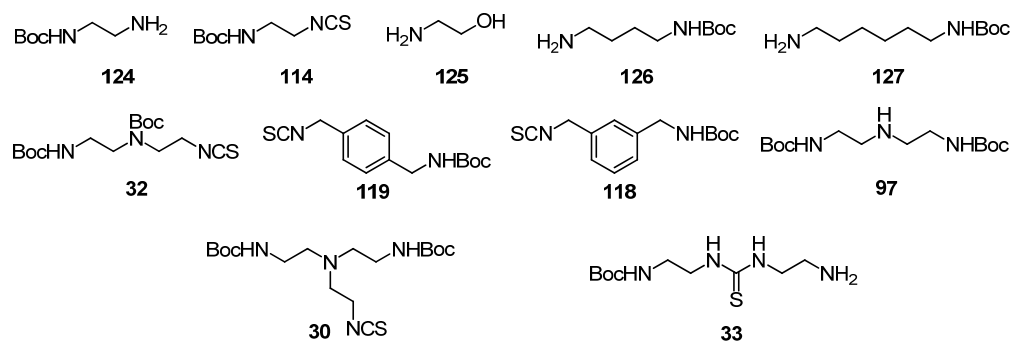
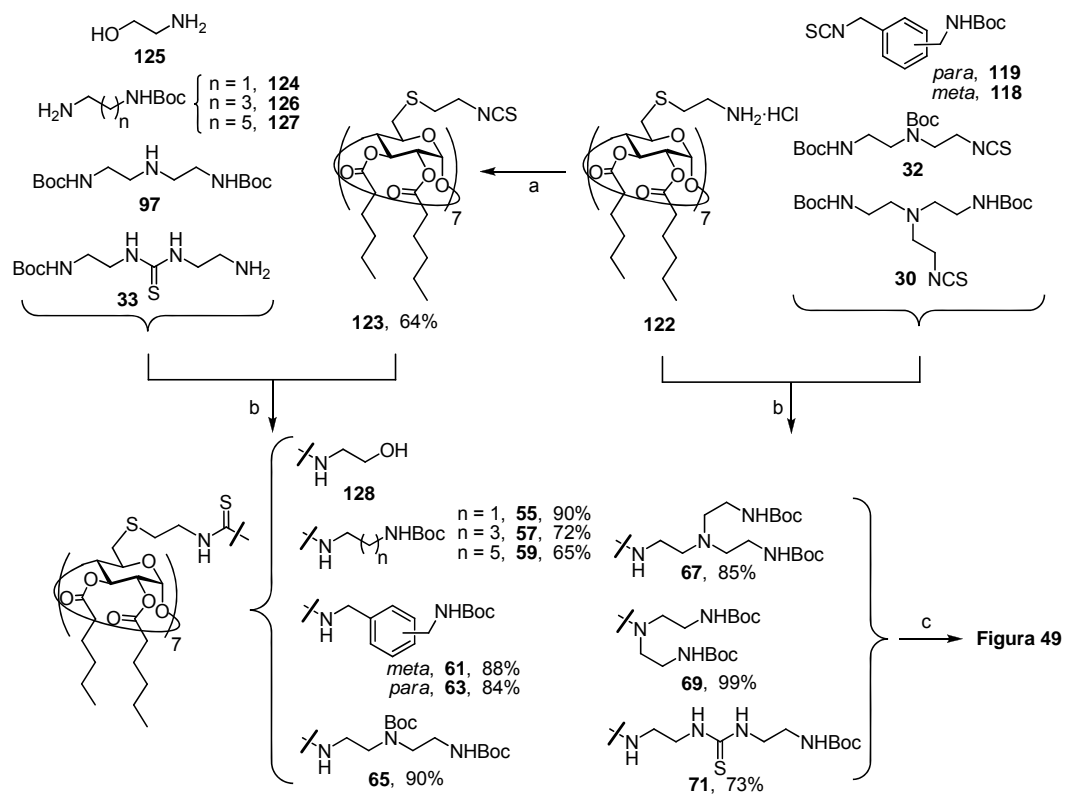


Figura 48. Derivados de aminas e isotiocyanatos utilizados para la construcción de la colección de paCDs.

Las poliaminotioureido CDs protegidas con Boc fueron sintetizadas en paralelo mediante la adición nucleófila en CH_2Cl_2 , catalizada por trietilamina, de los diisotiocyanatos o diaminas de la Figura 48 con la heptaamina o el heptaisotiocyanato derivados de CD (**122** o **123**, respectivamente) (Esquema 18). En todos los casos la reacción se completa en un tiempo relativamente corto (2 h), como se comprueba por c.c.f. y EM-ESI de la mezcla de reacción. No se observa la formación de productos de la autocondensación de los isotiocyanatos, típicamente asociada al uso de tiempos largos de reacción o temperaturas elevadas.²⁸⁸ Las purificaciones se pudieron realizar en todos los casos mediante una cromatografía en columna en gel de sílice con rendimientos finales del 64 al 99%, muy destacables para reacciones en las que tienen lugar siete adiciones. La hidrólisis de los grupos protectores carbamato, catalizada por TFA, condujo a las CDs anfífilas policatiónicas. Para facilitar el manejo y proporcionar una mayor estabilidad, los crudos se transformaron en sus respectivos clorhidratos mediante liofilización en una disolución de ácido clorhídrico diluido.



Esquema 18. Síntesis en paralelo de pACDs. Reactivos y condiciones: a) Cl_2CS , CaCO_3 , CH_2Cl_2 - H_2O , 2.5 h; b) Et_3N , CH_2Cl_2 , 16 h; c) i, 1:1 $\text{TFA-CH}_2\text{Cl}_2$, 2 h; ii, HCl , 99%.

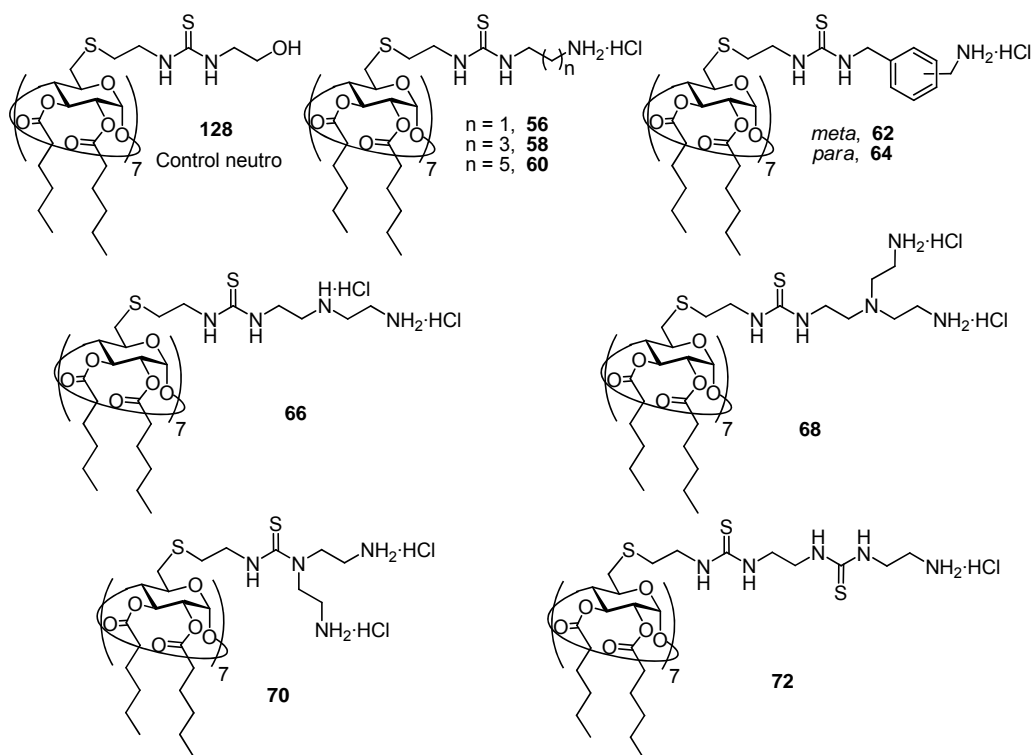


Figura 49. Miembros de la colección de politioureido CDs anfifílicas.

Los espectros de RMN y EM-ESI, así como el análisis elemental, demostraron inequívocamente la estructura y la homogeneidad de cada compuesto de la colección. Por ejemplo, la Figura 50 muestra los espectros de ^1H -RMN y EM-ESI de la CD tetradecacatiónica **70**, observándose un único sistema de spin, típico de una molécula con simetría axial, y los picos de los iones moleculares con carga dos (m/z 1970), tres (m/z 1314) y cuatro (m/z 986), respectivamente.

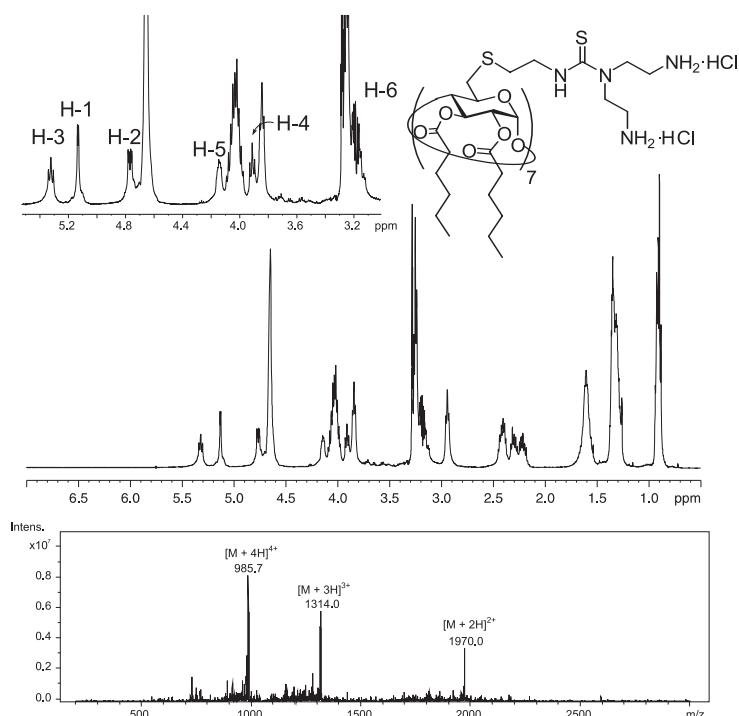


Figura 50. Espectros de ^1H RMN (500 MHz, 313 K, MeOD, arriba) y EM-ESI (abajo) de **70**.

4.7.2. Complejación de pADN y caracterización de los CDplejos

Las CDs anfílicas policationicas sintetizadas en este capítulo constituyen una serie estructuralmente diversa de conjugados homogéneos muy adecuada para el estudio de la relación entre estructura molecular y propiedades de autoorganización en ausencia y presencia de material génico. En esta colección se ha incluido el derivado anfílico neutro **128** como compuesto de control para evaluar la contribución relativa de los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas en la complejación del pADN. Adicionalmente, se han incluido en los estudios los compuestos **113** y **24** (descrito en el capítulo anterior), desprovistos de las cadenas de ácidos grasos en la cara secundaria de la plataforma de βCD , como compuestos de control no anfílicos con el fin de estimar la importancia de este factor en el proceso de autoorganización.

En colaboración con el Dr. Antonino Mazzaglia (ISMN, CNR — Univ. di Messina, Italia) se han realizado experimentos que han demostrado la capacidad de autoensamblaje de las paCDs. Se ha observado que los miembros de esta colección, presentan concentraciones micelares críticas (CMC) muy bajas ($< 0.1 \mu\text{M}$) y dan lugar a agregados positivamente cargados tanto en disolución salina (NaCl 1 mM) como en medio tamponado (tampón fosfato 1 mM, pH 7). El tamaño de estos agregados, determinado mediante Dispersión Dinámica de la Luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS), está en el rango de 80 a 140 nm (diámetro hidrodinámico) y su carga superficial (potencial ζ) entre + 42 y + 65 mV en medio salino y + 19 y + 29 mV en tampón fosfato. Sin embargo estas nanopartículas resultan inestables y tienden a agregarse en otras mayores a pH neutro.

Curiosamente, a pesar de que las paCDs preparadas en este estudio tienden a formar agregados irregulares en medio acuoso, en presencia de ADN se observó un efecto plantilla que condujo a nanopartículas compactas, ordenadas y más estables. El tetradecamiristoato **54** y el derivado neutro **128**, que no se dispersan en medio acuoso, son las únicas excepciones. Estos resultados preliminares confirmaron que la presencia del conjunto policatiónico y un balance hidrófilo/hidrófobo adecuados son características cruciales para controlar el autoensamblaje y establecer interacciones efectivas con el pADN que lleven a su compactación.

Para corroborar esta observación se han llevado a cabo experimentos de electroforesis en gel de agarosa con diferentes formulaciones de los complejos paCD:pADN en tampón HEPES. La preparación de estos complejos se llevó a cabo mezclando distintas proporciones de pADN y paCD, calculadas en base a la relación N/P (número de grupos amonio catiónicos del vector frente al número de grupos fosfato aniónico del plásmido). En estos experimentos se han utilizado relaciones N/P de 5, 7, 10 y 30, lo que quiere decir que se han añadido a la formulación 5, 7, 10 o 30 grupos protonables por cada grupo fosfato del pADN utilizado. Con el fin de evitar fenómenos de autoagregación entre los derivados de CDs, sus disoluciones madre se prepararon en DMSO y, más tarde, se diluyeron en la disolución del pADN con tampón HEPES (20 mM, pH 7.4). El contenido

final en DMSO nunca excedió el 1% v:v. La paCD con catorce cadenas de hexanoilo en la cara secundaria (**122**) condensó el plásmido formando CDplejos nanométricos adecuados para el transporte de genes mientras que el análogo miristoilado (**54**) no los formó debido, probablemente, a su rápida e irreversible agregación en medio acuoso.

En un experimento preliminar, empleando nanopartículas formuladas a partir de la paCD **122** y un plásmido que codifica la luciferasa (pTG11236), se ha podido comprobar que el pADN queda completamente protegido de la degradación y aislado del medio para relaciones N/P superiores a 5. El revelado del gel utilizando bromuro de etidio, un agente intercalante que produce una señal luminiscente en presencia de ADN, muestra el cambio de desplazamiento de la banda control (pADN libre) y la ausencia de fluorescencia en las líneas correspondientes a los complejos (Figura 51, izquierda). La integridad del plásmido no se afecta por el proceso de complejación, como demuestra el hecho de que pueda ser recuperado intacto induciendo la disociación del complejo con dodecilsulfato sódico (SDS) (Figura 51, derecha).

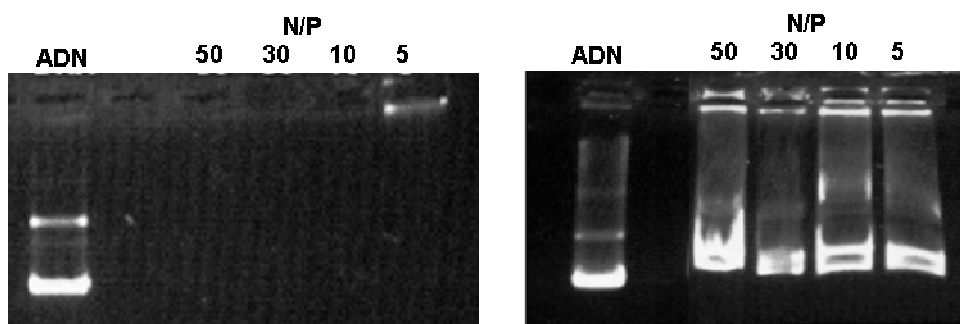


Figura 51. Electroforesis en gel de agarosa de **122**:pADN mostrando la complejación del plásmido (izquierda) y la disociación del complejo inducida por SDS (derecha). Se utilizó pADN libre como referencia.

La capacidad de otros miembros de la colección de paCDs para formar CDplejos estables con pADN se determinó por un procedimiento similar. Se analizaron diferentes formulaciones con relaciones N/P entre 5 y 30 mediante electroforesis en gel de agarosa, tiñendo alternativamente con bromuro de etidio, para detectar ADN libre, y azul de

bromofenol, para detectar los grupos amino de la superficie de las nanopartículas. En la Figura 52 se puede comprobar la ausencia de plásmido libre en todas las formulaciones, incluso en las que emplean CDs no anfifílicas (**24** y **113**). Sin embargo solo los complejos formulados con paCDs (**56**, **68** y **70**) protegen el plásmido frente a agentes intercalantes como el bromuro de etidio. La poliamino CD **113** no es capaz de proteger al plásmido ni siquiera para relaciones N/P superiores a 30. El hecho de que la poliaminotioureido CD **24** sí consiga proteger el pADN frente a la inclusión del agente intercalante a relaciones N/P superiores a 10 pone de manifiesto la mayor eficacia de la interacción de los segmentos de aminotiurea con el esqueleto aniónico del plásmido.

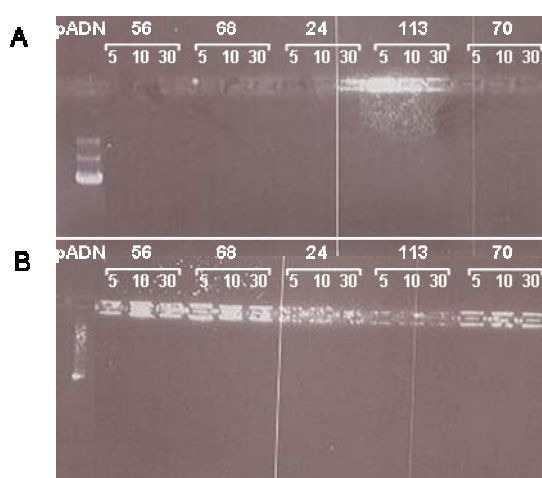


Figura 52. Experimentos de electroforesis en gel de agarosa revelados con bromuro de etidio (A) y azul de bromofenol (B) con paCDs **56**, **68**, **24**, **113** y **70** a diferentes relaciones N/P (5, 10 y 30).

La acilación de la cara secundaria facilita, por tanto, la protección del material génico, que no es accesible al bromuro de etidio a ninguna de las relaciones N/P estudiadas, probablemente debido a una compactación más eficaz de las nanopartículas. El revelado con azul de bromofenol, un reactivo sensible a la presencia de grupos amino, muestra una única banda que se corresponde con la asignada a los CDplejos (Figura 52).

De todos modos, dado que esta banda no migra en las condiciones experimentales, no se puede descartar que para formulaciones con valores elevados de relación N/P coexistan en esta banda los CDplejos con agregados sin pADN formados por un exceso de paCDs.

El diámetro hidrodinámico y el potencial ζ de las nanopartículas CDs:pADN se determinó por DLS para diferentes N/P. Aunque todas las CDs policationicas mostraron capacidad de complejación, los resultados de DLS confirmaron que los derivados no anfífilicos **113** y **24** no llegan a formar nanopartículas bien definidas, lo que está de acuerdo con la necesidad de la existencia de una estructura anfífilica que promueva el proceso de compactación (Figura 53). Este resultado contrasta con los descritos por Reineke,¹⁵⁸ cuyos vectores catiónicos basados en CDs forman complejos cargados positivamente ($+5 < \zeta < +15$ mV) con tamaños entre 80 y 120 nm incluso a relaciones N/P relativamente bajas (5). En nuestro caso, los CDplejos no anfífilicos **113**:pADN y **24**:pADN mostraron valores de potencial ζ cercanos a la neutralidad, incluso para relaciones N/P superiores (10), lo que es consistente con una baja capacidad de compactación del pADN.

Por su parte, los valores de potencial ζ mostrados por las formulaciones basadas en paCDs sí resultan positivos ($+20 < \zeta < +50$ mV). Las medidas para N/P 10 son sensiblemente más altas que para N/P 5. Sin embargo, relaciones N/P superiores no hacen aumentar este valor: el potencial ζ medido para N/P 30 no es significativamente distinto que para N/P 10. Estos resultados sugieren una estequiometría ideal para los complejos paCD:pADN que se encuentra próxima a una relación N/P de 10 y, a partir de la cual, el exceso de paCD no se incorpora a la estructura de la nanopartícula.

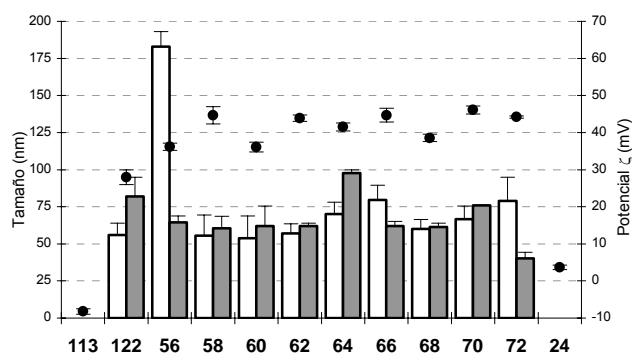


Figura 53. Diámetro hidrodinámico (barras, nm) y ζ (●, mV) de los CDplejos, determinados por análisis de DLS y M3-PALS, respectivamente. Las barras huecas corresponden al tamaño de las nanopartículas a N/P 5 y las rellenas a N/P 10, mientras que los puntos representan ζ a N/P 10.

Exceptuando el caso del complejo **56**:pADN con N/P 5, todos los CDplejos preparados con paCDs mostraron diámetros hidrodinámicos bastante pequeños, alrededor de los a 75 nm, comparados con los poliplejos de polietilenimina ramificada (bPEI, 25 kDa), uno de los sistemas de transporte de genes comercialmente disponibles más eficaces (> 100 nm).^{234,279} Además, se observó una baja polidispersidad del tamaño de las nanopartículas catiónicas en cada experimento individual. Estas características, pequeño tamaño y baja monodispersidad, resultan muy interesantes ya que solo han sido descritas para procesos de condensación monomolecular que ocurren al mezclar pADN con los detergentes policatiónicos dimerizables descritos por Zuber,^{230,289} aunque no hay evidencias de que sea lo que ocurre en este caso. El hecho de formarse partículas más pequeñas que las que se forman con vectores poliméricos clásicos como la PEI puede indicar que la interacción paCD:pADN no depende exclusivamente de fuerzas electrostáticas, sino que debe estar reforzada por interacciones por enlace de hidrógeno y fuerzas hidrófobas. Esta hipótesis está fundamentada en la observación de la pobre compactación que proporcionan **113** y **24**. Los resultados sugieren que la complejación de plásmidos por paCDs es un proceso en dos etapas, similar al descrito para los lípidos catiónicos:²⁹⁰ una primera etapa, dirigida por interacciones básicamente electrostáticas,

que implica la organización de las moléculas de paCD alrededor de la cadena oligonucleotídica, y una segunda consistente en la compactación de la estructura inducida por la proximidad de la capa hidrófoba formada en torno al plásmido. El primero debe ser un proceso rápido y reversible, mientras que el segundo sería más lento y esencialmente irreversible.

El pequeño tamaño y la distribución homogénea de las formulaciones de CDplejos se confirmó mediante Espectroscopía de Transmisión Electrónica (TEM) (Figura 54).²⁹¹ Con un aumento mayor se puede observar una ultraestructura enrollada tipo “caracol”. Estas estructuras se forman, posiblemente, al alternar agrupaciones laminares de paCDs y zonas de alta densidad electrónica correspondientes a la molécula de ADN, algo similar a la estructura tipo “cebolla” observada en complejos multimoleculares de RNAi-lípidos catiónicos.²²²

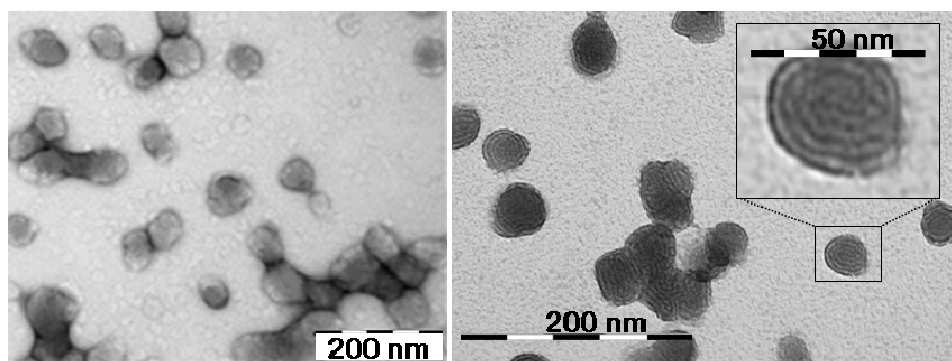


Figura 54. Imagen de Espectroscopía de Transmisión Electrónica (TEM) de los CDplejos 56:pADN (izquierda) y 70:pADN (derecha).

En base a las dimensiones moleculares de las paCDs, se puede estimar el grosor de una doble capa de paCDs alrededor de la cadena de ADN en torno a $\sim 2.5\text{-}3.0$ nm. Por su parte, el plásmido puede considerarse como un cilindro con unas dimensiones aproximadas de 2.4 nm de diámetro y 3.4 nm de longitud cada 10 pares de bases.^{292,293} Con estos datos se podría hacer una estimación de tamaño teórico de un CDplejo esférico

con una única molécula de pADN (5739 pb) entre 40-45 nm. Este cálculo concuerda con la medida realizada por TEM (Figura 54). La discrepancia de tamaños obtenidos por TEM y DLS, siempre superiores con la segunda técnica, es atribuible a la capa de solvatación que acompaña a las partículas en su movimiento a través del medio acuoso.

El pequeño tamaño y homogeneidad de los CDplejos son muy adecuados a las necesidades descritas para las aplicaciones sistémicas *in vivo*,²⁹⁴ en las que la difusión a través del epitelio y las membranas impone restricciones de tamaño muy importantes. De cara a posibles aplicaciones en medio fisiológico, se ha investigado el efecto del suero o de un medio salino en el tamaño y estabilidad de los CDplejos. Dado que la interacción que conduce a la formación de los CDplejos tiene un origen básicamente electrostático, es de esperar que sus propiedades puedan verse afectadas por variaciones en la fuerza iónica del medio. Este fenómeno se ha investigado en lipoplejos y poliplexos y es el origen de la desestabilización de muchos de ellos al utilizarlos en medio fisiológico. En nuestro caso se observó un aumento de diámetro hidrodinámico desde aproximadamente 70-80 nm hasta 130-220 nm cuando los complejos **56**:pADN o **70**:pADN con N/P 10 se incubaron en un medio con 10% de suero. El aumento de tamaño fue más pronunciado cuando los CDplejos se expusieron a concentraciones crecientes de NaCl, que imitan el estrés salino de un medio biológico. Mientras que los complejos formados con la paCD heptacatiónica **56** no toleran bien concentraciones salinas superiores a 50 mM (la concentración fisiológica está en torno a 150 mM), los formulados con **70** muestran un aumento del tamaño mucho más moderado. Este resultado pone de manifiesto la mayor eficacia en la complejación de pADN por derivados con mayor densidad de carga (Figura 55). En cualquier caso, el pADN permaneció complejado y completamente protegido en estas condiciones, lo cual es significativamente distinto a lo descrito para sistemas no anfífilos, que tienden a disgregarse más fácilmente.²⁹⁵

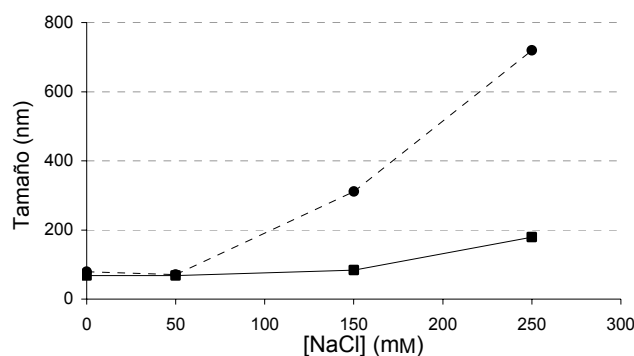


Figura 55. Variación del diámetro hidrodinámico inducida por medio salino en los complejos **56:pADN** (línea punteada) y **70:pADN** (línea continua) con N/P 7.

4.7.3. Transporte de pADN y transfección

La eficacia de transfección de los complejos paCDs:pADN se evaluó utilizando un gen codificador de luciferasa (pTG11236, pCMV-SV40-luciferase-SV40pA) en células BNL-CL2, COS-7 y KB. Las luciferasas son una familia de proteínas capaces de catalizar la reacción de oxidación de luciferinas (Figura 56), proceso en el que se produce luz (bioluminiscencia) que puede ser cuantificada por diferentes métodos. La eficacia de transfección sobre un conjunto de células se puede determinar midiendo la cantidad de luz producida al añadir el sustrato de la enzima luciferasa que codifica el gen utilizado en el ensayo. Dicha medida puede relacionarse directamente con la cantidad de proteínas presentes en las células y esta con la cantidad de pADN que ha conseguido acceder de forma satisfactoria al núcleo de las células. Paralelamente, en estos ensayos se determinó también la viabilidad celular del proceso, que refleja los cambios metabólicos de las células al ser sometidas a la transfección. Este parámetro se calcula en base a la relación entre la cantidad de proteínas producidas por las células del ensayo con respecto a células control cultivadas en las mismas condiciones que no han sido tratadas con el sistema de transfección.

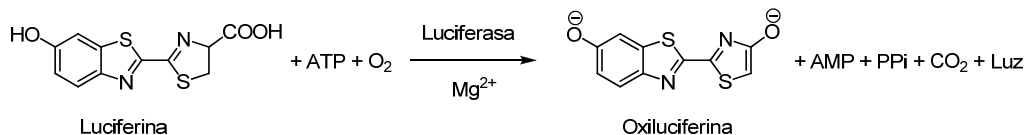


Figura 56. Reacción bioluminiscente catalizada por luciferasa.

Las condiciones operativas se optimizaron previamente para CDplejos formulados con **122** y **56** en células BNL-CL2. Con fines comparativos se utilizaron PEI ramificada (bPEI, 25 kDa) o JetPEI™ lineal (22 kDa) y pADN libre, como controles positivos y negativo respectivamente. La mayor eficacia de transfección se obtuvo para relaciones N/P de 10 y 5 respectivamente. Relaciones N/P mayores no solo no mejoran la eficacia de transfección sino que, además, inducen una mayor toxicidad, posiblemente debido a la formación de agregados de paCDs desprovistos de pADN. Los CDplejos formados por los análogos policationicos no anfifílicos **113** y **24** mostraron una capacidad de transfección celular insignificantes, incluso menores que los pADN por sí solos (Figura 57), en claro contraste con los resultados descritos para CDs policationicas monodispersas no anfifílicas.¹⁵⁸ Probablemente esto sea debido a la pobre capacidad de condensación y protección del pADN de estos derivados no anfifílicos de CDs, unido a su baja capacidad para unirse a la membrana celular. Se sabe que las propiedades fusogénicas de los lipoplejos juegan un papel decisivo en su interacción con membranas celulares, favoreciendo la internalización celular y el escape de los endosomas del complejo, desestabilizando las membranas biológicas formadas por lípidos aniónicos.²⁹⁶

Los estudios de relación estructura-actividad pusieron de manifiesto la superioridad de las poliaminotioureas anfifílicas con respecto a los derivados de poliamino CDs como sistemas de transfección. Así, para N/P 5, los CDplejos formados por **56** resultaron ser unas 100 veces más eficaces que los formados por **122** (Figura 57A). El hecho de que una mejora de dichas características en el transporte y expresión de genes pueda conseguirse insertando un elemento de reconocimiento que opere a nivel atómico es destacable. Estos resultados ilustran la relevancia del diseño molecular en las propiedades supramoleculares. Por otro lado, el comportamiento de **56** a N/P 5 es

equiparable al mostrado por la PEI ramificada en sus condiciones óptimas (N/P 10), pero presentando un perfil mucho menos tóxico que el polímero policationico comercial (Figura 57B).

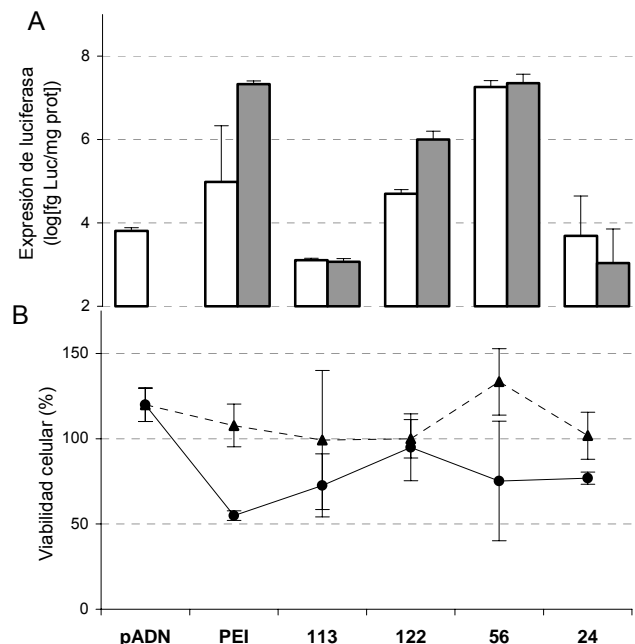


Figura 57. Eficacia de transfección (A) y viabilidad celular (B) en células BNL-CL2 de los CDplejos formados con **122**, **56** y los controles no anfífilicos **113** y **24** en comparación con el pADN libre y poliplejos de bPEI con N/P 5 (barras huecas y ▲) y 10 (barras sólidas y ●).

Para evaluar el efecto de diferentes espaciadores entre el grupo tiourea y los centros catiónicos se ha comparado el nivel de transfección y viabilidad celular de los CDplejos formados con **56**, **58**, **60**, **62** y **64**. De los datos de la Figura 58 se deduce que la expresión de luciferasa disminuye cuando aumenta la distancia entre los grupos amino y tiourea. Para valores de N/P 5 se observó que la eficacia de transfección disminuye 2 órdenes de magnitud para **60** en comparación con **56**. Sin embargo, para N/P 10 la disminución no es tan importante, aunque todavía está en torno a un orden de magnitud.

Esta observación pone de manifiesto el efecto beneficioso que tiene una adecuada disposición de los elementos de reconocimiento de fosfatos en las ramificaciones individuales sobre la eficacia de transfección de los correspondientes agregados supramoleculares. En el caso de los compuestos con anillos aromáticos como espaciadores (**62** y **64**) la acción simultánea de los grupos tiourea y amino sobre los fosfatos está probablemente impedida. En las mismas condiciones, la expresión de luciferasa para los correspondientes CDplejos disminuye hasta 500 veces en comparación con la de los CDplejos de **56**. Además, la incorporación de los anillos aromáticos, conduce a un aumento drástico de la toxicidad de los CDplejos (Figura 58B).

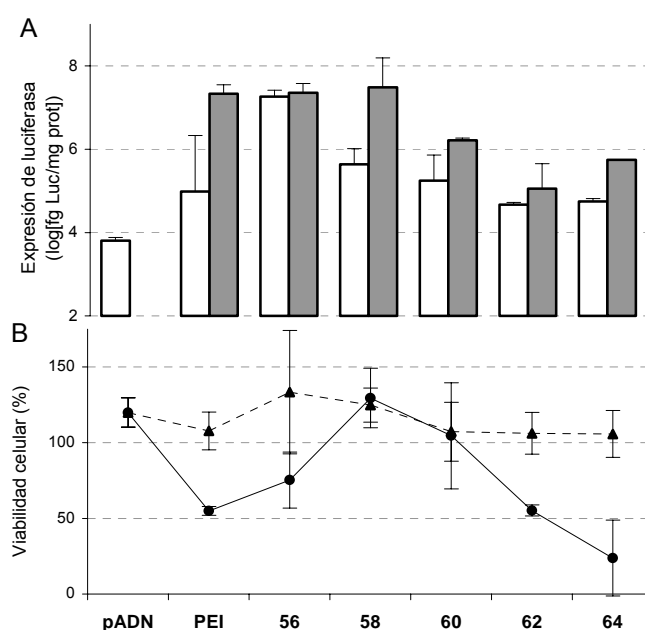


Figura 58. Eficacia de transfección (A) y viabilidad celular (B) en células BNL-CL2 de los CDplejos formados con paCDs heptacatiónicas **56**, **58**, **60**, **62** y **64** frente al pADN libre y poliplejos de bPEI con N/P 5 (barras huecas y ▲) y 10 (barras sólidas y ●).

Los resultados anteriores permiten identificar al segmento de aminoetiltiourea como el elemento estructural óptimo para facilitar el transporte y expresión de genes

mediados por CDplejos. Resultados anteriores en nuestro grupo de investigación ya habían puesto de manifiesto la idoneidad de este motivo de reconocimiento, capaz de coordinar eficazmente grupos fosfato.²²⁹

Manteniendo fijo este motivo estructural, se ha explorado el efecto del número y disposición de grupos amino y tiourea sobre la corona primaria de la β CD. Al contrario de lo que cabría pensar, los compuestos con varios de estos grupos en disposición lineal (**66** y **72**) presentaron una menor capacidad de transfección que la heptaaminotiourea **56** en células BNL-CL2, lo que contrasta con trabajos que proponen una interacción con oligonucleótidos favorecida por valencias superiores tanto para oligoetileniminas¹⁵⁸ como para oligotioureas.²²⁸ Es conveniente mencionar que el cálculo de la relación N/P tiene en cuenta el número total de grupos protonables del vector. Consecuentemente, para alcanzar una misma relación N/P, CDplejos formulados con **66** contendrían la mitad de moléculas de paCD que las nanopartículas formuladas con **56**.

El incremento del número de grupos amino protonables en una disposición dendrítica sí representó una mejora significativa de las propiedades del vector. En el caso del compuesto **68**, aunque la Figura 59 muestre un comportamiento similar al de **56**, el hecho de que la estructura del primero contenga 21 grupos protonables por molécula (frente a 7 en **56**) implica que solo es necesario 1/3 de la cantidad de paCD para conseguir la misma eficacia en términos molares. La mejor disposición tridimensional fue la presentada por **70**. A pesar de la falta de uno de los centros donadores de enlace de hidrógeno en la tiourea, los complejos **70**:pADN formulados con N/P 5 o 10 condujeron a una producción de luciferasa 10 veces superior a la correspondiente a los de **56**:pADN. Esto significa también un orden de magnitud más eficaz que los poliplejos de bPEI para su relación N/P óptima, con una menor toxicidad (Figura 59). La expresión del gen que codifica la luciferasa conseguida con los complejos **70**:pADN de relación N/P 5 es hasta tres órdenes de magnitud superior a la de los poliplejos de bPEI con N/P 5, con excelentes valores de viabilidad celular.

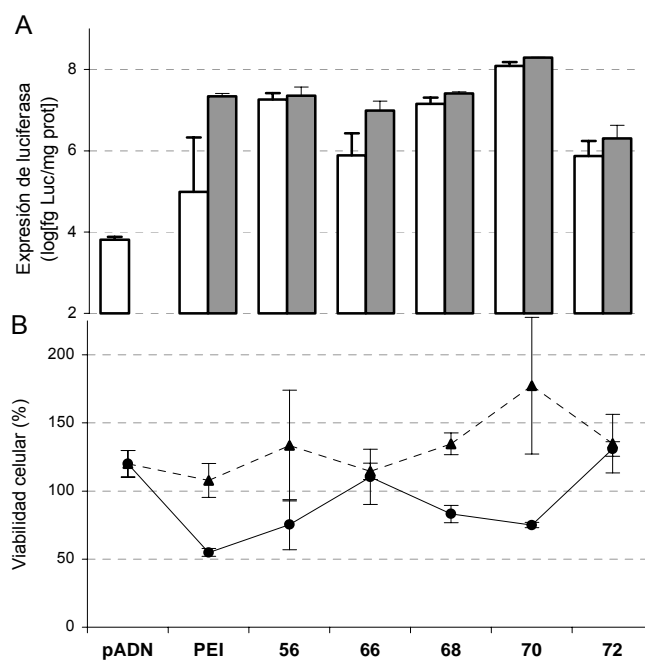


Figura 59. Eficacia de transfección (A) y viabilidad celular (B) en células BNL-CL2 de los CDplejos formados por poliaminotioureido-CDs anfífilas **56**, **66**, **68**, **70** y **72** frente al pADN libre y poliplejos de bPEI con N/P 5 (barras huecas y ▲) y 10 (barras sólidas y ●).

Los experimentos realizados en otras líneas celulares (COS-7 y KB) indican que los CDplejos basados en paCDs se comportan como sistemas de transporte de genes de amplio espectro, con perfiles de transfección dependiente de la estructura que son paralelos en las diferentes líneas (Figura 60). Al igual que en BNL-CL2, el aumento del número de motivos de reconocimiento de fosfatos de forma dendrítica, conduce a un aumento de la expresión del gen de hasta dos órdenes de magnitud en las células COS-7 cuando se comparan **56** y **70** (Figura 60). Para N/P 10, la eficacia de transfección de los CDplejos de **70** fue similar a la observada para los poliplejos de JetPEI™, pero con un compuesto que es completamente homogéneo.

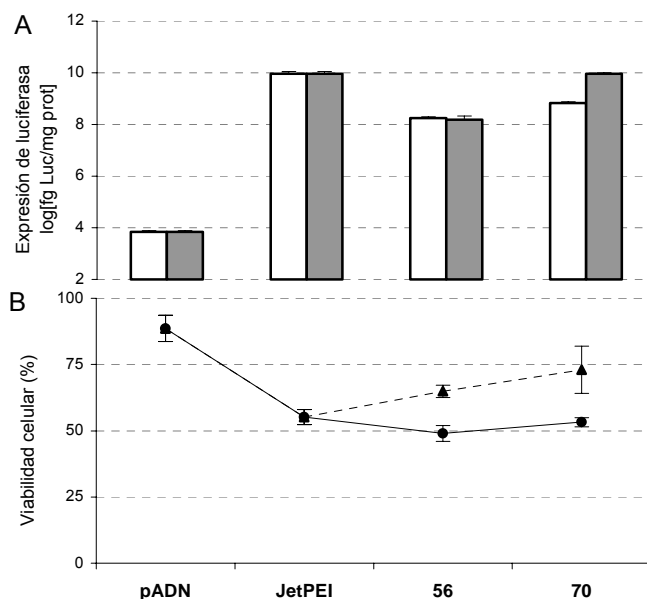


Figura 60. Eficacia de transfección (A) y viabilidad celular (B) en células COS-7 de los CDplejos formados por **56** y **70** frente al pADN libre y poliplejos de JetPEI™ con N/P 5 (barras huecas y ▲) y 10 (barras sólidas y ●).

Como ya se comentó, muchos vectores de genes artificiales que presentan una prometedora capacidad para el transporte de genes *in vitro*, fallan al intentar reproducir los resultados en condiciones fisiológicas,²⁹⁷ lo que, generalmente, se atribuye a la inestabilidad de los complejos en presencia de los componentes del suero. La alta concentración salina en el suero, alrededor de 150 mM, suele promover la agregación, conduciendo a la obstrucción vascular.²⁹⁸ Además, los complejos catiónicos se unen rápida e inespecíficamente a las proteínas aniónicas del suero lo que fomenta la agregación, disminuye la biodisponibilidad, limita la internalización celular y, ocasionalmente, promueve su fagocitosis.²⁹⁹ En este contexto, la cubierta anfífilica de los CDplejos debe contribuir a bloquear su interacción con los componentes aniónicos del suero. De hecho, los ensayos de estabilidad de las nanopartículas **70**:pADN discutidos anteriormente, revelan que son poco sensibles al estrés salino y al suero. Para confirmar

esta hipótesis, se llevaron a cabo experimentos de transporte de genes en ausencia y presencia de suero (10%). En el caso del complejo **56**:pADN la expresión de la luciferasa en las células BNL-CL2 fue 4 órdenes de magnitud inferior en presencia de suero (Figura 61) en comparación con el ensayo en ausencia de suero. Sin embargo, que en el caso de los CDplejos de **70** la disminución de la eficacia es mucho menor, manteniendo valores cercanos a los del JetPEI™ y resultando menos tóxicos que este.

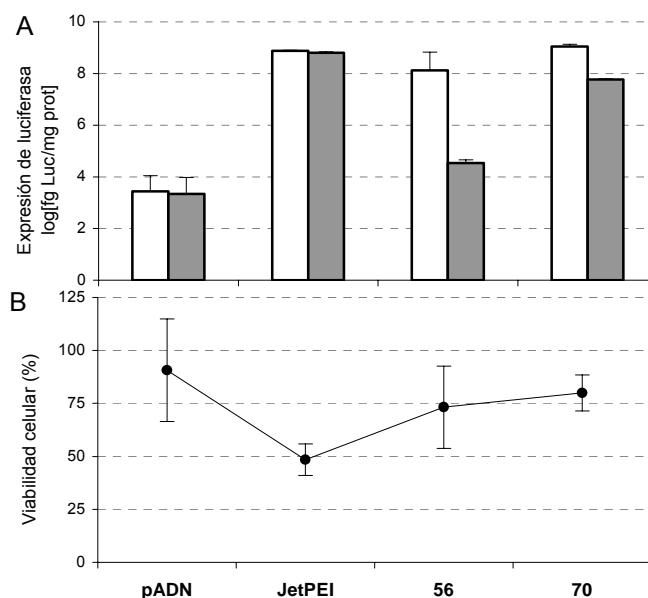


Figura 61. Eficacia de transfección (A) y viabilidad celular (B) en células BNL-CL2 de los CDplejos formados por **56** y **70** con N/P 10 frente al pADN libre y poliplejos de JetPEI™ en ausencia (barras huecas) y presencia (barras sólidas y línea) de suero (10%).

A la vista de estos resultados se han realizado ensayos preliminares con complejos **56**:pADN *in vivo* en ratones. Estos experimentos muestran un aumento importante de la expresión de luciferasa en los pulmones en comparación con el control (pADN). También se observa un aumento, más ligero pero significativo, de la expresión de luciferasa en los riñones (Figura 62). Es probable que esto ocurra debido a que es en estos órganos donde hay un mayor flujo sanguíneo y un mayor grado de capilaridad.

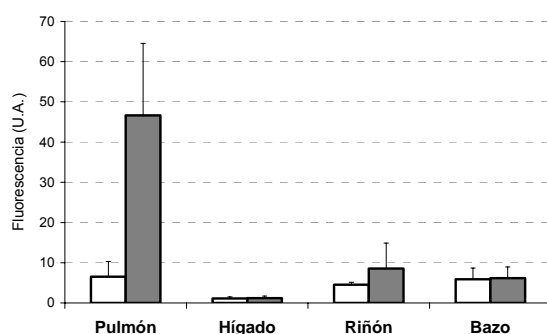


Figura 62. Fluorescencia media de las células de distintos órganos de ratas inyectadas con una disolución de CDplejos 56:pADN a N/P 10 (barras sólidas) frente a los valores para ratas inyectadas con pADN libre (barras huecas).

En resumen, en este capítulo, se ha implementado un diseño sencillo de CDs policationicos y anfifílicas (paCDs) que actúan como sistemas moleculares monodispersos de transporte de genes eficaces y una estrategia sintética modular adecuada para estudiar las relaciones entre estructura y actividad en dichos compuestos. La estructura final de estas paCDs puede ser modificada con detalle en aspectos como la densidad de grupos catiónicos, la flexibilidad o la presencia de grupos donadores de enlace de hidrógeno, manteniendo la simetría original del núcleo de CD. El correcto balance hidrofílica/hidrofobia en los compuestos ha demostrado ser un factor crucial para la complejación de pADN y la formación de nanopartículas. Con estos derivados de CD se han conseguido poblaciones monodispersas de pequeñas nanopartículas (>100 nm) de ADN con un tamaño adecuado para su utilización en aplicaciones sistémicas *in vivo*. La estabilidad de dichas nanopartículas y su eficacia de transfección pueden ser modificadas mediante la manipulación de la superficie molecular. Utilizando paCDs con una disposición ramificada de los grupos catiónicos se han descrito eficacias de transfección similares o incluso superiores a la de polímeros catiónicos como bPEI y JetPEI con menor toxicidad en las líneas celulares BNL-CL2 y COS-7 tanto en ausencia como en presencia de suero (10%).

5. ESTUDIO DEL MECANISMO DE INTERNALIZACIÓN CELULAR

5. Estudio del mecanismo de internalización celular de CDplejos

El análisis de la relación estructura-actividad en los derivados de CDs anfífilas, ha permitido identificar los rasgos estructurales necesarios para optimizar su función biológica a nivel atómico. Sin embargo, establecer una relación directa entre la arquitectura molecular del vector de genes y su eficacia de transfección no es sencillo. En un fenómeno tan complejo como la transfección en el que hay que atravesar un gran número de barreras fisiológicas, cada una de las cuales podría superarse mediante múltiples mecanismos. Procesos como la internalización, que está ampliamente aceptado que ocurre por endocitosis, la liberación de la carga de los endosomas o la translocación y expresión del material génico, pueden verse significativamente afectados por la naturaleza del vector.

Los lípidos y los polímeros catiónicos constituyen un ejemplo de cómo las propiedades de transfección de cada tipo de vector dependen, en buena medida, de los mecanismos celulares que activa. Mientras que los primeros deben su eficacia, fundamentalmente, a su capacidad de desestabilizar la membrana lipídica de los endosomas,³⁰⁰ los segundos consiguen este mismo efecto explotando su capacidad para comportarse como esponjas de protones²¹¹ para tamponar el pH.^{296,301} Observaciones de este tipo han dirigido el diseño de las sucesivas generaciones en estas familias de vectores.

El hecho de que las paCDs compartan características estructurales con lípidos y polímeros catiónicos plantea cuestiones sobre los mecanismos implicados en el acceso de las nanopartículas formadas con pADN (CDplejos) a la maquinaria celular. La elucidación de estos mecanismos resulta imprescindible para optimizar la capacidad de transfección a través del diseño racional del vector.

5.1. La endocitosis como mecanismo de internalización celular

La membrana celular es una estructura dinámica que sirve para separar el medio intracelular del entorno extracelular, protegiendo las frágiles estructuras biológicas de sustancias tóxicas u oportunistas existentes en el exterior celular y regulando, de forma coordinada, la entrada y salida de pequeñas y grandes moléculas. Solo pequeñas moléculas hidrófobas pueden atravesar rápidamente la membrana mediante difusión pasiva. Algunas de las moléculas más polares consiguen pasar de uno a otro lado gracias a la acción de canales y bombas proteicas selectivas. El resto de moléculas y macromoléculas deben ser transportadas al interior de las células de forma activa mediante procesos de formación de invaginaciones, que capturan los solutos, y escisión de las mismas de la membrana celular, formando vesículas intracelulares. Este proceso se denomina “endocitosis” y abarca un amplio conjunto de mecanismos de internalización de sustancias extracelulares.³⁰²

La endocitosis se divide en dos grandes categorías en función del tipo de sustancias que se internaliza: fagocitosis (internalización de grandes partículas) y pinocitosis (internalización de fluidos y solutos) (Figura 63). La fagocitosis es un mecanismo mediado por actina, empleado predominantemente por células especializadas como macrófagos, neutrófilos o monocitos, que permite la internalización de especies relativamente grandes (bacterias, células muertas, depósitos de colesterol, levaduras).³⁰³ La pinocitosis consiste en la captura de sustancias en vesículas generadas por la invaginación de pequeñas regiones de la membrana plasmática. Estas vesículas, generalmente con un diámetro inferior a los 200 nm, se denominan “endosomas”. Mediante pinocitosis se puede internalizar el fluido extracelular de forma no específica o moléculas reconocidas por receptores específicos de la membrana celular. La mayoría de las rutas endocíticas, y las más interesantes, son del segundo tipo. El reconocimiento de determinadas especies en el fluido extracelular por parte de los receptores específicos suele estar asociado a mecanismos que activan el proceso de endocitosis, lo que aumenta la permeabilidad de dichas sustancias hasta 1000 veces frente a procesos de

internalización no específica. La endocitosis seguida de la exocitosis de los ligandos en otra parte de la célula se denomina “transcitosis” y es un mecanismo que permite el transporte de sustancias a través de barreras como la membrana hemato-encefálica.³⁰⁴

Se han caracterizado varios mecanismos básicos de pinocitosis: macropinocitosis (MP), endocitosis dependiente de clatrina (EDCl) y endocitosis dependiente de caveolina (EDCav), además de otros mecanismos independientes de clatrina y caveolina (EICC), cuyo funcionamiento no está plenamente comprendido (Figura 63).

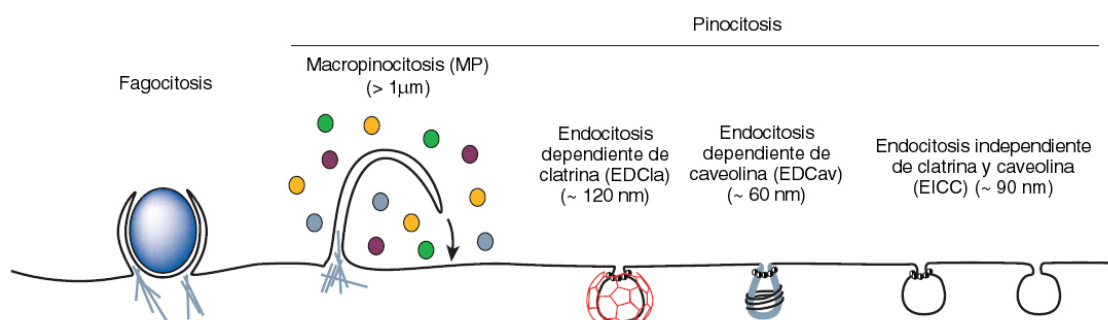


Figura 63. Vías de entrada a las células de mamíferos. Las rutas de endocitosis se diferencian en el tamaño de la vesícula endocítica, la naturaleza del contenido (ligandos, receptores, y lípidos) y el mecanismo de formación de la vesícula.

La macropinocitosis es un mecanismo de internalización de fluido mediado por actina que puede ser inducido transitoriamente en la mayoría de las células de mamíferos. Consiste en la formación de grandes protuberancias que generan vesículas endocíticas de tamaños y formas irregulares con diámetros entre 0.5 y 2.5 μm . Es un mecanismo de endocitosis masiva e inespecífica de fluido extracelular que, por tanto, mantiene la concentración de solutos presente en el medio.³⁰⁵

La EDCl es el proceso de endocitosis mejor comprendido. Se caracteriza por la formación de invaginaciones inducidas por la oligomerización de una proteína (clatrina) en la superficie interna de la membrana celular (Figura 64) y es responsable aproximadamente del 50% de la internalización mediada por receptores de la membrana

celular. Este proceso regula no solo la continua absorción de nutrientes sino también la comunicación intercelular, la traducción y transmisión de señales externas y la homeostasis con el entorno celular, controlando el nivel de receptores en la superficie celular. Aproximadamente el 2% de la superficie celular está ocupada por invaginaciones cubiertas de clatrina. La clatrina es una proteína que se compone de dos subunidades (de 190 y 25 kDa, respectivamente) que se unen en grupos de tres formando estructuras de tres brazos denominadas “triskeliones”. Estas subunidades se ensamblan en construcciones poligonales altamente ordenadas que definen pozos en la superficie celular. Cuando estas cavidades recubiertas de clatrina se invaginan y se escinden de la membrana plasmática se forman las “vesículas recubiertas de clatrina”, con una alta concentración de complejos receptor-ligando en su interior, de unos 120 nm de diámetro (Figura 65). La velocidad con la que se generan estos endosomas es sorprendente, pudiendo aparecer cientos o miles de ellas cada minuto.³⁰⁶ El pH de las vesículas internalizadas desciende (pH ~ 6) como consecuencia de la activación de la bomba de protones, que ocurre de forma simultánea a la apertura de los canales de cloruro.



Figura 64. Mecanismo de la endocitosis mediada por clatrina (trímero azul).

La EDCav se basa en la formación de vesículas, llamadas “caveosomas”, de unos 60 nm de diámetro y cubiertas por caveolina-1. Su cinética es de 10 a 20 veces más lenta que las del las vesículas de EDCl_a y su formación ocurre, fundamentalmente, en zonas de la membrana ricas en lípidos y colesterol. Existen en la membrana celular “islas” de colesterol, esfingolípidos y lípidos saturados que se mueven con cierta libertad en el plano de la membrana celular, sin embargo, una vez formada la invaginación en estas zonas, la estructura, llamada “caveolo”, es estática. Este mecanismo, aunque bastante común, no está tan extendido como los anteriores ya que hay células (como los linfocitos y células neuronales) que no presentan las construcciones lipídicas necesarias. Sin embargo hay otras (como los adipocitos, células endoteliales o células musculares) que presentan gran cantidad de estas estructuras. La forma y la organización estructural de los caveolos vienen impuestas por la caveolina, una proteína dimérica que se une al colesterol, se inserta como un bucle en la membrana celular y se autoasocia para formar una cobertura estriada de caveolina en la superficie de la invaginación (Figura 65).³⁰⁷ Una característica que diferencia en gran medida esta ruta respecto de la EDCl_a es que es una internalización no ácida y no digestiva, es decir, los caveosomas no sufren disminución del pH, por lo que las sustancias internalizadas mediante esta ruta son directamente transportadas al aparato de Golgi o al retículo endoplasmático evitando la degradación en el lisosoma.³⁰⁸

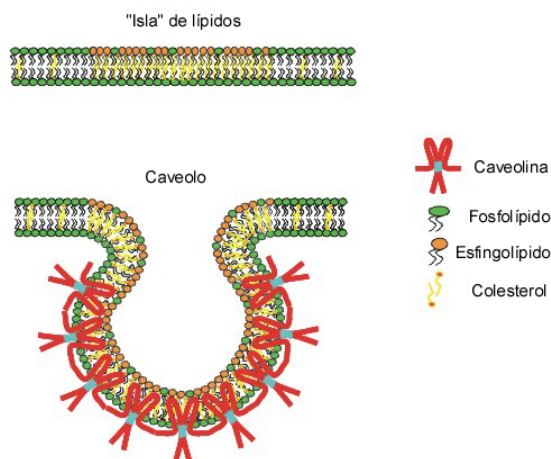


Figura 65. Formación de caveolos en las zonas ricas en lípidos de la membrana.

Se han identificado adicionalmente diferentes mecanismos de endocitosis independientes de clatrina y caveolina (EICC), la mayoría de ellos con una importante dependencia del colesterol.³⁰⁹ No obstante, de los mecanismos de EICC se conocen muy pocos detalles ya que la mayoría de estas rutas se describen solo en términos negativos: se observa que existen mecanismos de endocitosis que aún actúan al bloquear las rutas dependientes de clatrina y caveolina. En algunos casos estos mecanismos son exclusivos de un único tipo células, para las cuales pueden desempeñar funciones peculiares. En otros casos el mecanismo puede variar de un tipo de células a otra no solo en la formación de las vesículas sino el transporte de su contenido, el destino de su carga y la regulación de la entrada.

A pesar de que algunas de las rutas de endocitosis están bastante bien definidas, el proceso global es muy complejo y varía considerablemente en función del tipo de células y sustrato estudiados. Incluso se han encontrado casos (como el factor de crecimiento epidérmico) en los que la internalización ocurre a través de mecanismos que presentan, simultáneamente, características de varios de los mecanismos descritos (clatrina y cúmulos de lípidos para el ejemplo).³¹⁰

En muchos de los mecanismos descritos anteriormente juega un papel fundamental la dinamina, una proteína dimérica que hidroliza GTP, responsable de la formación de hélices en el cuello de las invaginaciones que inducen la separación del endosoma y la membrana celular.³¹¹ La dinamina es una GTPasa atípicamente larga y modular cuyos segmentos cumplen funciones bien definidas. En los últimos estadios de formación de muchos endosomas, la dinamina se autoensambla formando un collar alrededor del cuello de las invaginaciones y termina “estrangulando” estas formaciones para formar los endosomas. No obstante, la función exacta de la dinamina no está muy clara, existiendo dos modelos principales. Uno sugiere que la dinamina, al contrario que el resto de GTPasas, actúa como enzima mecanoquímica, produciendo la vesiculación de la membrana por medios físicos. El otro, que la dinamina, al igual otras GTPasas, actúa como una molécula reguladora en las formaciones endocíticas.

5.1.1. Endocitosis y transfección

Está ampliamente aceptado que el acceso al interior celular de la mayoría de los vectores de genes se produce mediante endocitosis, dependiendo su eficacia de los mecanismos empleados para superar esta barrera. Se ha descrito anteriormente que las células hacen uso de diversas rutas de endocitosis en función de la naturaleza de las partículas a internalizar y que, además, el destino intracelular de dichas partículas está íntimamente ligado al tipo de vesículas en el que sean transportadas.³¹² Por todo ello es factible pensar que los distintos tipos de complejos que contienen pADN pueden ser internalizados mediante distintas rutas de endocitosis y que dichas rutas no siempre tienen por qué conducir a la expresión satisfactoria del material génico.

En la bibliografía podemos encontrar que los complejos formados por el lípido catiónico DOTAP son internalizados exclusivamente mediante EDCl_a mientras que los poliplejos preparados con el polímero catiónico PEI se internalizan casi equitativamente mediante EDCl_a y EDC_{av}. Sin embargo, mientras que en el caso de DOTAP la ruta vía clatrina conduce eficazmente a la expresión del gen, los complejos de PEI internalizados

por esta ruta no llegan a cumplir su objetivo (Figura 66). Estos resultados se pueden explicar teniendo en cuenta las posibles diferencias en el mecanismo por el que se libera la carga de los endosomas al citosol.^{296,313}

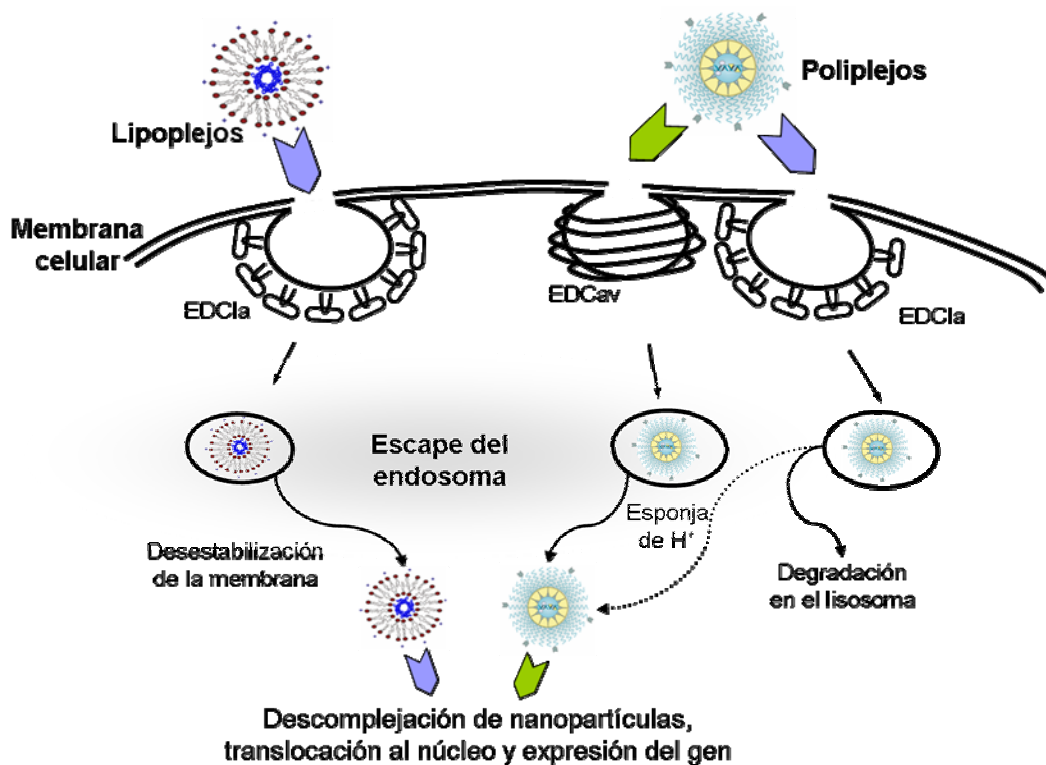


Figura 66. Esquema comparativo del mecanismo de internalización celular de lipoplejos y poliplejos.

5.1.2. *El estudio de los mecanismos de endocitosis*

Existen varios métodos para evaluar la relevancia que cada ruta de endocitosis tiene en la internalización de partículas por parte de las células y su destino final. Los más utilizados son:

- la monitorización mediante microscopía avanzada de orgánulos o partículas marcadas fluorescentemente,³¹⁴
- y el empleo de inhibidores selectivos de las distintas rutas implicadas en el proceso de internalización.

En el caso del marcaje fluorescente, además de poder colocalizar orgánulos y partículas marcadas, se pueden implementar estrategias que permiten determinar cuantitativamente la cantidad de ADN que se encuentra en el citoplasma, en los endosomas o en el núcleo en cada momento.³¹⁵ Otra posibilidad del marcaje fluorescente son los estudios por citometría de flujo, en los que se pueden determinar cuantitativamente el número de células fluorescentes de una colonia así como la intensidad de fluorescencia de cada una. Todo esto permite conocer la eficacia de unas determinadas condiciones para internalizar el vector o el pADN objetivo en las células. La microscopía de fluorescencia también permite estudiar la movilidad intra- y extracelular de las nanopartículas, la disociación del pADN y de los vectores o la degradación del propio pADN.³¹⁴

Los protocolos de inhibición de la endocitosis pueden basarse en la introducción de un efecto mutante negativo,³¹⁶ la regulación transitoria de ciertas proteínas utilizando ARNi³¹⁷ o en la aplicación de inhibidores de la endocitosis que, con mayor o menor selectividad, bloqueen alguno de los mecanismos involucrados en el proceso.³¹⁸ Estos tratamientos deben utilizarse con precaución, pues los efectos pueden variar de unas células a otras y pueden causar una toxicidad no específica.

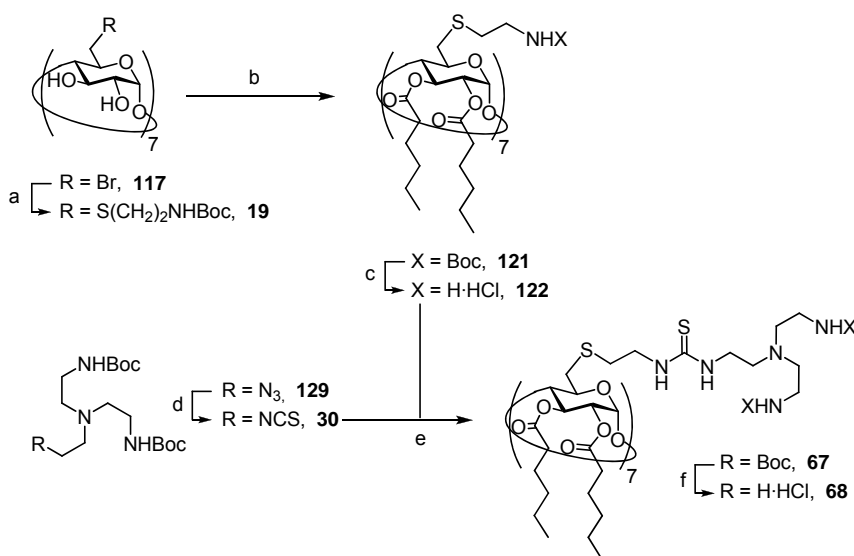
El objetivo de este capítulo ha sido la elucidación de los mecanismos de endocitosis implicados en la internalización de los CDplejos. Para ello se han combinado

métodos de monitorización de la cinética de internalización por microscopía confocal y el uso de inhibidores selectivos de las principales rutas de acceso al citoplasma celular. Se pretende elucidar, además de los mecanismos implicados en la endocitosis de las nanopartículas, el destino de los distintos endosomas y su eficacia para promover la expresión del material génico que transportan. El trabajo de este capítulo ha sido realizado durante una estancia en los laboratorios del profesor Stefaan C. De Smedt de la Universidad de Gante.

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Síntesis y caracterización física de candidatos

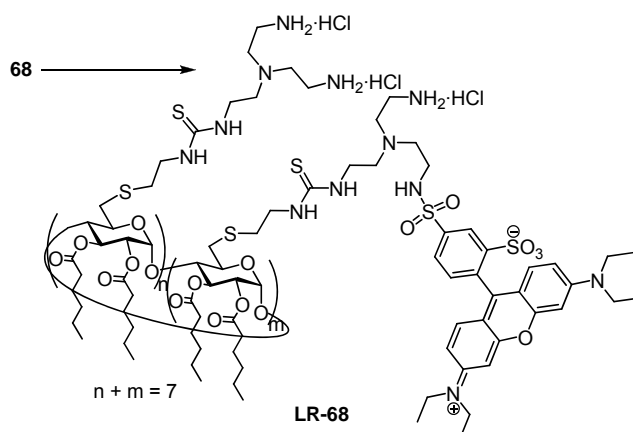
Para la realización de estos estudios hemos seleccionado la paCD tetradecacatiónica **68** que, además de ser uno de los mejores candidatos para la transfección frente a distintas líneas celulares, de acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo anterior, puede prepararse a escala de gramos (Esquema 19).



Esquema 19. Síntesis convergente escalada de la poliaminotioureido β CD anfifílica **68**. Reactivos y condiciones: a) $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{NHBoc}$, Cs_2CO_3 , DMF, 60°C , 48 h, 99% (3.56 g); b) anhídrido hexanóico, DMAP, Py, 70°C , 16 h, 80% (2.57 g); c) 1:1 TFA- CH_2Cl_2 , 2 h, 99% (1.2 g); d) CS_2 , TPP, dioxano, 24 h, 86%, (0.83 g); e) Et_3N , CH_2Cl_2 , 16 h, 85% (1.0 g); f) i, 1:1 TFA- CH_2Cl_2 , 2 h; ii, HCl, 99% (0.55 g).

La optimización a mayor escala de la síntesis de **68** no solo es necesaria para disponer del material con el que realizar los ensayos, sino que facilita la preparación de

los derivados marcados con sondas fluorescentes que se requieren para la monitorización del proceso. Así, se ha sintetizado un derivado fluorescente de **68** funcionalizándolo con lissamina-rodamina para estudiar el comportamiento intracelular de los CDplejos en tiempo real mediante técnicas de microscopía láser de escaneo confocal. La elección de este marcador fluorescente se debe al hecho de que presenta una buena intensidad de fluorescencia, es estable en una amplia variedad de condiciones (pH, fuerza iónica...) y puede acoplarse fácilmente a moléculas con grupos amino. El acoplamiento de la sonda fluorescente sobre **68** se llevó a cabo empleando un defecto del cloruro de sulfonilo de la lissamina-rodamina (CLRS, 1 μmol por μmol de **68**) de manera que reaccionase estadísticamente con los grupos amino de la paCD **68** (Esquema 20). La purificación por cromatografía de permeación sobre gel (Sephadex LH-20, MeOH) permitió aislar con buen rendimiento (75%) **LR-68**, en cuyo espectro de masas se pudieron identificar picos correspondientes a los aductos sin marcar (**68**) y funcionalizados con una molécula de rodamina. En el espectro de ^1H RMN se observan las señales de la sonda fluorescente en la zona aromática con una integral que se corresponde con la proporción esperada (Figura 67).



Esquema 20. Síntesis del derivado fluorescente **LR-68**. Reactivos y condiciones: CLRS, Et_3N , CH_2Cl_2 , 24 h, 85%.

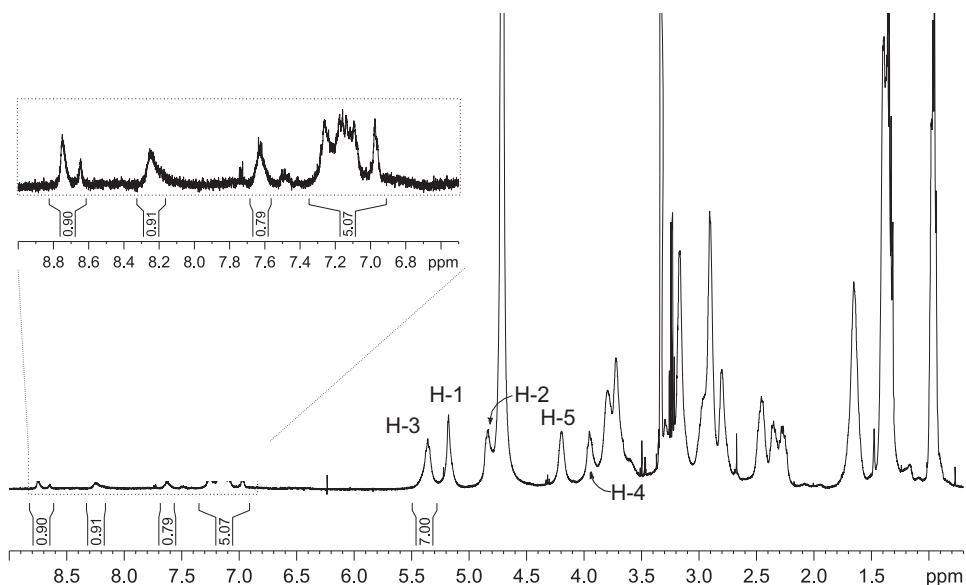


Figura 67. Espectro de ¹H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K) de **LR-68**.

La fluorescencia de **LR-68**, aunque más débil que la del CLRS, cumple con los requisitos para la monitorización. El máximo de intensidad de fluorescencia se desplaza a valores superiores de longitud de onda (Figura 68a). La intensidad de fluorescencia de **LR-68** (para λ_{ex} 595 nm) es máxima para una concentración de 25 μM en agua (Figura 68b). Para concentraciones superiores se observa una disminución de la intensidad, probablemente debida a la formación de grandes agregados que atenúan la capacidad de emisión.

Se ha descrito (en el apartado 4.7.2 de esta Tesis) que la paCD **68** es capaz de complejar de forma eficiente plásmidos de ADN formando partículas cargadas positivamente (65 nm de diámetro hidrodinámico y + 40 mV de potencial ζ para N/P 10). Los compuestos **68** y **LR-68** (y sus combinaciones) presentaron una capacidad similar de autoensamblaje en presencia de plásmidos. Aparentemente, la presencia de la sonda fluorescente no afecta a la asociación con el plásmido.

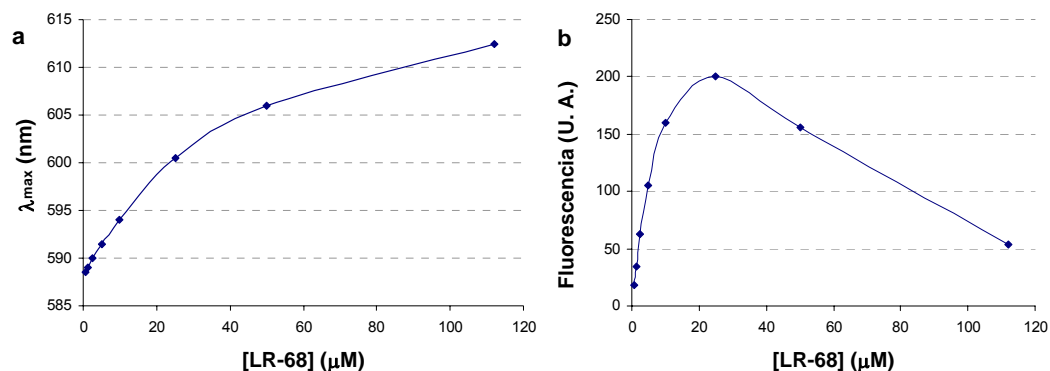


Figura 68. Variación de la longitud de onda máxima de emisión (a) y de la intensidad de fluorescencia (b) en función de la concentración de LR-68.

Ensayos de transfección de células HeLa con el complejo 68:pADN (pCMV-Luc) indican que la eficacia máxima de transfección tiene lugar a valores de N/P 5 (Figura 69). La eficacia de la transfección en estas condiciones se mantiene en presencia de suero (10%) (Figura 69A). Como era de esperar, la expresión del gen de luciferasa disminuye con el tiempo aunque se observó actividad enzimática incluso diez días después de la transfección (Figura 69B).

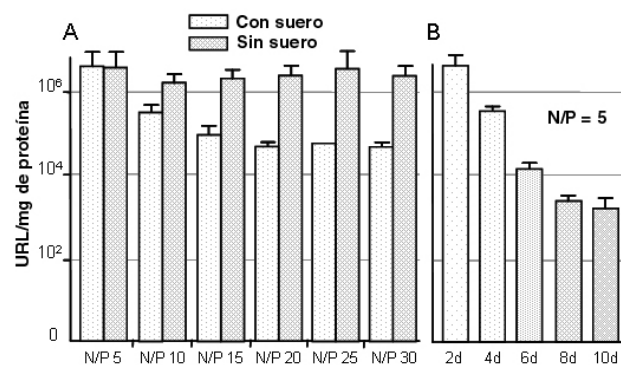


Figura 69. Eficacia de transfección con nanopartículas de 68:pADN de células HeLa (A) en ausencia y presencia de suero (10%) y (B) en función del tiempo.

5.2.2. Cinética de internalización

En la Figura 70 se muestra la monitorización mediante citometría de flujo de la cinética de internalización de los CDplejos en células Vero, utilizando pADN marcados con la sonda fluorescente YOYO[®]-1. Tras una hora de incubación, todas las células han internalizado CDplejos. La fluorescencia media, mostrada en las barras, aumenta gradualmente hasta alcanzar el máximo tras tres horas de incubación. Tiempos de incubación más largos no se traducen en un aumento de la intensidad de fluorescencia. Estos datos indican que una incubación de dos horas con los CDplejos debería ser suficiente para una internalización eficaz de los mismos por parte de las células.

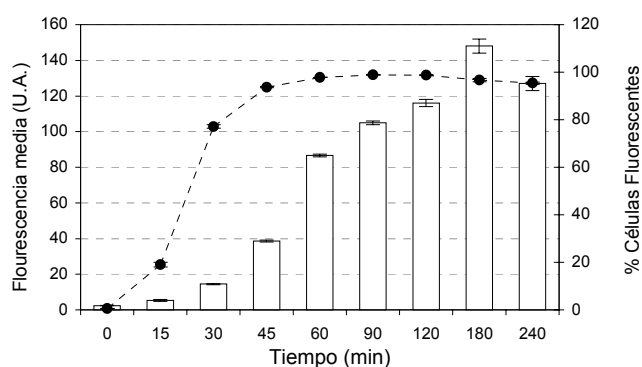


Figura 70. Cinética de internalización de CDplejos de pADN marcado con YOYO[®]-1 en células Vero. Fluorescencia media de las células (U.A., barras) y cantidad de células fluorescentes (% , •) con respecto al tiempo de incubación de las células con los complejos.

La internalización de los CDplejos se monitorizó mediante microscopía confocal utilizando el derivado fluorescente **LR-68**. En la Figura 71 se muestran imágenes capturadas a diferentes tiempos. Los CDplejos fluorescentes se internalizan gradualmente, observándose la presencia de algunos de pequeño tamaño tras apenas 15 o 20 minutos. A los 40 minutos la concentración y el tamaño de los CDplejos internalizados ya son perfectamente apreciables. Las Figuras 71A-C son imágenes capturadas de secuencias de video en las que la internalización se confirma por los típicos movimientos

direccionales de las vesículas que incluyen los CDplejos intracelulares. La cantidad de complejos internalizados aumenta con el tiempo, como puede verse en las Figuras 71B y C, y tienden a acumularse en las proximidades del núcleo. Al cabo de 48 h de la transfección, aún pueden observarse grandes asociaciones intracelulares de complejos, probablemente como resultado de la fusión de endosomas (Figura 71D).

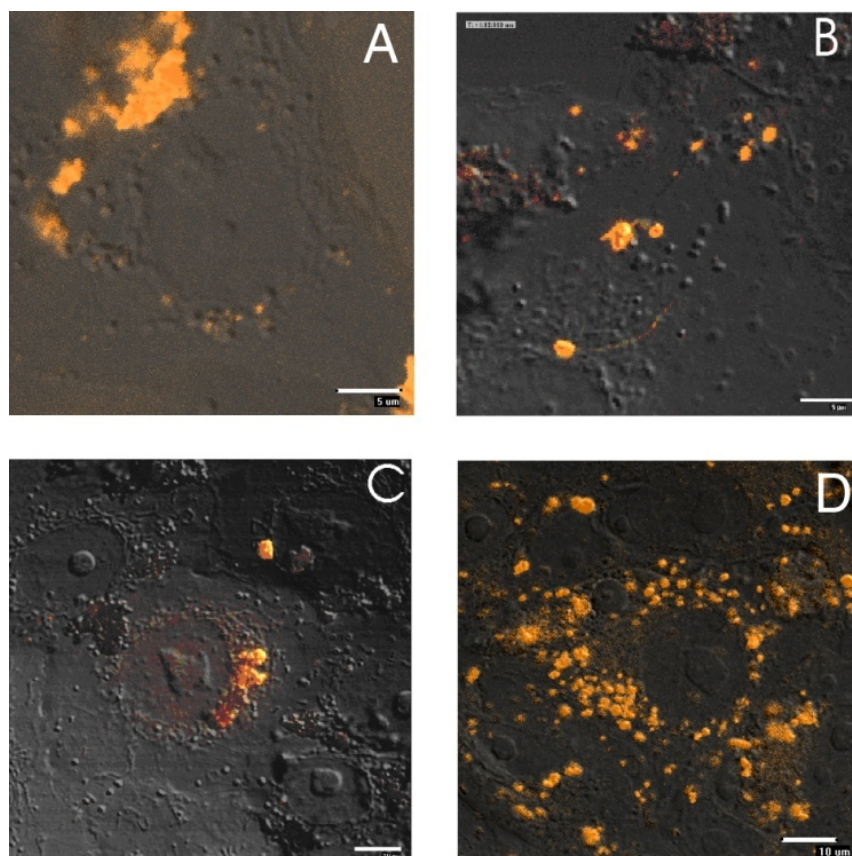


Figura 71. Imágenes de Microscopia Láser de Barrido Confocal (CLSM) de la internalización de CDplejos en células Vero vivas en un periodo de 48 h tras la transfección. (A, 40 min; B, 120 min; C, 150 min; D, 48 h).

En algunas imágenes pueden observarse grandes agregados de CDplejos fuera de las células (Figura 71A), indicando que los complejos paCD:pADN, como las partículas de paCDs sin pADN, pueden agregarse en el medio extracelular. Otra característica interesante es que no se observa acumulación de CDplejos o paCDs en la membrana celular, descartando la posibilidad que haya interacciones hidrófobas irreversibles entre los lípidos de la membrana y las cadenas alifáticas de las CDs. Es probable que, para protegerse del medio polar, las cadenas se orienten hacia el interior de los CDplejos, lo que limitaría su interacción con los lípidos de la membrana plasmática.

5.2.3. Internalización y transfección en presencia de inhibidores de la endocitosis

Por otro lado, se seleccionaron un conjunto de inhibidores selectivos de algunas rutas de endocitosis como son (Figura 72):

- *Clorpromazina*, un fármaco catiónico y anfifílico que impide la formación de las invaginaciones recubiertas de clatrina y las proteínas implicadas en su adaptación desde la membrana plasmática hacia vesículas intracelulares, inhibiendo así la endocitosis dependiente de clatrina (EDCl_a).³¹⁹
- *Genisteina*, un inhibidor de la tirosina-kinasa que provoca la destrucción local de la red de actina en el punto de endocitosis e inhibe también el agrupamiento de la dinamina II, eventos indispensables para el mecanismo de internalización mediado por caveolina (EDC_{av}).³²⁰
- *Dinapore*, un inhibidor de la actividad de la dinamina, obstaculizando la separación de las nuevas vesículas formadas, proceso que es esencial para buena parte de las rutas de endocitosis.³²¹
- *βCD parcialmente metilada* (MbCD o RAMEB), que es capaz de extraer reversiblemente el colesterol presente en la membrana celular eliminando las acumulaciones de lípidos y desactivando los mecanismos de endocitosis dependientes de colesterol.³²²

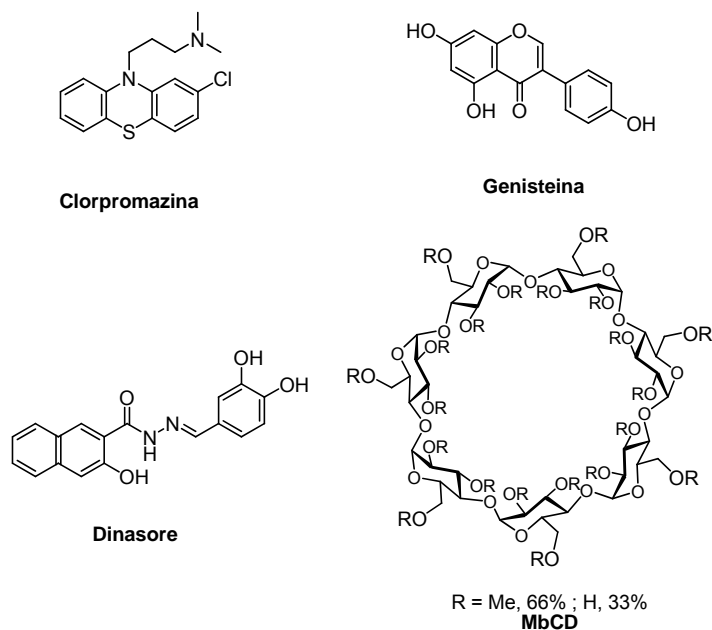


Figura 72. Estructuras de los inhibidores de endocitosis utilizados.

Para establecer el protocolo óptimo para el uso de los inhibidores se determinó en primer lugar la viabilidad celular en su presencia. Las células Vero se preincubaron con distintas concentraciones de cada inhibidor durante 1 h, seguidamente, el medio fue sustituido por nuevas disoluciones de los inhibidores en presencia y ausencia de CDplejos preparados con diferentes relaciones N/P (5 y 10) y la incubación se mantuvo durante 4 h más. La toxicidad se determinó con la prueba de viabilidad celular CellTiterGlo. Los resultados se muestran en la Figura 73.

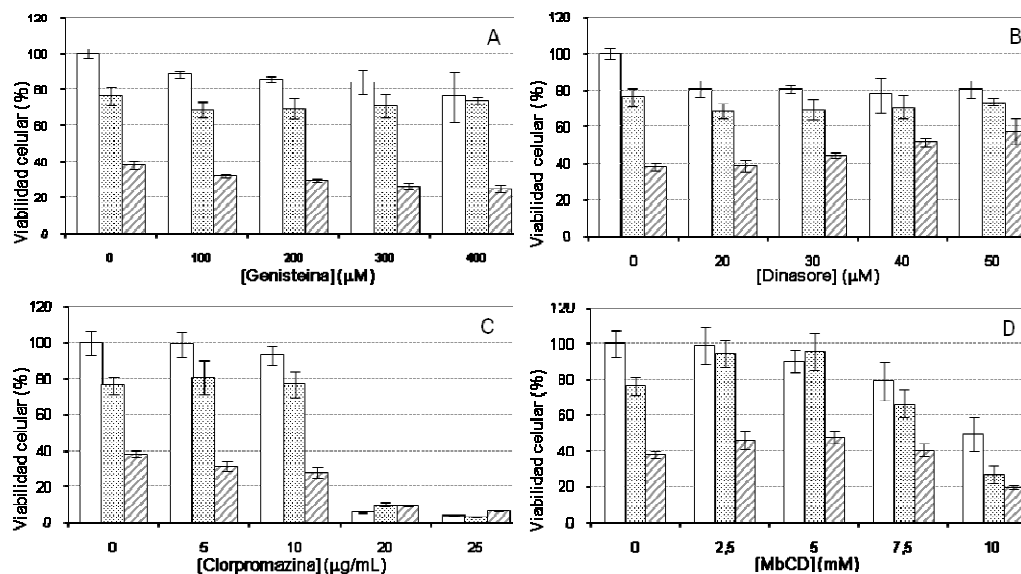


Figura 73. Viabilidad de células Vero incubadas 5 h en presencia de los inhibidores (barras blancas) o presencia de inhibidores y CDplejos a valores de N/P 5 (barras punteadas) o N/P 10 (barras rayadas). A, genisteina; B, dinosore; C, clorpromazina; D, MbCD.

Los CDplejos mostraron cierta toxicidad en las células, con valores de viabilidad celular que cayeron al 76 y 38 % para N/P 5 y 10, respectivamente. La genisteina mostró una limitada toxicidad por sí sola en las células Vero tras 5 h de incubación. La mayor concentración empleada (400 μM) redujo la viabilidad celular solo un 20 % (Figura 73A). La incubación con genisteina y CDplejos reflejó un efecto prácticamente aditivo de la toxicidad de cada uno por separado (26 % y 75 % de disminución de la viabilidad para N/P 5 y 10 respectivamente). La dinosore, empleada en el rango de 20 a 50 μM , presentó una ligera toxicidad en las células Vero (Figura 73B). Para la mayor concentración ensayada (50 μM), la viabilidad disminuyó un 20 %. En combinación con los CDplejos, la viabilidad celular desciende entre un 15 % y un 40 % para N/P 5 y 10 respectivamente. Aparentemente, el aumento de la concentración de dinosore protege a las células de la toxicidad inducida por las paCDs, probablemente debido a un bloqueo eficaz de la

endocitosis (ver más adelante). Las células Vero prácticamente no se vieron afectadas por la clorpromazina hasta una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 5 h. Concentraciones superiores, por otra parte, condujeron a un 100% de muerte celular (Figura 73C). En combinación con los CDplejos (N/P 10), la clorpromazina a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduce la viabilidad celular hasta en un 70%. El tratamiento con MbCD resultó citotóxico a concentraciones mayor de 7.5 mM (Figura 73D), mientras que la incubación con MbCD y CDplejos (N/P 10) llevó a un 50% de viabilidad celular.

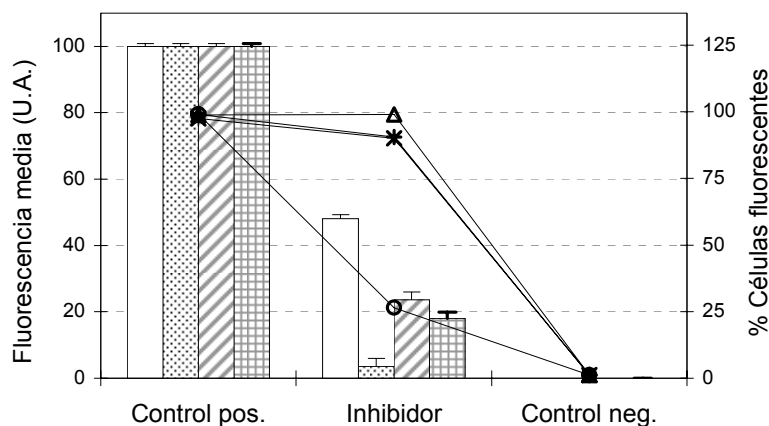


Figura 74. Efecto de genisteína (400 μM , barras blanca y Δ), dinasore (50 μM , barras punteadas y \circ), clorpromazina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, barras rayadas y +) y MbCD (5 mM, barras cuadrículas y \times) sobre la internalización de CDplejos (N/P 10).

Las concentraciones de los inhibidores empleadas en los experimentos posteriores de internalización y transfección se seleccionaron basándose en los ensayos de toxicidad descritos anteriormente. Así, las células Vero se preincubaron durante 1 h con genisteína 400 μM , dinasore 50 μM , clorpromazina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o MbCD 5 mM. Seguidamente, las células se incubaron durante 2 h con el inhibidor correspondiente y CDplejos marcados con YOYO[®]-1. Aunque la viabilidad celular es superior en presencia de CDplejos formulados a N/P 5, los experimentos se llevaron a cabo usando formulaciones a N/P 10 ya que de este modo se evitan los efectos que la agregación de las nanopartículas

podieran ocasionar. La Figura 74 muestra que, tras el tratamiento con genisteína, clorpromazina y MbCD, los CDplejos fueron internalizados por casi todas las células aunque en mucha menor proporción. La MbCD y la clorpromazina redujeron la media de complejos internalizados por las células en un 80%, mientras que la genisteína disminuyó esta cantidad solo en un 50%. En contraste, la internalización de los CDplejos fue inhibida casi completamente al utilizar dinasore. Esto indicaría que la internalización de los CDplejos por células Vero es muy dependiente de la actividad de la dinamina y en buena parte de la presencia de colesterol en la membrana celular y de la presencia de clatrina en el citoplasma celular cerca de la membrana. De hecho, considerando la eficiente inhibición de la internalización de CDplejos en presencia de clorpromazina, que bloquea la formación de invaginaciones rodeadas de clatrina, podemos deducir que la EDCla es, probablemente, la ruta más importante para la internalización de CDplejos en células Vero. No obstante, el hecho de que la genisteína, que interfiere en la internalización vía caveolina, inhiba parcialmente la internalización de CDplejos, hace que no podamos descartar las rutas de EDCav e incluso las EICC, aunque la cantidad de complejos que entran en las células vía EDCla parece ser superior que la que se internaliza por el resto de vías.

Además del efecto de los inhibidores sobre la internalización de los complejos, se midió su efecto en la eficacia de transfección determinando la actividad de la luciferasa 48 h después de la transfección (Figura 75). La genisteína (400 μ M) inhibió completamente la expresión de la luciferasa, al igual que ocurrió con dinasore (50 μ M). En el caso de la clorpromazina, la eficacia de transfección se redujo un 50% con 10 μ g/mL. A mayor concentración no se midió luciferasa porque la toxicidad condujo casi al 100% de muerte celular (Figura 73C). En el caso de la MbCD, una concentración de 5 mM o superior, condujo a una disminución de más del 80% en la expresión del gen.

La clorpromazina, un inhibidor de EDCla, aunque disminuye la internalización en un 76%, solo inhibe parcialmente la transfección. Esto indica que la pequeña fracción de complejos internalizados vía EDCav y EICC (24%) es todavía capaz de mantener una moderada transfección y pone de manifiesto la baja relevancia de la ruta EDCla en la

transfección mediada por CDplejos. Este resultado es apoyado por el hecho de que la genisteína, un inhibidor de EDCav, aún reduciendo la internalización de los CDplejos solo en un 50%, elimina completamente la expresión de luciferasa, señalando la ineficacia del resto de rutas endocíticas, sobre todo la EDCl, para transportar el pADN hacia su objetivo. Posiblemente, en este caso, los CDplejos no pueden escapar de los endosomas y son finalmente degradados en el interior del lisosoma.

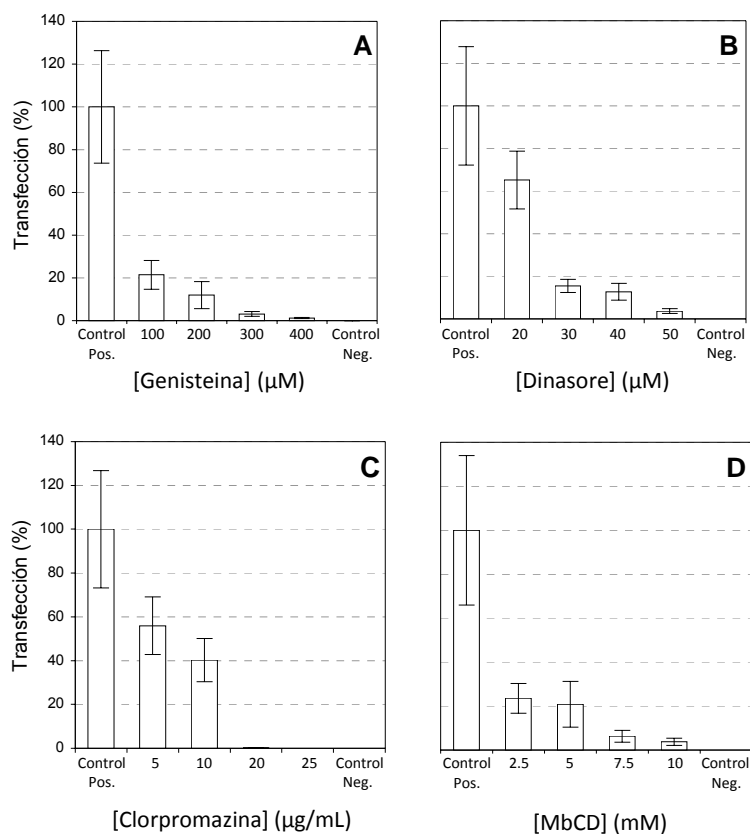


Figura 75. Eficacia de CDplejos (N/P 10) en la transfección de células Vero en presencia de inhibidores de endocitosis. A, genisteína; B, dinastore; C, clorpromazina; D, MbCD.

Los resultados demuestran que la transfección mediada por CDplejos en células Vero es un proceso complejo que envuelve, simultáneamente, varios mecanismos celulares de internalización. Estas observaciones indican ciertas semejanzas con estudios anteriores de internalización de poliplejos de PEI.³¹³ Ensayos preliminares con complejos formados con otras paCDs y en otras líneas celulares parecen indicar un comportamiento de internalización cualitativamente similar al descrito en este capítulo para **68** en las células Vero. El hecho de presentar un perfil de comportamiento paralelo al de los poliplejos de PEI puede indicar que las modificaciones que han resultado beneficiosas para mejorar la eficacia de estos podrían tener también un efecto paralelo en el caso de los CDplejos.

**6. VECTORES DE GENES BASADOS EN CDs
ANFIFÍLICAS PARA TRANSFECCIÓN SELECTIVA**

6. Vectores de genes basados en CDs anfífilas para transfección selectiva

Uno de los factores que determinan en gran medida la diferencia en eficacia que existe actualmente entre los vectores virales y los artificiales es que los primeros son capaces de reconocer específicamente su objetivo y explotar los mecanismos de transporte activo. Durante millones de años de evolución, los virus han desarrollado excepcionales mecanismos para lograr este fin, normalmente haciendo uso de los receptores específicos que presentan los diferentes tipos de células tanto en la superficie, para lograr el acceso al interior celular, como en el citoplasma, para utilizar los sistemas de transporte activo hacia el núcleo. La imitación de esta ventaja evolutiva constituye hoy día uno de los retos a los que se enfrenta la terapia génica basada en vectores artificiales para reducir la distancia, en términos de eficacia con los vectores víricos.

6.1. Vectorización selectiva de genes

Como se ha comentado anteriormente, la mayoría de los vectores artificiales (lípidos catiónicos o polímeros catiónicos) se basan en estructuras capaces de condensar pADN formando complejos con un amplio rango de tamaños y propiedades fisicoquímicas en disolución.⁴⁷ Estos complejos suelen ser partículas cargadas positivamente que interactúan con las moléculas cargadas negativamente de la membrana celular, estimulando la activación de mecanismos de internalización y transporte intracelular.³²³ Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones, estos procesos son inespecíficos, lo cual constituye una limitación tanto para la eficacia del proceso de transfección como para su posible aplicación médica.

Con el fin de eliminar esta limitación, en los últimos años se ha explorado la posibilidad de incorporar elementos funcionales en los vectores o sobre los complejos preformados con pADN. Estos elementos permiten aumentar la biocompatibilidad, dotar a los complejos de capacidad de reconocimiento específico o aumentar las propiedades fusogénicas con membranas, con el fin de convertirlos en virus artificiales.³²⁴ Los sistemas descritos por Davis y colaboradores (descritos en el apartado 4.6, Figura 42) constituyen ejemplos representativos de los avances logrados en este sentido. Con lípidos catiónicos, más adecuados para realizar estudios de relación estructura-actividad, también se han implementado estrategias similares.²⁹⁴ Por ejemplo, Medine-Kauwe y colaboradores han preparado lipoplejos funcionalizados con anticuerpos específicos que resultaron mucho más eficaces.³²⁵

Los beneficios de explotar el reconocimiento específico en el transporte de genes se pueden racionalizar a dos niveles. Por un lado en términos de selectividad, en la medida en que las nanopartículas puedan ser reconocidas y acumuladas en torno a las líneas celulares que expresen el receptor complementario. Por otro lado en términos de eficacia de la internalización y transporte intracelular, en la medida en que el proceso de reconocimiento esté asociado a la activación selectiva de mecanismos de endocitosis y expresión más eficaces.

De los distintos tipos de interacciones involucradas en los procesos de reconocimiento, las que implican carbohidratos están entre las que presentan las propiedades más adecuadas para promover un transporte selectivo. La topología de la membrana celular, incluyendo el tipo de lectinas expresadas en su superficie y la especificidad de las mismas, está determinada por el tipo de célula. La debilidad de las interacciones que implican carbohidratos se puede compensar con presentaciones multivalentes de los elementos de reconocimiento. Adicionalmente, la selectividad de estas interacciones ayuda a evitar interferencias con otros procesos biológicos.³²⁶

La glicosidación de los vectores de genes se ha empleado con éxito para aumentar la eficacia de transfección a células específicas.³²⁷ Por ejemplo, los derivados manosilados de la polietilenimina (PEI) transfectan más eficazmente macrófagos y células dendríticas³²⁸ ya que el mecanismo implica los receptores de manosa de la superficie de estas células.³²⁹ Derivados galactosilados de PEI son más eficaces frente a hepatocitos que el polímero sin funcionalizar.^{258,330} Más interesante aún es el hecho de que se haya comprobado que la funcionalización con carbohidratos no solo permite la vectorización extracelular, sino que también puede ser empleada para dirigir el tráfico intracelular de los complejos^{331,332} e incluso tener una función relevante en el reconocimiento a nivel de la membrana nuclear.³³³

La incorporación de glicoconjugados en sistemas de transporte de genes también se ha mostrado eficaz para reforzar la interacción con la cadena oligonucleotídica. Por ejemplo, Sainlos y colaboradores han desarrollado una nueva familia de lípidos catiónicos funcionalizados con antibióticos aminoglicosídicos²²² y Shinkai ha descrito la eficacia de vectores basados en quitosanas para este fin.^{249,334} Los términos *glicofección*³³⁵ y *glicovirus*^{35,293,336} han sido acuñados por Monsigny y Aoyama, respectivamente, para referirse al transporte de genes y transfección mediados por carbohidratos.

Por otro lado, la glicosidación de los vectores de genes suele contribuir a mejorar la biocompatibilidad y reducir la toxicidad de los polímeros catiónicos.³³⁷ Esto se atribuye a que la cobertura sacarídica crea un escudo que amortigua interacciones inespecíficas (electrostáticas o hidrófobas) de las partículas entre sí o con otras moléculas del medio.^{332,293}

Sin embargo, el desarrollo de sistemas de transfección basados en interacciones que impliquen carbohidratos no está exento de dificultades. Conseguir una adecuada afinidad y selectividad no resulta evidente. Dirigirse a células cancerígenas o promover la internalización a través de algún mecanismo de endocitosis en particular son algunas limitaciones. Entre los ligandos más empleados como alternativa cabe destacar la transferrina (Tf) y el ácido fólico (AF) (Figura 76). La Tf es una proteína cuyo receptor está frecuentemente sobreexpresado en la membrana celular de diversas células

cancerígenas.³³⁸ Davis ha explotado esta interacción específica para diseñar nanopartículas capaces de transportar un gen terapéutico que bloquea el avance del melanoma humano.^{259,339} Los receptores de AF, por su parte, se concentran en torno a zonas de la membrana celular ricas en colesterol, donde se forman caveolos. Se ha demostrado recientemente que vectores artificiales con residuos de AF promueven la EDCav, probablemente debido a la interacción específica de estas partículas con la región en la que este proceso tiene lugar.³⁴⁰

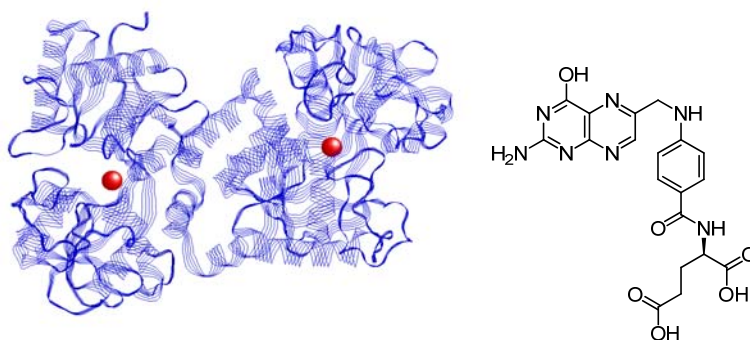


Figura 76. Estructura de la transferrina (Tf, izquierda) y el ácido fólico (AF, derecha).

6.2. Resultados y discusión

En el capítulo 4 de esta Tesis se ha demostrado el potencial de las paCDs para la elaboración de vectores sintéticos de genes. El desarrollo de metodologías para controlar la arquitectura molecular a nivel atómico ha permitido elucidar parámetros estructurales que tienen una relevancia fundamental en sus propiedades como vectores de genes. Un ejemplo es el salto cualitativo de eficacia de transfección observado al introducir del segmento de 2-aminoetil tiourea, que permiten aumentar la afinidad CD-ADN (A en la Figura 77).

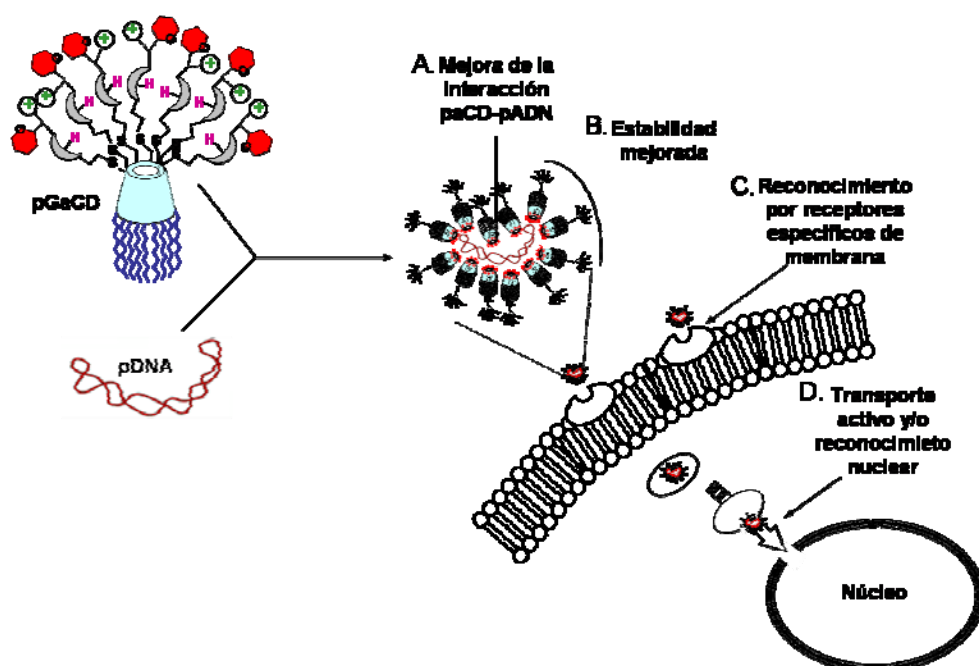


Figura 77. Parámetros manipulables mediante la funcionalización selectiva de los vectores artificiales de genes.

El hecho de que cambios sutiles en la estructura tengan efectos tan importantes sobre las propiedades del vector ha estimulado el desarrollo de estrategias basadas en la

modificación selectiva de CDs que permitan controlar otros parámetros, aparte de la interacción CD-ADN, que se sabe que tienen una influencia decisiva sobre la capacidad de transfección como son:

- Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de las partículas, muy relacionadas con las propiedades de la superficie de las partículas (B en la Figura 77).
- El modo de presentación de ligandos y antenas que puedan ser reconocidas por receptores de la membrana celular, fenómenos que están habitualmente asociados a mecanismos eficaces de internalización celular (C en la Figura 77).
- El uso de los mecanismos de transporte activo a través del citoplasma y de la membrana nuclear, de los que depende el destino de las partículas internalizadas (D en la Figura 77).

Dadas las posibilidades que las estrategias de funcionalización selectiva de CDs ofrecen, resulta particularmente atractivo el reto de diseñar sistemas de transporte de genes dotados con capacidad de reconocimiento selectivo de sus dianas. Para ello, en esta Tesis se han estudiado dos aproximaciones complementarias:

- una supramolecular (Figura 78A), que explota la capacidad de inclusión molecular que, al menos parcialmente, mantienen las paCDs para alojar a huéspedes funcionalizados con el elemento bioactivo a través de un espaciador adecuado,
- y una estrategia covalente (Figura 78B), que aprovecha la modularidad del esquema sintético basado en el acoplamiento amina-isotiocianato, para ensamblar sobre la corona primaria de las CDs anfífilas elementos de base bifuncionales con una antena de reconocimiento biológico y un elemento de interacción con el plásmido.

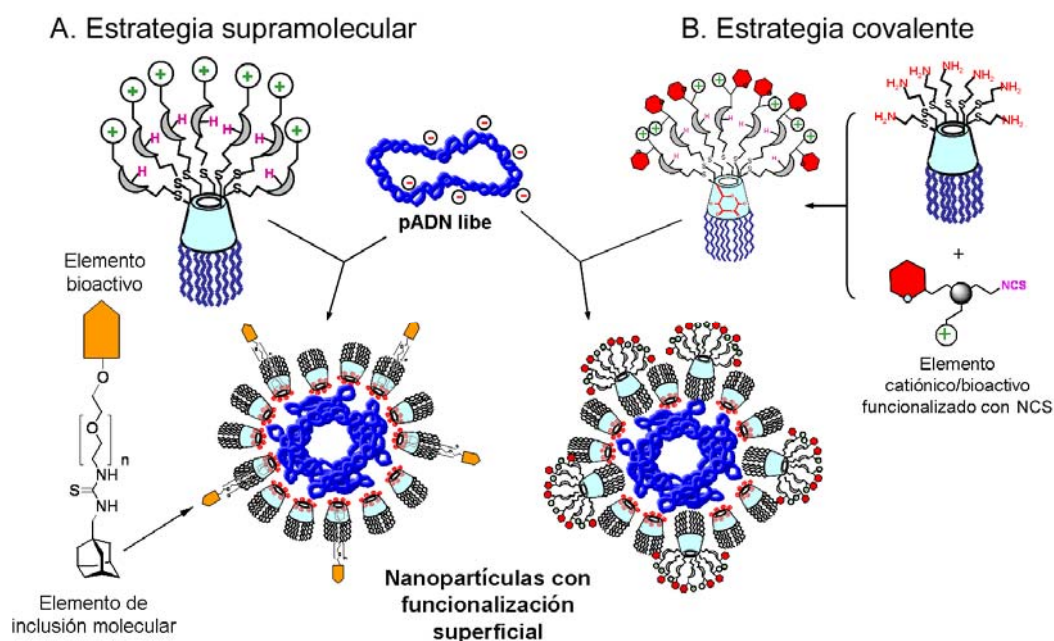


Figura 78. Estrategias para la funcionalización superficial de los CDplejos.

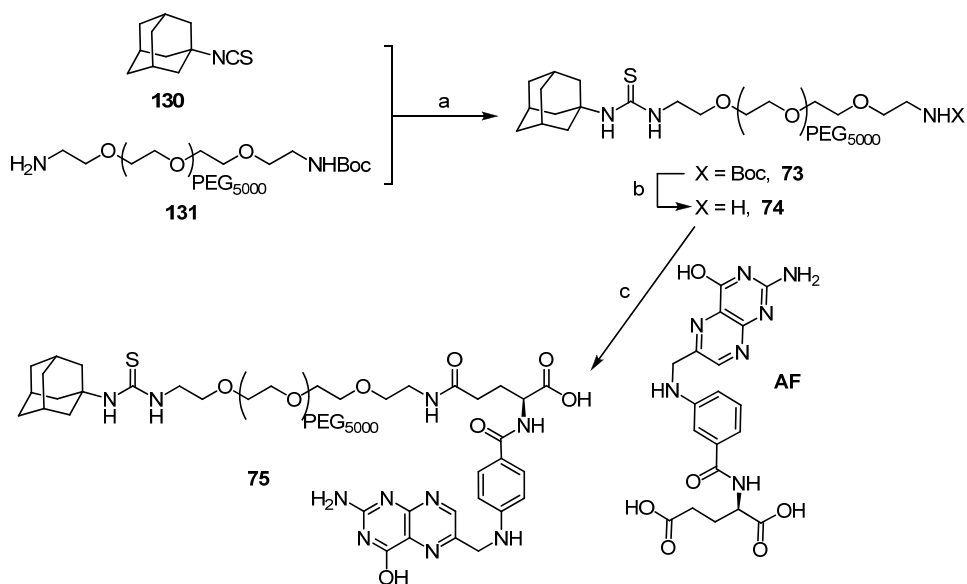
6.2.1. Estrategia para la funcionalización supramolecular de CDplejos

La funcionalización supramolecular requiere el diseño de huéspedes que presenten una alta afinidad por la cavidad de la β CD. A cambio, este método, presenta la ventaja de que permite controlar fácilmente la densidad de funcionalización de la superficie de la partícula sobre la base de la proporción de huésped añadido. En este sentido, la alta afinidad que presenta la molécula de adamantano por la β CD¹⁶⁰ la convierte en un candidato muy adecuado en el que basar el diseño de las moléculas objetivo. Más aún cuando es relativamente sencilla la obtención de sus derivados.

Para explorar esta aproximación se ha diseñado un derivado de adamantano funcionalizado con ácido fólico (AF, marcador muy utilizado para el reconocimiento de células cancerosas y/o inducción de endocitosis vía EDCav)³⁴⁰ en el otro extremo de un espaciador de polietilenglicol (PEG) (Esquema 21). Además de servir de espaciador, el

PEG suele emplearse como agente biocompatibilizador de vectores artificiales, ya que contribuye a crear una cubierta que protege la nanopartícula de interacciones inespecíficas.

La obtención de este derivado es relativamente simple a través de una síntesis en tres etapas con buenos rendimientos (Esquema 21). En primer lugar se llevó a cabo el acoplamiento del 1-adamantil isotiocianato (**130**) con un derivado de PEG comercial (peso molecular promedio 5 kDa) selectivamente protegido (**131**) a través de un puente de tiourea. La hidrólisis del grupo carbamato del otro extremo de la cadena de PEG seguida del acoplamiento peptídico del ácido fólico (**AF**) permitió aislar, tras purificación mediante cromatografía de permeación sobre gel, el derivado **75**.



Esquema 21. Síntesis del derivado **75**. Reactivos y condiciones: a) Et₃N, CH₂Cl₂, 24 h, 99%; b) 1:1 TFA-H₂O, 2 h, 99%; c) DCC, Py-DMSO, 48 h, 73%.

Para determinar si el conjugado **75** es capaz de insertarse en las partículas de paCDs:pADN, se estudió en primer lugar la evolución del tamaño y potencial ζ de los complejos **56**:pADN con la adición gradual del conjugado a la suspensión de CDplejos.

El aumento gradual de la concentración de **75** indujo un aumento del tamaño de las partículas y una disminución de su potencial ζ , hasta alcanzar un valor estable (Figura 79). Esta observación es consistente con la incorporación de los derivados de adamantano a los CDplejos. Por un lado, el aumento del diámetro hidrodinámico debe ser consecuencia del propio recubrimiento de las partículas por las cadenas de PEG. Por otro, la disminución del potencial ζ se puede explicar en base tanto al apantallamiento que ejercen las propias cadenas de PEG alrededor de las partículas como a la incorporación de grupos cargados negativamente (carboxilato de **AF**). Sin embargo, estos datos no permiten concluir si el adamantano se aloja en la cavidad de la CD o se inserta en la zona hidrófoba creada por las cadenas de hexanoilo.

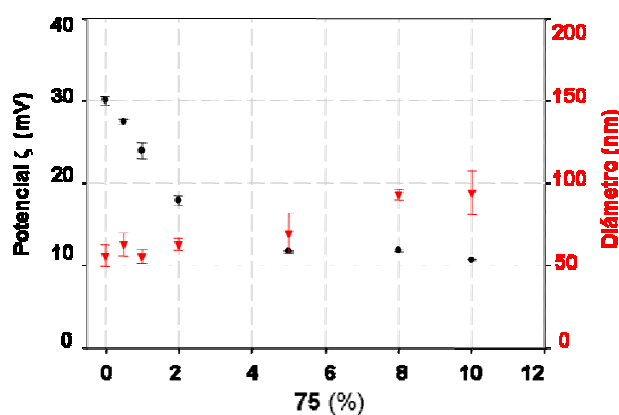


Figura 79. Variación en el potencial ζ y en diámetro hidrodinámico de las nanopartículas **56:pADN** (N/P 10) al adicionar cantidades crecientes de **75**.

Los experimentos de transfección en células BNL-CL2 con nanopartículas de **56:pADN:75** indican una eficacia dos veces superior a la de las partículas sin **AF**, aunque es cierto que este incremento de eficacia sobre los valores de por sí elevados que se obtienen con los CDplexos **56:pADN** está dentro del margen de error de la técnica en el rango de lectura.

6.2.2. Estrategia para la funcionalización covalente de CDplejos

La estrategia sintética desarrollada para la síntesis de paCDs estaba especialmente concebida para generar diversidad molecular de forma modular y convergente. Este hecho ofrece una oportunidad excelente para abordar el diseño de estructuras más elaboradas manteniendo la simetría original del núcleo de CD.

Resulta interesante estudiar el efecto que tendría la presencia de entidades sacarídicas en las estructuras de paCDs sobre sus propiedades de autoensamblaje, transporte y protección de genes y transfección. Dichas estructuras podrían permitir modular racionalmente la eficacia y/o la selectividad de la transfección hacia determinadas células diana. Con este propósito se ha abordado el diseño de una nueva familia de CDs anfífilas funcionalizadas con antenas sacarídicas (Figura 80). Alentados en la eficacia que han mostrado los *glicovirus* de Aoyama,²⁹³ basados en calixarenos anfífilos, como sistemas autoensamblables de transporte génico, se han preparado CDs glicoanfífilas neutras (GaCDs) (Figura 80B) y policationicas (pGaCDs) (Figura 80C).

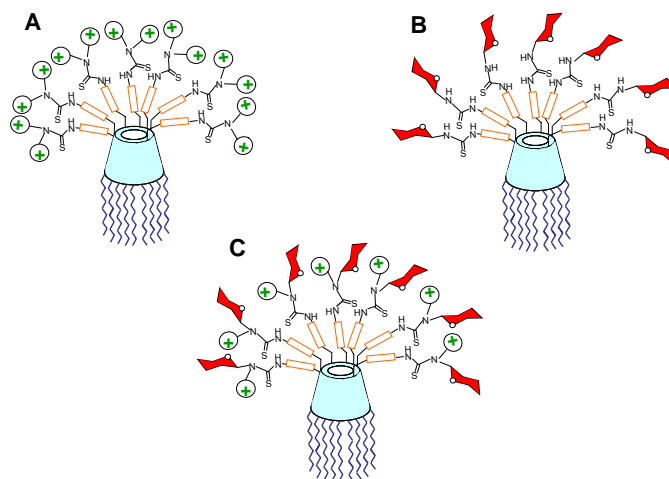


Figura 80. Representación esquemática de los tipos de CDs anfífilas: A, CDs policationicas anfífilas (paCDs); B, CDs glicoanfífilas (GaCDs); C, CDs policationicas glicoanfífilas (pGaCDs).

La síntesis de ambas series se basa en la construcción de elementos de base glicosilados que se unen al núcleo de CD anfifílica a través de uniones tiourea. Esta estrategia, además de mantener las ventajas sintéticas descritas en el capítulo 4, permite mantener la presencia de los grupos donadores de enlace de hidrógeno, que facilitan la unión al material génico incluso en el caso de las GaCDs neutras.

Se sintetizaron inicialmente dos derivados con distinta densidad de azúcares sobre el núcleo de CDs. Para ello se prepararon los conjugados manosilados **132**³⁴¹ y **78** (Figura 81) a partir del trimanosido **133**²⁸ (Esquema 22). Teóricamente, **133** podría ensamblarse directamente sobre el heptaisotiocianato **123**, sin embargo, la congestión estérica impide que la reacción se complete. Por este motivo se introdujo un espaciador de seis átomos de carbono. Así, **133** se acopló con 6-(*tert*-butoxicarbonilamino)-1-hexilamina para dar **76** y seguidamente se procedió a eliminar los grupos protectores para llegar al trismanosido **78** con un rendimiento global del 83 % (Esquema 22).

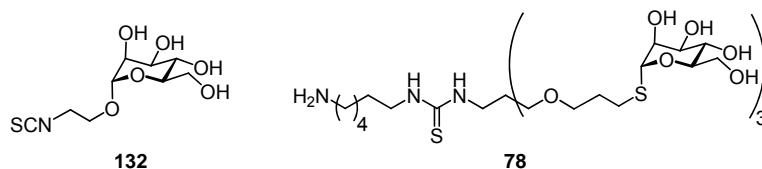
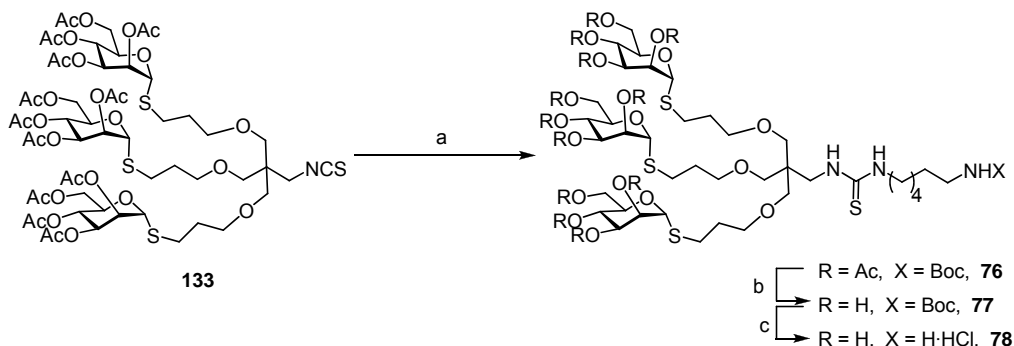
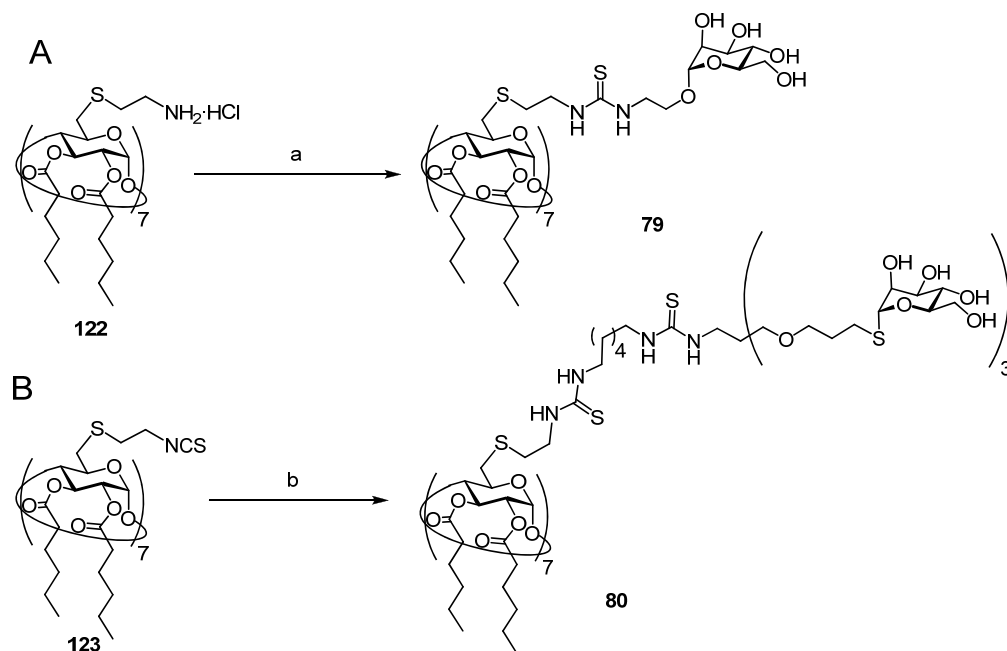


Figura 81. Estructuras de conjugados manosilados **132** y **78**.



Esquema 22. Síntesis del trismanosido **78**. Reactivos y condiciones: a) BocHN(CH₂)₆NH₂, Et₃N, CH₂Cl₂, 24 h, 89%; b) MeONa, MeOH, 16 h, 94%; c) i, 1:1 TFA-CH₂Cl₂, 2 h; ii, HCl, 99%.

El acoplamiento de **132** sobre la heptaamina **122** se realizó en condiciones estándar. Las dificultades asociadas a la purificación de **90** son el motivo del rendimiento moderado de la reacción (Esquema 23A). Por su parte, el acoplamiento de **78** sobre **123** no pudo llevarse a cabo en las mismas condiciones por falta de solubilidad de los reactivos, aunque el cambio de disolvente por DMF permitió obtener **91** con un excelente rendimiento (Esquema 23B).



Esquema 23. Síntesis de las CDs glicoanfilicas (GaCDs) **79** (A) y **80** (B). Reactivos y condiciones: a) **132**, 2:1 acetona- H_2O ; pH 8 (NaHCO_3), 18 h, 38%; b) **78**, NaHCO_3 , DMF, 18 h, 87%.

Desafortunadamente, el compuesto **79** no resultó eficaz como vector de genes. De hecho, no fue capaz de formar agregados ni en ausencia ni en presencia de pADN. Curiosamente, CDplejos formulados con mezclas de **70** y **79** siguieron resultando ineficaces para promover la transfección sobre células BNL-CL2 y COS-7, incluso empleando proporciones relativamente bajas (5-10 %) de la GaCD **79** (Figura 82).

El compuesto **80**, por su parte, sí forma nanopartículas en presencia de pADN, pero su capacidad de transfección es residual en las líneas celulares estudiadas usando concentraciones del compuesto de 22 y 44 μM , respectivamente* (Figura 82).

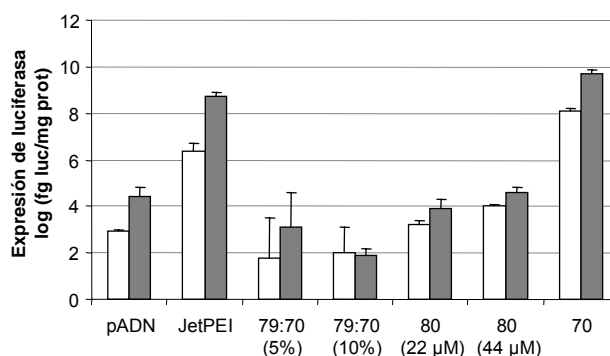


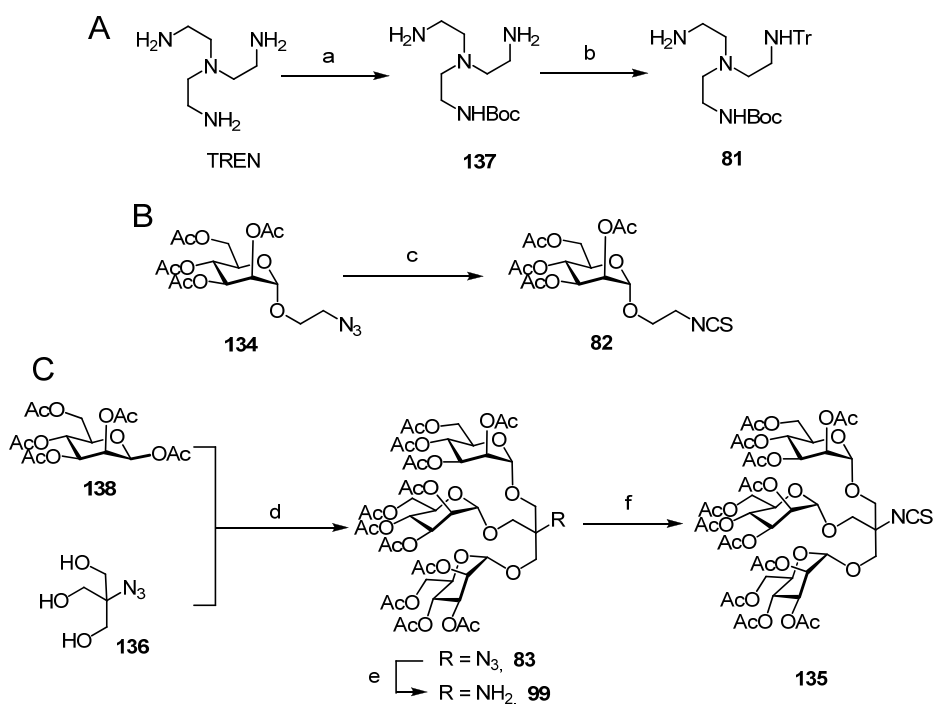
Figura 82. Eficacia de transfección en BNL-CL2 (barras blancas) y COS-7 (barras grises) de los glicoCDplejos **79:70**:pADN y **80**:pADN en comparación con pADN desnudo, poliplejo JetPEI™:pADN y CDplejos **70**:pADN a N/P 10.

Estos resultados confirman la hipótesis ya formulada en el capítulo 4 sobre la presencia de grupos cargados positivamente como requisito crítico para una complejación y transporte eficaz de los pADN en esta familia de vectores moleculares. La presencia de los compuestos neutros parece introducir algún tipo de defecto en la estructura del

* En este caso no cabe expresar la relación GaCD:pADN en términos de N/P dado que el vector no presenta grupos protonables. Las concentraciones de 22 y 44 μM se corresponden con las empleadas en el caso de pACDs para relaciones de N/P 5 y 10, respectivamente.

CDplejo que conduce a la desestabilización del agregado supramolecular y a la liberación del plásmido en un estadio inadecuado.

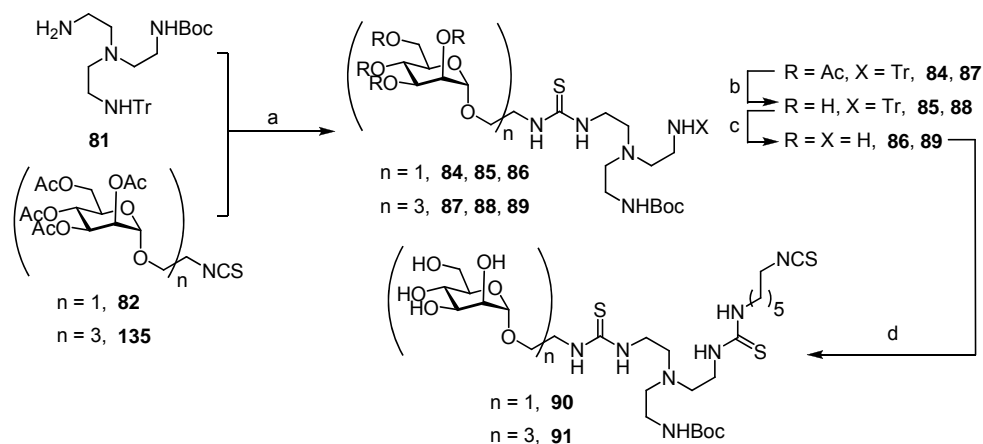
Para tratar de resolver este problema, se sintetizaron dos nuevos glicoderivados heteromultivalentes con una presentación ordenada en el espacio de residuos de α -manopiranosilo y segmentos de 2-aminoetilurea. La síntesis de las antenas heterobifuncionales de estos compuestos (Esquema 24) comienza con el elemento de ramificación ortogonalmente protegido **81**, preparado a partir de tris(2-aminoetil)amina (TREN) mediante protección estadística secuencial con Boc_2O y TrCl.



Esquema 24. Síntesis de los elementos de base. Reactivos y condiciones: a) Boc_2O , dioxano- H_2O , pH 9, 18 h, 15%; b) TrCl, Py, 15 h, 70%; c) TPP-CS₂, dioxano, 72 h, 90 %; d) Et₂O·BF₃, CH₂Cl₂, 24 h, 50%; e) Pd/C, H₂, 18 h, 99%; f) Cl₂CS, CaCO₃, CH₂Cl₂-H₂O, 2 h, 90%.

El elemento de base **82** se preparó por transformación directa azida→isotiocianato del conjugado manosilado **134**³⁴² con el sistema TPP/CS₂.³⁴³ Para el isotiocianato **135**²⁵ se ha diseñado una ruta alternativa basada en la glicosidación directa de la azida **136**³⁴⁴ (Esquema 24), seguida de hidrogenación catalítica del grupo azida e isotiocianación con tiofosgeno del grupo amino resultante. Esta ruta acorta el esquema sintético en cinco etapas de reacción respecto al procedimiento inicialmente descrito en la bibliografía.⁹⁵

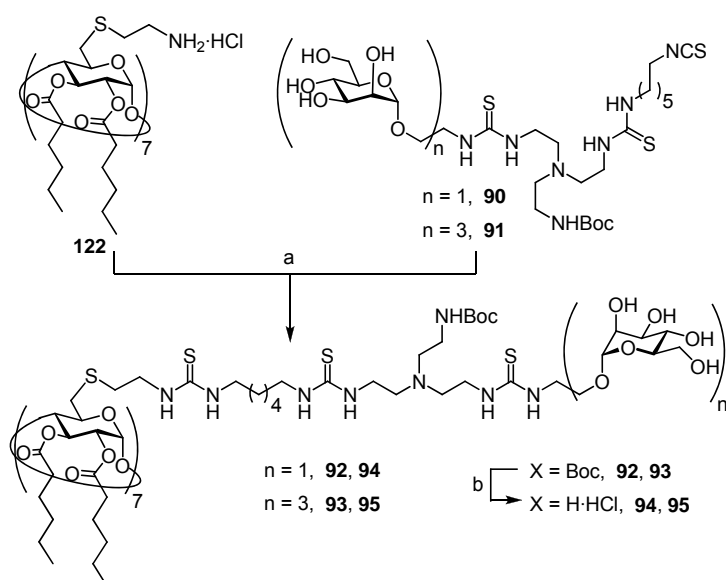
La adición nucleófila del grupo amino de **81** a los isotiocianatos **135** y **82** condujo a los derivados mono- y trimanosilado **84** y **87**, respectivamente, con buenos rendimientos (Esquema 25). La hidrólisis secuencial de los grupos acetilo y tritilo permitió obtener los conjugados **86** y **89**, a los que se incorporó un espaciador de 6 átomos de carbono por conjugación con 1,6-hexametilendiisotiocianato.³⁴⁵ Por un lado, el espaciador asegura la accesibilidad al núcleo de la CD y, por otro, permite incorporar la funcionalidad isotiocianato como elemento reactivo (Esquema 25).



Esquema 25. Síntesis de los dendrones heterobifuncionales **90** y **91**. Reactivos y condiciones: a) Et₃N, CH₂Cl₂, 14 h, 80-98%; b) MeONa, MeOH, 16 h, 97-99%; c) 1% TFA-CH₂Cl₂, 1 h, 99%; d) SCN(CH₂)₆NCS, acetona-H₂O, 24 h, 31-69%.

El acoplamiento de **90** y **91** sobre **122** en DMF en medio básico (Et_3N) evolucionó lentamente, pero permitió aislar con buenos rendimientos los conjugados **92** y **94**. La hidrólisis final del carbamato conduce a los derivados pGaCDs **93** y **95** (Esquema 26).

Los espectros de RMN y EM-ESI, así como el análisis elemental, de **93** y **95** son consistentes con una simetría C_7 , lo que respalda la eficiencia de la estrategia sintética. Ambos compuestos se autoensamblan en presencia de pADN formando *glicoCDplejos* estables (80 ± 35 nm de diámetro y 40 ± 1 mV de potencial ζ para los complejos **93**:pADN a N/P 10). Se ha comprobado mediante experimentos de electroforesis en gel de agarosa utilizando bromuro de etido como agente intercalante que el pADN está completamente protegido en estos complejos.



Esquema 26. Síntesis de las pGaCDs **93** y **95**. Reactivos y condiciones: a) Et_3N , DMF, 40°C , 24-48 h, 70-72%; b) i, 1:1 TFA- CH_2Cl_2 , 2 h; ii, HCl, 99%.

La eficacia de transfección de estos compuestos se determinó en las líneas celulares BNL-CL2 y COS-7. Con fines comparativos y como controles se utilizó también pADN desnudo, poliplejos de JetPEITM (PEI lineal)^{234,279} y CDplejos de **70** (Figura 83). Se observa que los glicoCDplejos formados por **95** no son capaces de favorecer la expresión del gen en ninguna de las dos líneas celulares, probablemente debido a que el balance de los distintos grupos presentes sobre la molécula no es el adecuado. Sin embargo, es muy interesante el hecho de que los glicoCDplejos de **93** son capaces de promover la expresión de luciferasa selectivamente en las células COS-7 y con una eficacia apenas un orden de magnitud por debajo de la de la PEI.

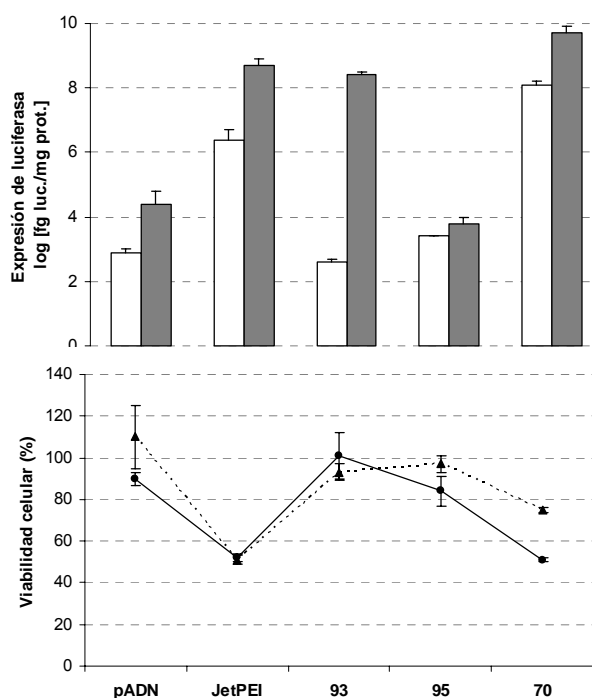


Figura 83. Eficacia de transfección (arriba) y viabilidad celular (abajo) en BNL-CL2 (barras blancas y ▲) y COS-7 (barras grises y ●) de los glicoCDplejos **93**:pADN y **95**:pADN frente a pADN desnudo, poliplejos JetPEITM:pADN y CDplejos **70**:pADN a N/P 10.

Otra diferencia importante es que los glicoCDplejos, a diferencia de los CDplejos descritos anteriormente (capítulo 4), sí se ven afectados por la presencia de suero en el medio, llegando incluso a inhibirse la transfección (Figura 84).

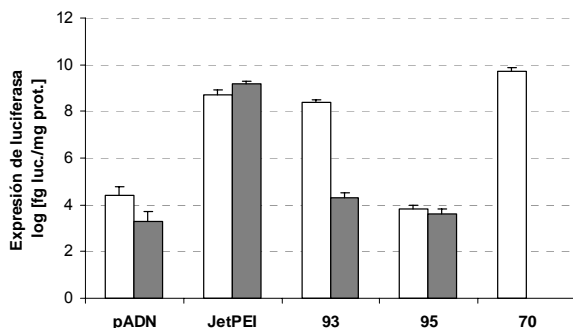


Figura 84. Eficacia de transfección en COS-7 en ausencia (barras blancas) y presencia (barras grises) de suero (10%) de los glicoCDplejos **93**:pADN y **95**:pADN frente a pADN desnudo, poliplejos JetPEITM:pADN y CDplejos **70**:pADN a N/P 10.

Al contrario de lo que cabría pensar, el que la transfección no se vea afectada en presencia de D-manosa (1 mM), parece indicar que la selectividad de estos complejos no se debe al reconocimiento por parte de receptores de la membrana celular (Figura 85).

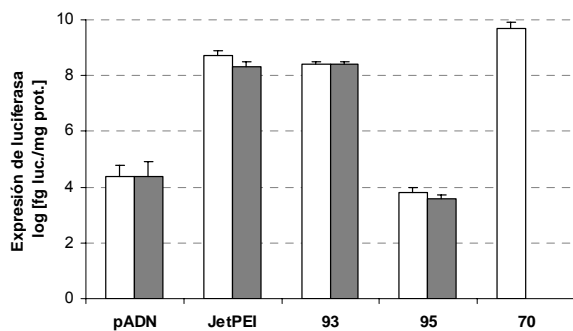


Figura 85. Eficacia de transfección en COS-7 en ausencia (barras blancas) y presencia (barras grises) de D-manosa (1 mM) de los glicoCDplejos **93**:pADN y **95**:pADN frente a pADN desnudo, poliplejos JetPEITM:pADN y CDplejos **70**:pADN a N/P 10.

Con objeto de estudiar el proceso de internalización de los glicoCDplejos formados por **93**, se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo (*Fluorescence-activated cell sorting*, FACS) utilizando pADN marcados con sondas fluorescentes. Dichos experimentos mostraron que los glicoCDplejos formados por **93** se internalizan en ambas líneas celulares. De acuerdo con los experimentos de transfección, la internalización no se ve afectada por la presencia de manosa en el medio (Figura 86). Estos resultados confirman la hipótesis de que la discriminación de los glicoCDplejos a nivel celular no se debe al reconocimiento por receptores de la membrana celular. Dicha diferenciación ocurre más bien en el interior celular y podría estar asociada a los mecanismos del transporte en los endosomas o bien por el reconocimiento por receptores internos de la célula.

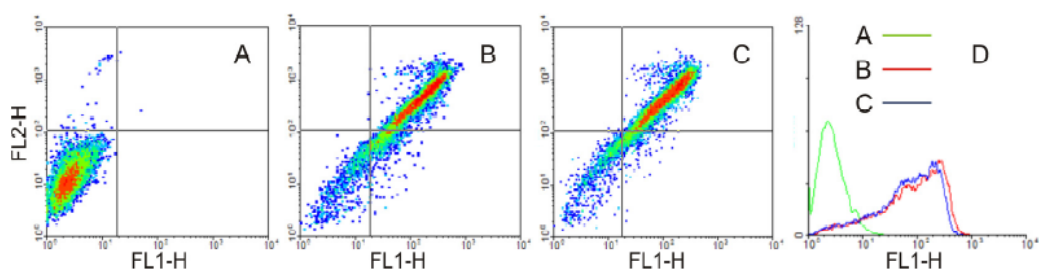


Figura 86. Internalización de los glicoCDplejos **93**:pADN en células COS-7 monitorizada por citometría de flujo: A, células control; B, células incubadas con los glicoCDplejos; C, células incubadas con los glicoCDplejos en presencia de D-manosa (1 mM).

En resumen, en este capítulo se han explorado dos alternativas para la elaboración de CDplejos multifuncionales. Estas estructuras combinan la capacidad de autoensamblaje de las paCDs con las características de biocompatibilidad y biorreconocimiento tanto de antenas sacarídicas como de ácido fólico. La alternativa supramolecular resulta muy versátil aunque no permite un control preciso de la funcionalización de la superficie de los CDplejos. Por otra parte, la alternativa covalente,

con una disposición regular de los elementos funcionales, es de gran importancia para la formación de complejos nanométricos estables capaces de transfectar células. Formulaciones combinadas de paCD-GaCD (70-79) no presentan dicha capacidad. Los estudios realizados muestran que la capacidad de transfección es muy dependiente de la estructura de las moléculas que forman el complejo. La selectividad y la eficacia de transfección, la capacidad de complejación, compactación y transporte del pADN o la biocompatibilidad y el transporte activo de los complejos pueden ser regulados finamente mediante una cuidadosa elección y disposición de los elementos de los vectores.

7. CONCLUSIONES

7. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta Tesis han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1.- Se ha demostrado la eficacia del anclaje de seguridad de Ellman para la funcionalización selectiva de plataformas moleculares, en particular para la incorporación de grupos protonables y de ligandos glucídicos. La metodología desarrollada permite la elaboración rápida y flexible de conjugados homo- y heteromultivalentes sobre un soporte sólido y su transferencia quimioselectiva sobre macromoléculas como CDs o plataformas multifuncionales como poliaminas. El esquema sintético se ve significativamente acelerado, mientras que las purificaciones se hacen prácticamente innecesarias, dos de los inconvenientes asociados a la síntesis clásica de conjugados multivalentes.

2.- Se ha puesto de manifiesto la utilidad del concepto de complementariedad de simetría en el diseño de ligandos capaces de bloquear el poro que permite la internalización de los factores responsables de la muerte celular en la infección por ántrax. Un modelo basado en la funcionalización con grupos cargados de la β CD, compatible con la simetría heptamérica del canal $[AP_{63}]_7$, ha resultado eficaz para proteger las células frente a dosis letales de la toxina. Además, las propiedades de inclusión de la β CD se pueden explotar para generar estructuras supramoleculares que mejoren la actividad antitoxina. Por ejemplo, el empleo de huéspedes apropiados ha permitido la formación de complejos diméricos en los que la disposición de los grupos cargados puede permitir un bloqueo más eficaz del canal.

3.- Se ha desarrollado una estrategia sintética para la preparación de CDs anfífilas y policationicas (paCDs), de estructura molecular bien definida, capaces de interactuar eficazmente con plásmidos de ADN (pADN) para formar complejos (CDplejos) en los que el material génico está protegido. La metodología aprovecha la diferencia de reactividad entre los hidroxilos de la cara primaria y secundaria de las CDs para introducir elementos catiónicos en la primera y cadenas alifáticas en la segunda. La estructura molecular de las paCDs puede ser manipulada en términos de densidad de carga, flexibilidad y/o presencia de grupos adicionales manteniendo la simetría original, lo que permite controlar sus propiedades de autoensamblaje tanto en presencia como en ausencia de pADN.

4.- La eficacia de los CDplejos como vectores de genes para transfección celular alcanza niveles similares (eventualmente superiores) a los que muestran vectores sintéticos comerciales como bPEI o jetPEI, manteniendo unos niveles de toxicidad más favorables. Este comportamiento se ha comprobado en diferentes líneas celulares, tanto en ausencia como en presencia de suero. La elaboración de una colección de paCDs ha permitido elucidar los elementos estructurales que potencian la capacidad de transfección de estos vectores, entre los que la presencia de grupos donadores de enlaces de hidrógeno desempeña un papel fundamental.

5.- La monitorización del proceso de internalización celular de CDplejos marcados con una sonda fluorescente permitió observar su acumulación en las proximidades del núcleo. La internalización de los CDplejos ocurre principalmente por mecanismos de endocitosis dependiente de clatrina y caveolina. Sin embargo, la expresión del gen es debida, casi exclusivamente, a los complejos internalizados por la ruta dependiente de caveolina. El nivel de expresión asociado a los complejos internalizados por el mecanismo dependiente de clatrina es prácticamente nulo. Aparentemente, estos CDplejos son degradados antes de escapar del endosoma.

6.- La posibilidad de combinar estrategias de funcionalización supramoleculares y covalentes, que aprovechan la capacidad de inclusión molecular de las CDs y la flexibilidad del esquema sintético, respectivamente, ha permitido la manipulación de la superficie de los CDplejos. Se ha comprobado que esta manipulación, por ejemplo a través de la incorporación de antenas de reconocimiento biológico (tales como ligandos de tipo folato o carbohidrato), puede modular la capacidad de transfección de los CDplejos, no solo en términos de eficacia, sino también de biocompatibilidad y selectividad. La aproximación desarrollada presenta, por tanto, un fuerte potencial para la elaboración de virus artificiales, en los que diferentes elementos funcionales se autoensamblen para producir una estructura supramolecular que proteja el material génico en el medio biológico, facilite su paso a través de membranas y alcance el núcleo de las células diana para que se exprese la proteína codificada.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8. Parte experimental

8.1. Métodos generales

La **cromatografía analítica** en capa fina (c.c.f.) se ha realizado empleando cromatoplasmas de aluminio prefabricadas *Sílica Gel 60 F₂₅₄ Merck* de 0.25 mm de espesor. La detección de los compuestos en las placas se ha realizado por exposición de las mismas a una fuente de luz UV (λ 254 nm) y mediante revelado por inmersión en disoluciones de ácido sulfúrico al 10% en etanol, ninhidrina al 0.1% en etanol, ácido fosfomolibdico al 5% en etanol o revelador de Mostain (20 g de molibdato amónico (VI) tetrahidratado, 0.4 g de sulfato de cerio hidratado y 10% de ácido sulfúrico en 400 mL de H₂O) y calentamiento a 100 °C.

Con **fines preparativos** se ha utilizado la cromatografía en columna empleando como relleno *Sílice 60 A.C.C. Chromagel* (SDS) (tamaño de partícula 0.03-0.07 mm), eluyendo por gravedad o sometiendo a ligera presión. La cromatografía de permeación sobre gel (GPC) se ha llevado a cabo en columnas rellenas con *Sephadex LH-20* y *Sephadex G-25* (GE Healthcare) empleando como eluyente MeOH y H₂O desgasificados, respectivamente, y como impulsor una bomba peristáltica *Pharmacia Biotech Pump P-1*.

Los **poderes rotatorios** se han medido a 20 ± 2 °C en un espectropolarímetro *Perkin-Elmer 341* empleando la línea D del sodio (λ 589 nm), concentraciones del 0.2-1% (p/v) y celda de 1 dm.

Los **análisis elementales** se han realizado en el Centro de Investigaciones Científicas "Isla de la Cartuja" (CSIC-Universidad de Sevilla) empleando un analizador elemental *Leco CHNS-932* o *Leco TruSpec CHN*.

Los **espectros de absorción en el IR** se han realizado en un espectrofotómetro FTIR *Vector 22* (*Bruker*). Se han registrado a partir de muestras preparadas en película entre dos ventanas de cloruro sódico, presentándose los datos indicando los números de onda correspondientes a los máximos de absorción más característicos de la estructura.

Los **espectros de ¹H RMN** se han registrado en espectrómetros *Bruker AVANCE*

300 (300 MHz), Bruker AVANCE DRX 400 (400 MHz) y Bruker AVANCE DRX 500 (500 MHz). Se han usado disoluciones en CDCl_3 , MeOD, DMSO- d_6 y D_2O . La asignación de las señales se ha completado con la realización de experimentos de correlación homonuclear 2D COSY (*Correlated Spectroscopy*) y 1D TOCSY (*Totally Correlated Spectroscopy*). Los valores de desplazamiento químico se dan en ppm, usando como referencia interna la señal del disolvente. Los valores de las constantes de acoplamiento (J) se miden en Hz. Las abreviaturas para indicar la multiplicidad de las señales son: s (singlete), d (doblete), t (tripleto), c (cuartete), q (quintete) y m (multiplete). La abreviatura “a” indica que la señal es “ancha”.

Los **espectros de ^{13}C RMN** se han registrado a 75.5, 100.6 y 125.7 MHz en los espectrómetros indicados para espectros de ^1H RMN. Para la interpretación de algunos espectros se han empleado técnicas de correlación heteronuclear 2D ^1H - ^{13}C (HMQC, *Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence experiment*).

Los **espectros de masas** se han realizado empleando la técnica de ionización por electrospray (ESI) en un espectrómetro Bruker Esquire6000. Para ello se emplearon disoluciones de las muestras en H_2O , MeOH, MeCN o sus mezclas, de concentración en el rango μM . Las muestras se introdujeron mediante inyección directa usando una jeringa Cole-Palmer a un flujo de 120 $\mu\text{L}/\text{h}$.

Métodos generales de síntesis en disolución

Las **reacciones de acetilación** se llevaron a cabo disolviendo el compuesto en una mezcla de Ac_2O -Py (1:1, 10 mL por 1 g de compuesto) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a t.a., se vertió sobre H_2O /hielo y se extrajo con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó sucesivamente con H_2SO_4 2N y disolución acuosa saturada de NaHCO_3 , se secó y se concentró. Por regla general el residuo se purificó posteriormente por cromatografía en columna de gel de sílice.

Para las **reacciones de desacetilación** se siguió el método de Zemplén,³⁴⁶ usando MeONa (0.1 eq. por mol de acetatos) en MeOH a t.a., seguido de neutralización con la

resina de intercambio iónico Amberlite IR-120 (H^+), filtración y evaporación del disolvente.

Las reacciones de **hidrólisis de los grupos protectores carbamato** se llevaron a cabo disolviendo en compuesto en un mezcla CH_2Cl_2 -TFA (1:1) y agitando la mezcla a t.a. durante 2 h. El disolvente se eliminó a presión reducida coevaporando varias veces con H_2O y el residuo resultante se liofilizó con una disolución diluida de HCl, obteniéndose los compuestos como sus respectivos hidroclouros.

Métodos generales de síntesis en fase sólida

Se utilizó la resina 4-sulfamilbutiril AM (0.39 mmol/g) (NovaBiochem). Las reacciones en fase sólida se llevaron a cabo en jeringas de plástico con filtros de teflón. Las reacciones de acoplamiento peptídico de los ácidos carboxílicos a las resinas funcionalizadas con grupos amino se llevaron a cabo empleando los ácidos preactivados. Para la preactivación el ácido carboxílico se disolvió en DMF y se añadieron en este orden DIPEA (3 eq.) y TBTU (2 eq.) y se agitó durante 5 minutos. Las reacciones de acoplamiento peptídico a aminas se monitorizaron mediante el test de Kaiser.³⁴⁷ La eliminación de los grupos Fmoc se llevó a cabo tratando la resina con una disolución de piperidina al 20% en DMF (2 + 18 min), seguido de lavados con DMF (2 min x 6). La hidrólisis de los grupos Boc se llevó a cabo mediante el tratamiento de la resina con una disolución de TFA al 50% en CH_2Cl_2 durante 2 h, seguido de lavados con CH_2Cl_2 (x 4), Et_3N al 1% en CH_2Cl_2 (x 2) y CH_2Cl_2 (x 3). La reducción de los grupos azida se realizó mediante el tratamiento de la resina con una disolución de $SnCl_2$ (3 eq.), 1,3-propanoditiol (4 eq.) y Et_3N (6 eq.) en MeCN durante 24 h a t.a. seguido de lavados con MeCN (x 4), DMF (x 2) y CH_2Cl_2 (x 4). Las reacciones de acoplamiento de isocianatos se llevaron a cabo tratando la resina seca con una disolución del correspondiente isocianato (1.5 eq.) en CH_2Cl_2 recién destilado durante 24 h, seguido de lavados con CH_2Cl_2 (x 4).

Activación y liberación de la resina. En un experimento típico, el glicoconjugado unido a la resina (0.1 g, 0.2 mmol/g) se trató con DMF durante 10-15

min. Se añadió a continuación una disolución en DMF de yodoacetoniitrilo (25 eq.) y DIPEA (10 eq.) previamente filtrada sobre alúmina. La resina se mantuvo durante 24 h protegida de la luz, se lavó con DMF (2 min x 3) y CH_2Cl_2 (2 min x 3) y se secó a vacío. La resina seca se transfirió a un matraz de fondo redondo y se añadió una disolución de la amina correspondiente (0.9 eq.) en DMF. La suspensión se agitó durante 24 h, tras lo cual la resina se separó de la por filtración, se extrajo con DMF (2 min x 3) y los filtrados se unieron y se concentraron.

Medidas de afinidad frente a Concanavalina A. La afinidad de los compuestos por Con A se midió siguiendo el protocolo ELLA (Enzyme-Linked Lectin Assay).¹⁰² Se recubrieron placas de microvaloración Nunc-Inmuno™ (MaxiSorp™) con manano de levadura (100 μL por celda de una disolución de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un tampón de fosfato salino 0.01 M (PBS, pH 7.3 con 0.1 mM Ca^{2+} y 0.1 mM Mn^{2+}) a t.a. durante una noche. Las celdas se lavan posteriormente tres veces con 300 μL de tampón de lavado (PBS conteniendo 0.05% v/v de Tween20® (PBTS)). El proceso de lavado se repitió tras cada incubación. Las celdas se bloquearon con 150 μL por celda de 1% BSA/PBS durante 1 h a 37 °C. Las placas se lavaron y se llenaron con 50 μL por celda de la sal diamónica del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (0.25 mg/mL) en tampón cítrico (0.2 M, pH 4.0 con 0.015% v/v H_2O_2). La reacción se paró después de 20 minutos añadiendo 50 μL por celda de H_2SO_4 1 M y se midió la absorbancia a 415 nm. Se emplearon para los experimentos de inhibición aquellas concentraciones de lectina-conjugado cuyas absorbancias mostraban valores entre 0.8 y 1.0. El inhibidor (almacenado en una disolución de 3 mg/mL en PBS) se adicionó de forma que en cada celda hubiese el doble de concentración que la anterior (60 μL por celda en PBS con 60 μL de la Con A-peroxidasa de la concentración adecuada) en microplacas Nunclon™ (Delta) y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Estas disoluciones (100 μL) se transfirieron a las placas recubiertas con manano donde se incubaron durante otra hora a 37 °C. Las placas se lavaron y se llenaron con 50 μL por celda de ABTS y se detuvo la reacción a los

20 minutos y se midió la absorbancia. El porcentaje de inhibición se calculó en función de la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = (A_{(\text{sin inhibidor})} - A_{(\text{con inhibidor})}) / A_{(\text{sin inhibidor})} \times 100$$

Métodos generales de caracterización de nanopartículas

Para la **preparación de nanopartículas a partir de CDs anifilicas** se procedió de la siguiente manera: se pesó la cantidad de muestra necesaria para obtener disoluciones finales de concentración 50 μM (en 4 mL). La muestra se disolvió en la mínima cantidad posible de MeOH de calidad HPLC y se dejó equilibrar durante 20 min. Seguidamente, se evaporó el disolvente aplicando una suave corriente de aire caliente en la base del vial. Una vez evaporado el disolvente, se dejó el vial en una bomba de vacío durante 1 h para asegurar que no quedaran trazas de MeOH. De esta manera se obtuvo una fina capa del compuesto adherida a las paredes del vial. A continuación se añadieron 2 mL de Agua fisiológica precalentada a 48 °C en un termostato y se dejó hidratar la muestra en un termostato a dicha temperatura durante 30 minutos, agitando en caso necesario para homogeneizar la muestra. Después se procedió a la separación de la muestra, pasando 1 mL a otro vial y añadiendo, en el primero, otro mL de agua fisiológica y, en el segundo, 1 mL de H₂O con tampón fosfato 2 mM a pH 7 doblemente filtrada (Millex GS 0.22 μm). Ambas disoluciones se sonicaron en un baño durante 30 minutos y se dejaron equilibrar durante 1 h a t.a.

Para calcular el **tamaño de las partículas, el índice de polidispersidad (IP) y el potencial ζ** se utilizó la técnica de “Dispersión Dinámica de la Luz” (Dynamic Light Scattering (DLS)). El tamaño medio de las nanopartículas se calculó mediante el diámetro hidrodinámico. El diámetro hidrodinámico representa el diámetro de una hipotética esfera rígida que difunde con la misma velocidad que la partícula estudiada. El diámetro calculado mediante las propiedades de difusión es indicativo del tamaño aparente de la partícula solvatada. La dispersión de tamaño de las nanopartículas viene dada por el índice de polidispersidad IP. La dispersión cuasielástica de la luz fue medida usando un

aparato Zetasizer3000, equipado con un correlador K7132 (Malvern Instruments, UK) y un láser de He-Ne (λ 632.8 nm) con una potencia de 10 mV. Las condiciones de medida fueron: ángulo de detección de 90° usando un fotomultiplicador R943-02 con una apertura de 1 mm; temperatura, 25 ± 0.1 °C; viscosidad aparente, 1.054 mPa·s. Las muestras se diluyeron en agua destilada hasta una concentración de 50 μ M antes de realizar las medidas. El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas fue calculado mediante la medida del coeficiente de difusión translacional de las mismas. Se realizaron tres medidas de cada muestra para calcular el diámetro hidrodinámico y el IP.

El potencial ζ es un parámetro que da idea de la carga eléctrica de la superficie de las nanopartículas incluyendo la primera capa de solvatación. La magnitud que se mide es la movilidad electroforética de las partículas, haciendo uso del efecto Doppler en la luz dispersada por las partículas, que puede relacionarse con el potencial ζ . Se midió la movilidad electroforética de las partículas con un aparato Brookhaven ZetaPALS, cuya fuente de luz es un diodo láser de λ 661 nm (con una potencia variable (según la muestra) entorno a 7 mW). Las muestras tenían una concentración de 50 μ M y se añadió NaCl hasta 1 mM para crear un “escudo de carga” que elimine las interacciones entre partículas. Las medidas se realizaron a 25 ± 1 °C. La **tensión superficial** de las muestras, efecto por el cual la superficie de un líquido tiende a comportarse como si fuera una delgada película elástica, se midió por el método del anillo de Du Noüy³⁴⁸ utilizando una balanza Mettler Toledo (precisión de 0.1 mg) y un anillo de platino de 2.5 cm de diámetro. Las medidas se llevaron a cabo a t.a. y los datos considerados son el promedio resultante de 10 medidas.

Para determinar la **concentración micelar crítica** (c.m.c.) se midió la tensión superficial de disoluciones del compuesto con distintas concentraciones, empezando en 40 μ M y obteniendo las demás por sucesivas diluciones al 50% con H₂O de calidad HPLC filtrada (Millex GS 0.22 μ m) hasta 0.625 μ M.

La determinación del **tamaño y del potencial ζ de los complejos paCD-pADN** se realizó mediante la técnica DLS. El tamaño medio de las partículas se midió usando un Zetasizer Nano (Malvern Instruments) con las siguientes especificaciones: tiempo de

muestreo, automático; número de medidas, 3 por muestra; viscosidad del medio, 1.054 cP; índice de refracción, 1.333; ángulo de dispersión, 173°; λ 633 nm; temperatura, 25 °C. Los datos indicados son el diámetro medio de la mayor población en la distribución de volumen con su desviación estándar. Antes de cada experimento, la estabilidad de las medidas se comprobó con esferas de látex de 90 nm monodispersas (Coulter).

El potencial ζ de los CDplejos se midió con el mismo aparato utilizando el análisis de Fase por Medida en Modo Mixto de la Dispersión de la Luz (“Mixed Mode Measurement Phase Analysts Light Scattering”, M3-PALS), que consiste en medidas tanto de retroceso en campo lento como de retroceso en campo rápido que mejora la resolución. Se aplicaron las siguientes especificaciones: tiempo de muestra, automático; número de medidas, 3 por muestra; viscosidad del medio, 1.054 cP; constante dieléctrica del medio, 80; temperatura 25 °C. Antes de cada experimento, la estabilidad de las medidas se comprobó con una disolución estándar DTS 50 (Malvern).

Métodos generales de caracterización de CDplejos y de determinación de su capacidad de transfección

La **preparación de complejos CD-pADN (CDplejos)** para experimentos de transfección se realizó con el plásmido pTG11236³⁴⁹ (pCMV-SV40-luciferasa-SV40pA), que es un plásmido de 5739 pares de bases. Dicho plásmido se disolvió en tampón HEPES (20 mM, pH 7.4) para los complejos con CDs y bPEI o en una disolución de NaCl 150 mM para los de JetPEI. Las cantidades de compuesto se calcularon de acuerdo con los valores deseados para la concentración de pADN (0.1 mg/mL, 303 μ M fosfato) y la relación N/P, teniendo en cuenta el peso molecular y el número de grupos catiónicos del derivado de CD o del catión polimérico (25 kDa para bPEI y 22 kDa para JetPEI). La cantidad de derivado de CD necesaria se añadió de una disolución madre (10-20 mM en DMSO). bPEI se añadió de una disolución madre 0.1 M en H₂O y JetPEI de una disolución madre 7.5 mM en H₂O. Las preparaciones se agitaron vigorosamente durante

dos horas para la caracterización de los experimentos de transfección. Los experimentos se llevaron a cabo para valores de N/P entre 5 y 50.

Para los experimentos de **inhibición de la endocitosis** se utilizó el plásmido pGL4.13 (Promega). El plásmido fue transformado en la cepa competente *E. coli* DH10b (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bacterias transformadas fueron seleccionadas por su resistencia a la ampicilina y cultivadas hasta una densidad óptica de 1.5. El plásmido se purificó con el kit PureLink™ HiPure Plasmid Gigaprep Kit (Invitrogen). El plásmido se resuspendió hasta una concentración de 1 µg/µL en tampón TE (10 mM Tris, 1 mM AEDT, pH 7.4). Para la preparación de los complejos, la cantidad necesaria de pADN se diluyó en OptiMEM® hasta una concentración de 0.04 µg/µL (124 µM en fosfato) y se añadió la cantidad necesaria de paCD desde una disolución madre de 20 mg/mL (4.2 mM) en DMSO-H₂O 1:2. La mezcla se agitó durante 12 min antes de diluirla 10 veces en OptiMEM®.

Para la **electroforesis sobre gel de agarosa**, cada complejo CD:pADN (20 µL, 0.4 µg de plásmido) se sometió a electroforesis durante 30 min bajo 150 V a través de un gel de agarosa al 0.8% en tampón TAE (Tris-acetato-AEDT) y se reveló pulverizando con una disolución de bromuro de etidio (Sigma) en tampón TAE (20 µL de bromuro de etidio de una disolución de 10 mg/mL en 200 mL de TAE). El ADN se visualizó por fotografía en un transiluminador UV. La integridad del plásmido de cada muestra se confirmó por electroforesis después de la descomplejación inducida con dodecilsulfato sódico (SDS, 8%).

El **cultivo de células** se llevó a cabo en las siguientes condiciones: Las células BNL-CL2 (células embrionarias hepáticas de roedor), COS-7 (células renales de simio verde africano mutadas con SV-40) y Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano; ATCC número CCL-81) se cultivaron en “Dulbecco’s modified Eagles’ medium” (DMEM) conteniendo 10% de suero fetal, 2 mM L-glutamina, 10 mg/mL de gentamicina (BNL-CL2), 100 µg/mL de estreptomina (COS-7) o 2% de penicilina/estreptomina (Vero) y crecieron a 37 °C en atmósfera conteniendo un 5% de CO₂.

Los **ensayos de transfección** se llevaron a cabo de la siguiente manera: un día antes de los experimentos de transfección, se cultivaron células con una densidad de $2 \cdot 10^4$ células/pocillo en microplacas de 96 pocillos (células BNL-CL2 o COS-7) o $1 \cdot 10^5$ células/pocillo en microplacas de 12 pocillos (células Vero). Los complejos CD:pADN (pTG11236 para BNL-CL2 y COS-7 o pGL4.13 para Vero) y los poliplexos PEI:pADN (pTG11236) se diluyeron a 100 μ L (BNL-CL2 y COS-7) o 333 μ L (Vero) en DMEM o en DMEM suplementado con un 10% de suero (FCS, Sigma) de modo que cada pocillo contuviera 0.5 μ g (BNL-CL2 y COS-7) o 2 μ g (Vero) de ADN. Se eliminó el medio de cultivo y se reemplazó por los correspondientes complejos en DMEM. Tras 4 h y 24 h, se eliminó el medio y se añadió nuevo medio de cultivo con un 10% de suero. La transfección se detuvo a las 48 h, se decantó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con 100 μ L de PBS. Las células se destruyeron con 50 μ L (BNL-CL2 y COS-7) o 200 μ L (Vero) de tampón de lisis (Promega) durante 30 min a t.a. Las suspensiones se centrifugaron a 4 °C y 14000 rpm durante 5 min y se decantaron las mezclas de lisis supernadantes. En caso necesario, las suspensiones resultantes se congelaron a -32 °C antes de llevar a cabo el análisis de la actividad de luciferasa.

El **análisis de actividad de la luciferasa** se llevó a cabo sobre las mezclas de lisis utilizando el sistema de determinación “Promega luciferase assay kit” (Promega) en una placas de 96 pocillos y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un luminómetro LB96P (BERTHOLD) (BNL-CL2 y COS-7) o GloMax™ 96 (Promega) (Vero) en modo dinámico durante 10 s sobre 10 μ L (BNL-CL2 y COS-7) o 40 μ L (Vero) de la mezcla de lisis. La actividad de la luciferasa se calculó en femtogramos (fg) de luciferasas por mg de proteína (BNL-CL2 y COS-7) o como unidades relativas de luz (URL) por mg de proteína (Vero). Cada medida se repitió tres o cuatro veces en experimentos independientes (formulación y transfección).

La **concentración total de proteína** en cada pocillo se determinó mediante el ensayo BCA (Pierce) para los ensayos con BNL-CL2 y COS-7: 25 μ L de lisado celular se mezclaron con 200 μ L de reactivo y la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos, después las muestras se dejaron equilibrar a t.a. durante 5 min y se midió la absorbancia a

562 nm. El ensayo “Biorad Bradford Protein assay” (Biorad) se utilizó para los ensayos con Vero: el reactivo (50 μ L) se añadió sobre la mezcla de lisis (2 μ L) diluida en H₂O (198 μ L) en una placa de 96 pocillos con fondo transparente (Greiner Bio-One), midiéndose la absorbancia en un lector de placas Wallac Victor2 (Perkin Elmer-Cetus Life Sciences) a 590 nm. Cada medida se repitió tres o cuatro veces en experimentos independientes (formulación y transfección).

Como medida de la **viabilidad celular** tras los experimentos de transfección, se determinó la relación porcentual entre la cantidad de proteína total por pocillo de las células transfectadas y la de células no tratadas. En el caso de los ensayos con células Vero, la viabilidad celular se midió con el sistema “CellTiterGlo[®] Proliferation Assay” (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se incubaron con el reactivo “CellTiterGlo[®]” durante 10 min hasta completar la lisis. Seguidamente se mide la luminiscencia en un luminómetro GloMax[™] 96 durante 10 s con 1 s de tiempo de integración. Cada experimento se realizó por cuadruplicado.

Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM). Se colocaron rejillas cubiertas de carbón-Formvar[®], previamente aumentada su hidrofilia mediante descargas luminiscentes, sobre unas gotas de las muestras de CDplejos (HEPES 20 mM, pH 7.4, pADN 303 μ M en fosfato) preparadas como se describió anteriormente. Tras 1-3 min de contacto, las rejillas se tiñeron negativamente con unas gotas de solución acuosa de acetato de uranilo (1%). Las rejillas se secaron y se observaron con un microscopio electrónico Philips CM12, trabajando en condiciones estándar.

Para el **marcaje fluorescente del plásmido** se utilizó el tinte de ácidos nucleicos yoduro de YOYO[®]-1 (λ_{ex} 491, λ_{em} 509, Molecular Probes). Para el marcaje, a 100 μ g de plásmido se añadieron 15 nmol de YOYO[®]-1 en tampón HEPES 20 mM durante 1 h a t.a., lo que debería resultar en el marcaje cada 10 pares de bases del pADN. El complejo YOYO[®]-1-pADN se purificó por precipitación en etanol y resuspendido en tampón TE hasta una concentración de 1 μ g/ μ L.

Para los **experimentos de citometría de flujo con paCDs e inhibidores de endocitosis** se utilizó el plásmido marcado con YOYO[®]-1 para preparar los complejos

correspondientes (N/P 10) como se describe anteriormente. Un día antes de los ensayos se sembraron $3 \cdot 10^5$ células (Vero) en microplacas de 6 pocillos y se cultivaron como se indicó anteriormente. Para el ensayo se sustituyó el medio de cultivo por 2 mL de OptiMEM[®] con los complejos (12 μ g de pADN) y, tras el tiempo de incubación requerido por el experimento, se eliminó el medio con los complejos. La fluorescencia de los complejos no internalizados se eliminó mediante un lavado de 5 min con trypan blue (Sigma) al 0.2% en PBS. Tras el lavado, las células se recolectaron con Tripsina, se centrifugaron y se resuspendieron en tampón de flujo (PBS con 0.1% de azida sódica y 1% de BSA), manteniéndolas a 0 °C hasta su análisis. Las muestras se analizaron con citómetro de flujo FC500 de 5 canales (Beckman Coulter) equipado con un láser de argón (λ_{ex} 488 nm). Se utilizó el programa CXP del aparato para hacer los análisis. La internalización de los CDplejos se calculó como la media de la fluorescencia de tres medidas independientes. El valor basal (0 %) se determinó para células incubadas a 4 °C. En el caso de los experimentos de inhibición de endocitosis, el 100% se determinó para células incubadas sin presencia de ningún inhibidor.

Para los **experimentos de citometría de flujo con glicoCDs**, se utilizó el plásmido marcado con YOYO[®]-1 para preparar los complejos correspondientes de CDs o PEI (N/P 10) como se describe anteriormente. Un día antes de los ensayos se sembraron $1 \cdot 10^5$ células por pocillo en microplacas de 24 pocillos y se cultivaron como se indicó anteriormente. Para el ensayo se sustituyó el medio de cultivo por 500 μ L de medio sin suero, con o sin manosa (según objetivo del experimento) 1 mM y los complejos (2.5 μ g de pADN). Tras el tiempo de incubación requerido por el experimento, se eliminó el medio con los complejos y las células se incubaron durante 15 min con 1 mL de DMEM (sin suero) conteniendo 200 mg/L de timo de ternera para eliminar los agregados unidos inespecíficamente. Después se lavaron dos veces con PBS frío y se recolectaron por tripsinación, se resuspendieron en 500 μ L de DMEM con 10% de suero bovino, se centrifugaron (5 min, 2000 rpm), se volvieron a lavar dos veces con 500 μ L de PBS frío se resuspendieron en PBS con 1% de AEDT. Los análisis de citometría de flujo se

llevaron a cabo con un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences) equipado con un láser de argón (λ_{ex} 488 nm). Los datos se analizaron con el programa winMDI 2.8.

Para los **estudios de inhibición de la endocitosis**, antes de la incubación con los CDplejos, las células Vero fueron preincubadas con clorpromacina, gesniteina, dynasore o MbCD (en las cantidades descritas en el experimento) durante 1 h. Seguidamente este medio se sustituyó por OptiMEM[®] con la misma cantidad de inhibidor y los complejos, con los que se siguió el método general del experimento correspondiente. Las disoluciones madre de inhibidores utilizadas fueron: 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de clorpromazina en H₂O (recién preparada), MbCD 5 mM (6.6 mg/mL) en H₂O (recién preparada), genisteina 50 mM en DMSO (congelada) y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de dinasore en DMSO (congelada).

Monitorización de la internalización celular de CDplejos marcados en tiempo real. Las células Vero se sembraron en una concentración de $4 \cdot 10^5$ células por pocillo en pocillos esterilizados MatTek con cubreobjetos en la base (MatTek Corporation) y se cultivaron (como se indica anteriormente) durante un día antes del experimento. Para el experimento, las células se incubaron con 2 mL de complejos (N/P 10, 12 μg de pADN) con un 20% de paCDs marcadas. Los complejos fluorescentes se visualizaron con Microscopio Láser de Barrido Confocal (CLSM) Nikon C1 (Nikon Benelux) equipado con lentes de inmersión en aceite Plan Apo VC 60x 1.4 NA y los elementos ópticos necesarios para obtener tanto imágenes de transmisión de fluorescencia como de contraste de interferencia diferencial (DIC). Los compuestos marcados con lisamina-rodamina se excitaron utilizando la línea de 561 nm del láser de estado sólido y la luz emitida se seleccionó con un filtro de banda de 580 a 630 nm. Las células se mantuvieron vivas en el microscopio con un incubador que controlaba la temperatura, la humedad y la presión de CO₂ (Tokai Hit). Las imágenes en 2D se tomaron, aproximadamente, en el plano central de las células.

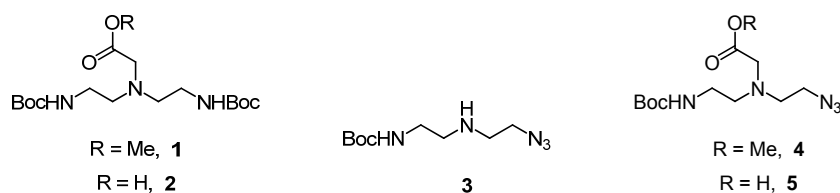
8.2 Sustancias de Partida

Los siguientes compuestos se han preparado de acuerdo con procedimientos descritos en la bibliografía:

- Ácido 2-(*terc*-butoxicarbonilamino)benzóico (**96**).
- Bis(2-*terc*-butoxicarbonilaminoetil)amina (**97**).²⁵
- *p*-Toluensulfonato de 2-azidoetil (**98**).³⁵⁰
- Tris(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosiloximetil)metilamina (**99**).⁹⁵
- Tris(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloximetil)metilamina (**100**).⁹⁶
- 4-Azidobutil-1-amina (**109**).³⁵¹
- Metil-6-amino-6-desoxi- α -D-glucopiranosido (**110**).³⁵²
- 6-Amino-6-desoxiciclomaltoheptaosa (**111**).⁶²
- Heptaquis[6-(2-aminoetiltio)]ciclomaltoheptaosa (**113**).²⁸
- 2-(*terc*-Butoxicarbonilamino)etil isotiocianato (**114**).²⁸⁷
- Heptaquis(6-bromo-6-desoxi)ciclomaltoheptaosa (**117**).¹⁵⁷
- 3-(*terc*-Butoxicarbonilaminometil)encil isotiocianato (**118**).³⁵³
- 4-(*terc*-Butoxicarbonilaminometil)encil isotiocianato (**119**).³⁵³
- Heptaquis[6-bromo-6-desoxi-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (**120**).³⁵⁴
- Heptaquis[6-(2-*terc*-butoxicarbonilaminoetiltio)-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (**121**).³⁵⁴
- Heptaquis[6-(2-aminoetiltio)-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (**122**).³⁵⁴
- Heptaquis[2,3-di-*O*-hexanoil-6-(2-isotiocianatoetiltio)]ciclomaltoheptaosa (**123**).³⁵⁴
- Heptaquis[2,3-di-*O*-hexanoil-6-[(N⁷-(2-hidroxi)etil)]-2-tiureidoetiltio)]ciclomaltoheptaosa (**128**).³⁵⁴
- 2-Azidoetil-bis[2-(*terc*-butoxicarbonilamino)etil]amina (**129**).²⁵
- 2-Isotiocianatoetil- α -D-manopiranosido (**132**).³⁴²

- 2,2,2-Tris[5-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosiltio)-2-oxapentil]etil isotiocianato (**133**).²⁸
- 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil-2-azidoetil- α -D-manopiranosido (**134**).³⁵⁵
- Tris(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosiloximetil)metil isotiocianato (**135**).²⁵
- Tris(hidroximetil)metilazida (**136**).³⁴⁴
- Bis(2-aminoetil)-[2-(*terc*-butoxicarbonilamino)etil]amina (**137**).²⁵

8.3. Nuevos Productos



Bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]glicina metil éster (1). A una disolución de bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]amina (**97**) (0.5 g, 1.66 mmol) y Et_3N (0.7 mL, 5 mmol, 3 eq.) en DMF (5 mL) se adicionó bromoacetato de metilo (0.18 mL, 1.99 mmol, 1.2 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 24 h. Se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-éter de petróleo 1:2) obteniéndose el metil éster **1**. Rend.: 0.53 g (85%). $R_f = 0.36$ (MeCN- H_2O - NH_4OH 10:1:1).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta = 5.14$ (sa, 2 H, *NHBoc*), 3.70 (s, 3 H, COOCH_3), 3.37 (s, 2 H, NCH_2CO), 3.14 (ca, 4 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, CH_2NHBoc), 2.71 (t, 4 H, CH_2N), 1.44 (s, 18 H, CMe_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta = 172.1$ (CO éster), 156.3 (CO carbamato), 79.3 (CMe_3), 55.1 (COOCH_3), 54.3 (CH_2N), 51.8 (NCH_2CO), 38.8 (CH_2NHBoc), 28.6 (CMe_3).

EM (ESI): m/z 376.1 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 398.0 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 414.0 ($[\text{M} + \text{K}]^+$).

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$: C, 54.38; H, 8.86; N, 11.19. Encontrado: C, 54.15; H, 8.71; N, 10.98.

Bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]glicina (2). Una disolución del metil éster **1** (1.01 g, 2.7 mmol) se trató con MeONa (0.15 g, 2.7 mmol, 1 eq.) en $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1:1, 8 mL) durante 24 h, se neutralizó con resina de intercambio iónico Amberlite IR-120(H^+),

se filtró y se evaporó el disolvente obteniéndose **2**. Rend.: 0.97 g (99%). $R_f = 0.36$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 10:1:1).

¹H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 3.59$ (s, 2 H, CH₂CO₂H), 3.33 (t, 4 H, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, CH₂N), 3.15 (t, 4 H, CH₂NHBoc), 1.44 (s, 9 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 173.2$ (CO ácido), 166.0 (CO carbamato), 80.9 (CMe₃), 58.0 (CH₂CO₂H), 56.6 (CH₂N), 37.8 (CH₂NHBoc), 28.8 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 362.2 ([M + H]⁺).

Análisis elemental. Calculado para C₁₆H₃₁N₃O₆: C, 53.17; H, 8.65; N, 11.63. Encontrado: C, 53.05; H, 8.45; N, 11.59.

2-Azidoetil-2-[(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]amina (3). A una disolución de *N-tert*-butoxicarboniletilendiamina (**124**, 0.9 g, 5.6 mmol) y K₂CO₃ (0.77 g, 5.6 mmol, 1 eq.) en acetonitrilo (10 mL) se adicionó *p*-toluensulfonato de 2-azidoetilo (**98**, 1.35 g, 5.6 mmol, 1 eq.). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 24 h, se evaporó el disolvente y el residuo se extrajo con CH₂Cl₂ (20 mL) y se lavó con H₂O (15 mL). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. El producto se purificó por columna cromatográfica (AcOEt-H₂O-EtOH 45:5:3) obteniéndose **3**. Rend.: 0.76 g (60%). $R_f = 0.52$ (AcOEt-H₂O-EtOH 45:5:3).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta = 4.98$ (sa, 1 H, NHBoc), 3.39 (t, 2 H, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, CH₂N₃), 3.19 (c, 2 H, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, CH₂NHBoc), 2.78 (t, 2 H, CH₂CH₂N₃), 2.72 (t, 2 H, CH₂CH₂NHBoc), 1.47 (sa, 1 H, CH₂NHCH₂), 1.42 (s, 9 H, CMe₃).

¹³C RMN (75.5 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta = 156.2$ (CO carbamato), 79.3 (CMe₃), 51.5 (CH₂N₃), 48.9 (CH₂NHBoc), 48.3 (CH₂CH₂N₃), 40.3 (CH₂CH₂NHBoc), 28.5 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 230.0 ([M + H]⁺), 252.0 ([M + Na]⁺), 267.9 ([M + K]⁺).

Análisis elemental. Calculado para C₉H₁₉N₃O₂: C, 47.15; H, 8.35; N, 30.55. Encontrado: C, 47.02; H, 8.09; N, 30.38.

2-Azidoetil-2-[(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]glicina metil éster (4). La alquilación de **3** (0.45 g, 1.97 mmol) y Et₃N (0.82 mL, 5.9 mmol, 3 eq.) en DMF (5 mL) se adicionó bromoacetato de metilo (0.22 mL, 2.36 mmol, 1.2 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 24 h. Se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-éter de petróleo 1:2) obteniéndose el metil éster **4**. Rend.: 0.47 g (80%). $R_f = 0.67$ (AcOEt-éter de petróleo 1:1).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta = 5.17$ (sa, 1 H, NHBoc), 3.70 (s, 3 H, COOCH₃), 3.44 (s, 2 H, NCH₂CO), 3.30 (t, 2 H, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, CH₂N₃), 3.17 (ca, 2 H, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, CH₂NHBoc), 2.89 (t, 2 H, CH₂CH₂N₃), 2.79 (t, 2 H, CH₂CH₂NHBoc), 1.44 (s, 9 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta = 171.9$ (CO éster), 156.3 (CO carbamato), 79.5 (CMe₃), 54.8 (COOCH₃), 54.0, 53.7 (2 NCH₂), 51.7 (NCH₂CO), 49.9 (CH₂N₃), 38.7 (CH₂NHBoc), 28.6 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 302.0 ([M + H]⁺), 324.0 ([M + Na]⁺), 339.9 ([M + K]⁺).

Análisis elemental. Calculado para C₁₂H₂₃N₅O₄: C, 47.83; H, 7.69; N, 23.24. Encontrado: C, 47.75; H, 7.49; N, 23.17.

2-Azidoetil-2-[(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]glicina (5). Una disolución del metil éster **4** (0.73 g, 2.4 mmol) se trató con MeONa (0.13 g, 2.4 mmol, 1 eq.) en MeOH-H₂O (1:1, 8 mL) durante 24 h, se neutralizó con resina de intercambio iónico Amberlite IR-120 H⁺, se filtró y se evaporó el disolvente obteniéndose **5**. Rend.: 0.69 g (99%). $R_f = 0.52$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 10:1:1).

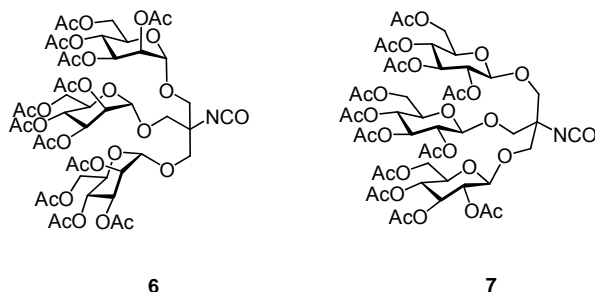
IR (NaCl): $\nu_{\max} = 2100.8$ (N₃) cm⁻¹.

¹H RMN (500 MHz, D₂O, 298 K): $\delta = 4.12$ (s, 2 H, CH₂CO₂H), 3.81 (t, 2 H, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, CH₂N₃), 3.59 (t, 2 H, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, CH₂NHBoc), 3.48 (t, 2 H, CH₂CH₂N₃), 3.39 (t, 2 H, CH₂CH₂NHBoc), 1.43 (s, 9 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, D₂O, 298 K): $\delta = 172.4$ (CO ácido), 165.6 (CO carbamato), 86.8 (CMe₃), 54.9, 54.2 (2 NCH₂), 51.8 (CH₂CO₂H), 45.6 (CH₂N₃), 34.1 (CH₂NHBoc), 27.6 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 288.0 ($[M + H]^+$).

Análisis elemental. Calculado para $C_{11}H_{21}N_5O_4$: C, 45.98; H, 7.37; N, 24.38. Encontrado: C, 45.93; H, 7.19; N, 24.34.



Tris(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosiloximetil)metil isocianato (6). A

una disolución de tris(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosiloximetil)metilamina (**99**) (0.62 g, 0.56 mmol) y Et_3N (93 μ L, 0.67, 1.2 eq.) en CH_2Cl_2 (5 mL) a 0 $^\circ$ C, se añadió trifosgeno (183 mg, 0.58 mmol, 1.05 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a 0 $^\circ$ C durante 30 min. Se lavó dos veces con H_2O (5 mL), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-éter de petróleo 2:1) para dar **6** como una espuma blanca. Rend.: 0.45 g (70%). $R_f = 0.53$ (AcOEt-éter de petróleo 2:1). $[\alpha]_D = +53.2$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

IR (NaCl): $\nu_{max} = 2260.1$ (NCO) cm^{-1} .

1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$, 298 K): $\delta = 5.25$ (m, 6 H, H-3, H-4), 5.19 (dd, 3 H, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, H-2), 4.88 (d, 3 H, H-1), 4.31 (dd, 3 H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, $J_{5,6a} = 5.0$ Hz, H-6a), 4.11 (dd, 3 H, $J_{5,6b} = 2.2$ Hz, H-6b), 3.97 (ddd, 3 H, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, H-5), 3.78, 3.57 (2 d, 6 H, $^2J_{H,H} = 10.2$ Hz, 3 CH_2O), 2.12, 2.07, 2.01, 1.96 (4 s, 36 H, $COCH_3$).

^{13}C RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$, 298 K): $\delta = 170.5, 169.9, 169.6, 169.5$ (4 CO éster), 127.4 (NCO), 98.0 (C-1), 68.9, 68.8 (C-2, C-3), 68.5 (C-5), 67.7 (CH_2O), 65.6 (C-4), 61.9 (C-6), 60.2 (OCH_2_3C), 20.7, 20.6, 20.5, 20.4 (4 $COCH_3$).

EM (ESI): m/z 1160.1 ($[M + Na]^+$).

Análisis elemental. Calculado para $C_{47}H_{63}NO_{31}$: C, 49.61; H, 5.58; N, 1.23. Encontrado: C, 49.65; H, 5.40; N, 1.10.

Tris(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloximetil)metil isocianato (7). El isocianato **7** (0.3 g, 0.27 mmol) se preparó a partir de tris(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloximetil)metilamina (**100**) con un 75% de rendimiento (0.23 g) siguiendo el método descrito para **6**. $R_f = 0.79$ (AcOEt). $[\alpha]_D = -16.8$ (c 0.5, CH_2Cl_2).

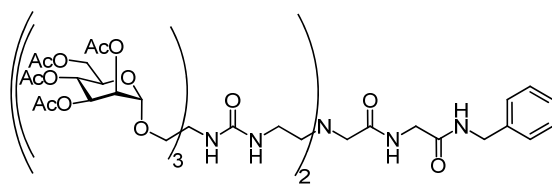
IR (NaCl): $\nu_{max} = 2257.8$ (NCO) cm^{-1} .

1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$, 298 K): $\delta = 5.16$ (t, 3 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 5.03 (t, 3 H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-4), 4.94 (dd, 3 H, $J_{2,3} = 9.5$ Hz, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, H-2), 4.46 (d, 3 H, H-1), 4.23 (dd, 3 H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, $J_{5,6a} = 4.5$ Hz, H-6a), 4.09 (dd, 3 H, $J_{5,6b} = 2.2$ Hz, H-6b), 3.66 (ddd, 3 H, H-5), 3.76, 3.53 (2 d, 6 H, $^2J_{H,H} = 10.4$ Hz, 3 CH_2O), 2.04, 2.01, 1.97, 1.94 (4 s, 36 H, $COCH_3$).

^{13}C RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$, 298 K): $\delta = 170.6, 170.1, 169.5, 169.4$ (4 CO éster), 125.6 (NCO), 101.2 (C-1), 72.6 (C-3), 71.9 (C-5), 71.1 (C-2), 70.8 (CH_2O), 68.1 (C-4) 61.7 (C-6), 60.3 (OCH_2)₃C, 21.0, 20.7, 20.6, 20.5 (4 $COCH_3$).

EM (ESI): m/z 1176.1 ($[M + K]^+$).

Análisis elemental. Calculado para $C_{47}H_{63}NO_{31}$: C, 49.61; H, 5.58; N, 1.23. Encontrado: C, 49.44; H, 5.40; N, 1.12.



8

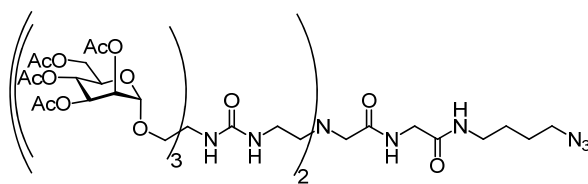
Glicodendrón Hexavalente (8). Rend.: 28 mg (75%). $R_f = 0.40$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_D = +39.1$ (c 0.62, CH_2Cl_2).

^1H RMN (500 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 7.32$ -7.30 (m, 5 H, Ph), 5.28-5.24 (m, 18 H, H-2, H-3, H-4), 4.89 (d, 6 H, $J_{1,2} = 1.6$ Hz, H-1), 4.50, 4.42 (2d, 2 H, $^2J_{\text{H,H}} = 15.0$ Hz, CH_2Ph), 4.30 (dd, 6 H, $J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, $J_{5,6a} = 4.1$ Hz, H-6a), 4.12, 3.93 (2 d, 2 H, $^2J_{\text{H,H}} = 16.6$ Hz, HNCH_2CO), 4.11 (dd, 6 H, $J_{5,6b} = 2.0$ Hz, H-6b), 4.02 (m, 6 H, H-5), 4.04, 3.76 (2 d, 12 H, $^2J_{\text{H,H}} = 9.9$ Hz, 3 CH_2O), 3.27, 3.17 (2 m, 6 H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$, NCH_2CO), 2.62 (m, 4 H, 2 CH_2N), 2.15, 2.06, 2.02, 1.94 (4 s, 72 H, COCH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 174.2$ (CO amida), 172.4-171.4 (CO éster), 160.0 (CO urea), 129.7-128.4 (Ph), 99.5 (C-1), 70.7, 70.6 (C-2, C-3), 70.2 (C-5), 67.6 (CH_2O), 67.1 (C-4), 63.3 (C-6), 59.6 ($(\text{OCH}_2)_3\text{C}$, NCH_2CO), 56.9 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 44.5 (CH_2Ph), 43.2 (NHCH_2CO), 38.8 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 20.8-20.6 (COCH_3).

EM (ESI): m/z 2609.5 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 1323.8 ($[\text{M} + \text{Na} + \text{K}]^{2+}$).

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{109}\text{H}_{151}\text{N}_7\text{O}_{64}$: C, 50.68; H, 5.89; N, 3.80. Encontrado: C, 50.46; H, 5.85; N, 3.70.



9

Glicodendron Hexavalente (9). Rend.: 27 mg (70%). $R_f = 0.42$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_D = +41.0$ (c 1.0, MeOH).

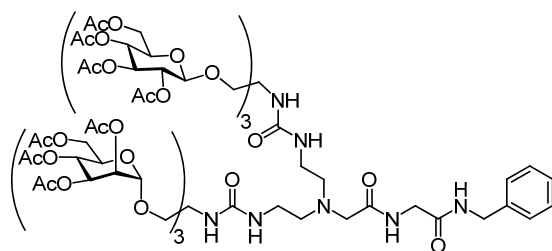
IR (NaCl): $\nu_{\text{max}} = 2099.8$ (N_3) cm^{-1} .

^1H RMN (500 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 5.27$ (t, 6 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.1$ Hz, H-4), 5.25-5.22 (m, 12 H, H-2, H-3), 4.88 (d, 6 H, $J_{1,2} = 1.6$ Hz, H-1), 4.29 (dd, 6 H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, $J_{5,6a} = 4.9$ Hz, H-6a), 4.06, 3.85 (2 d, 2 H, $^2J_{\text{H,H}} = 16.6$ Hz, HNCH_2CO), 4.11 (dd, 6 H, $J_{5,6b} = 2.3$ Hz, H-6b), 4.01 (ddd, 6 H, H-5), 4.04, 3.76 (2 d, 12 H, $^2J_{\text{H,H}} = 9.9$ Hz, 3 CH_2O), 3.32 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, CH_2N_3), 3.25 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.24, 3.14 (2 m, cada 3 H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$, NCH_2CO), 2.62 (m, 4 H, 2 $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.11, 2.07, 2.00, 1.94 (4 s, 72 H, COCH_3), 1.67 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 174.1$ (CO amida), 172.4-171.4 (CO éster), 160.0 (CO urea), 99.6 (C-1), 70.7, 70.6 (C-2, C-3), 70.2 (C-5), 67.5 (CH_2O), 67.1 (C-4), 63.3 (C-6), 59.7 ($(\text{OCH}_2)_3\text{C}$, NCH_2CO), 56.8 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 52.1 (CH_2N_3), 43.0 (NHCH_2CO), 40.2 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{N}_3$), 38.8 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 27.6, 27.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 20.8-20.6 (COCH_3).

EM (ESI): m/z 1314.8 ($[\text{M} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$).

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{106}\text{H}_{152}\text{N}_{10}\text{O}_{64}$: C, 49.15; H, 5.91; N, 5.41. Encontrado: C, 49.03; H, 5.67; N, 5.36.



10

Glicodendrón Heterovalente (10). Rend.: 25 mg (67%). $R_f = 0.36$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_D = +14.7$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

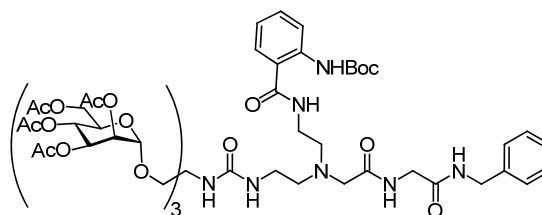
^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta = 7.86$ (ta, 1 H, NH amida), 7.31-7.23 (m, 5 H, Ph), 6.77 (ta, 1 H, NHCH_2Ph), 5.75 (m, 3 H, NH urea), 5.53 (s, 1 H, NH urea), 5.26 (t, 3 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4_{Man}), 5.17 (m, 6 H, H-2_{Man}, H-3_{Man}), 5.16 (t, 3 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.9$ Hz, H-3_{Glc}), 5.01 (t, 3 H, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, H-4_{Glc}), 4.90 (t, 3 H, H-2_{Glc}), 4.80 (sa, 3 H, H-1_{Man}), 4.43 (m, 2 H, CH_2Ph), 4.42 (d, 3 H, H-1_{Glc}), 4.31 (dd, $J_{6a,6b} = 15.8$ Hz, $J_{5,6a} = 3.6$ Hz, H-6a_{Man}), 4.27 (dd, 3 H, $J_{6a,6b} = 12.7$ Hz, $J_{5,6a} = 3.5$ Hz, H-6a_{Glc}), 4.10, 4.01, 3.76, 3.65 (4 d, 24 H, $^2J_{\text{H,H}} = 9.8$ Hz, 3 CH_2O), 4.08 (dd, 3 H, $J_{5,6b} = 2.0$ Hz, H-6b_{Glc}), 4.07 (da, 3 H, H-6b_{Man}), 4.02 (m, 2 H, HNCH_2CO), 3.94 (m, 3 H, H-5_{Man}), 3.67 (m, 3 H, H-5_{Glc}), 3.20-3.11 (m, 6 H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$, NCH_2CO), 2.59-2.54 (m, 4 H, 2 CH_2N), 2.10-1.95 (8 s, 144 H, COCH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 172.4$ (CO amida), 171.7-171.1 (CO éster), 160.0 (CO urea), 129.7-128.4 (Ph), 102.3 (C-1_{Glc}), 99.5 (C-1_{Man}), 74.0 (C-3_{Glc}), 73.0, 72.9 (C-2_{Glc}, C-5_{Glc}), 70.8, 70.6 (C-2_{Man}, C-3_{Man}), 70.4 ($\text{CH}_2\text{O}_{\text{Glc}}$), 70.2 (C-5_{Man}), 69.9 (C-4_{Glc}), 67.5 ($\text{CH}_2\text{O}_{\text{Man}}$), 67.1 (C-4_{Man}), 63.4 (C-6_{Man}), 63.2 (C-6_{Glc}), 59.6 (OCH_2)₃C, NCH_2CO), 56.8 (CH_2N), 44.3 (CH_2Ph), 43.2 (NHCH_2CO), 38.8 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 20.8-20.6 (COCH_3).

EM (ESI): m/z 2604.6 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 1311.5 ($[\text{M} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$).

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{109}\text{H}_{151}\text{N}_7\text{O}_{64}$: C, 50.68; H, 5.89; N, 3.80.

Encontrado: C, 50.40; H, 5.72; N, 3.70.



11

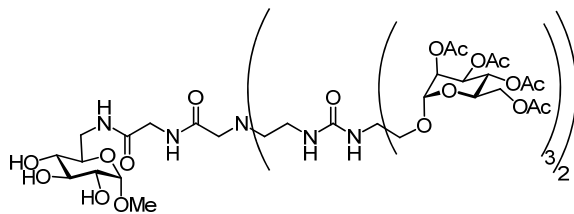
Glicodendrón Trivalente (11). Rend.: 19 mg (75%). $R_f = 0.35$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_D = +23.3$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

^1H RMN (500 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 8.16$ (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$ Hz, H-4_{Abz}), 7.63 (dd, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, H-1_{Abz}), 7.63 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, H-2_{Abz}), 7.30-7.25 (m, 5 H, Ph), 7.05 (ddd, 1H, H-3_{Abz}), 5.23-5.24 (m, 9 H, H-2, H-3, H-4), 4.81 (d, 3 H, $J_{1,2} = 1.6$ Hz, H-1), 4.44, 4.33 (2d, 2 H, $^2J_{\text{H,H}} = 15.0$ Hz, CH_2Ph), 4.27 (dd, 3 H, $J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, H-6a), 4.08 (dd, 3 H, $J_{5,6b} = 2.4$ Hz, H-6b), 4.01 (m, 3 H, H-5), 4.02, 3.85 (2 d, 2 H, $^2J_{\text{H,H}} = 16.6$ Hz, HNCH_2CO), 3.97, 3.70 (2 d, 6 H, $^2J_{\text{H,H}} = 9.8$ Hz, 3 CH_2O), 3.46, 3.32 (2 m, 4 H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.33, 3.21 (2 d, 2 H, $^2J_{\text{H,H}} = 16.7$ Hz, NCH_2CO), 2.69 (m, 4 H, 2 CH_2N), 2.12, 2.05, 2.03, 1.95 (4s, 36 H, COCH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 172.4$ (CO amida), 171.6-171.3 (CO éster), 160.2 (CO urea), 156.0 (CO carbamato), 133.2-128.4 (Ph), 99.5 (C-1), 81.4 (CMe_3), 70.7, 70.6 (C-2, C-3), 70.2 (C-5), 67.6 (CH_2O), 67.1 (C-4), 63.4 (C-6), 59.6 (OCH_2)₃C, NCH_2CO , 57.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_{\text{Urea}}$), 55.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_{\text{Amida}}$), 44.3 (CH_2Ph), 43.0 (NHCH_2CO), 39.0 ($\text{CH}_2\text{NH}_{\text{Amida}}$), 38.8 ($\text{CH}_2\text{NH}_{\text{Urea}}$), 20.8-20.6 (COCH_3).

EM (ESI): m/z 1686.5 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{109}\text{H}_{151}\text{N}_7\text{O}_{64}$: C, 53.39; H, 6.12; N, 5.89. Encontrado: C, 53.12; H, 6.01; N, 5.67.



12

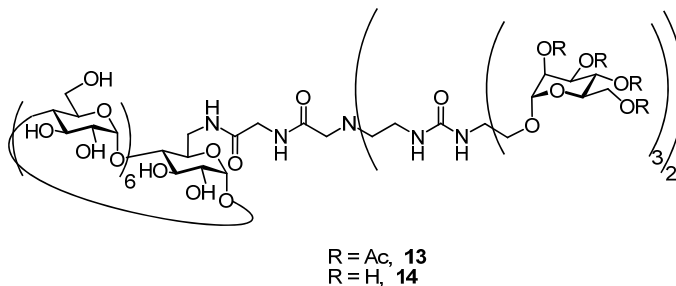
Glicodendron Hexavalente (12). Rend.: 25 mg (71%). $R_f = 0.35$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_D = +41.4$ (c 0.4, MeOH).

^1H RMN (500 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 5.27$ - 5.21 (m, 18 H, H- 2_{Man} , H- 3_{Man} , H- 4_{Man}), 4.88 (d, 6 H, $J_{1,2} = 1.6$ Hz, H- 1_{Man}), 4.64 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.7$ Hz, H- 1_{Glc}), 4.30 (dd, 6 H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, $J_{5,6a} = 4.6$ Hz, H- $6a_{\text{Man}}$), 4.05, 3.92 (2 d, 2 H, $^2J_{\text{H,H}} = 16.6$ Hz, HNCH_2CO), 4.11 (dd, 6 H, $J_{5,6b} = 2.0$ Hz, H- $6b_{\text{Man}}$), 4.02 (m, 6 H, H-5), 4.04, 3.77 (2 d, 12 H, $^2J_{\text{H,H}} = 9.9$ Hz, 3 CH_2O), 3.68 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 14.1$ Hz, $J_{5,6a} = 2.4$ Hz, H- $6a_{\text{Glc}}$), 3.57 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$ Hz, H- 3_{Glc}), 3.55 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 3.1$ Hz, H- $6b_{\text{Glc}}$), 3.40 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = 9.3$ Hz, H- 5_{Glc}), 3.38 (dd, 1 H, H- 2_{Glc}), 3.38 (s, 3 H, OMe), 3.24, 3.14 (2 m, 6 H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$, NCH_2CO), 3.14 (t, 1 H, H- 4_{Glc}), 2.62 (m, 4 H, 2 CH_2N), 2.11, 2.05, 2.00, 1.93 (4 s, cada 18 H, COCH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 174.2$ (CO amida), 172.5-171.4 (CO éster), 160.0 (CO urea), 101.3 (C- 1_{Glc}), 99.6 (C- 1_{Man}), 74.8 (C- 5_{Glc}), 73.5 (C- 2_{Glc}), 73.2 (C- 4_{Glc}), 71.6 (C- 3_{Glc}), 70.8, 70.6 (C- 2_{Man} , C- 3_{Man}), 70.2 (C- 5_{Man}), 67.6 (CH_2O), 67.1 (C- 4_{Man}), 63.3 (C- 6_{Man}), 59.6 (OCH_2) $_3\text{C}$, NCH_2CO), 56.8 (CH_2N), 55.8 (OMe), 43.1 (NHCH_2CO), 41.8 (C- 6_{Glc}), 38.8 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 20.8-20.6 (COCH_3).

EM (ESI): m/z 2691.9 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{109}\text{H}_{157}\text{N}_7\text{O}_{69}$: C, 49.04; H, 5.93; N, 3.67. Encontrado: C, 48.87; H, 5.83; N, 3.56.



Glicodendrón Hexavalente (13). Rend.: 33 mg (68%). $R_f = 0.23$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 10:2:1). $[\alpha]_D = +64.4$ (c 1.0, MeOH).

¹H RMN (500 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 5.28$ - 5.21 (m, 18 H, H-2_{Man}, H-3_{Man}, H-4_{Man}), 4.90 (d, 6 H, $J_{1,2} = 1.6$ Hz, H-1_{Man}), 4.95-87 (m, 7 H, H-1_{Glc}), 4.31 (dd, 6 H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, $J_{5,6a} = 4.5$ Hz, H-6a_{Man}), 4.12 (dd, 6 H, $J_{5,6b} = 1.8$ Hz, H-6b_{Man}), 4.08, 3.79 (2 m, 14 H, H-6_{Glc}), 4.04, 3.78 (2 d, 12 H, $^2J_{H,H} = 10.0$ Hz, 3 CH₂O), 4.02 (m, 8 H, H-5_{Man}, HNCH₂CO), 3.85-3.79 (m, 7 H, H-3_{Glc}), 3.74-3.71 (m, 7 H, H-5_{Glc}), 3.50 (m, 14 H, H-2_{Glc}, H-4_{Glc}), 3.26, 3.14 (2 m, 6 H, NCH₂CH₂NHCO, NCH₂CO), 2.63 (m, 4 H, 2 CH₂N), 2.12, 2.06, 2.01, 1.94 (4 s, 72 H, COCH₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 174.0$ (CO amida), 172.5-171.4 (CO éster), 160.0 (CO urea), 103.9-103.5 (C-1^{I-VII}_{Glc}), 99.5 (C-1_{Man}), 85.2 (C-4^I_{Glc}), 83.4-83.0 (C-4^{II-VII}_{Glc}), 74.8 (C-3^{I-VII}_{Glc}), 74.3 (C-2^{I-VII}_{Glc}), 73.7 (C-5^{II-VII}_{Glc}), 72.0 (C-5^I_{Glc}), 70.8, 70.6 (C-2_{Man}, C-3_{Man}), 70.2 (C-5_{Man}), 67.6 (CH₂O), 67.1 (C-4_{Man}), 63.3 (C-6_{Man}), 62.1-61.9 (C-6^{II-VII}_{Glc}), 59.6 (OCH₂)₃C, NCH₂CO), 56.7 (CH₂N), 43.5 (NHCH₂CO), 41.8 (C-6^I_{Glc}), 38.9 (NCH₂CH₂NHCO), 20.9-20.8 (COCH₃).

EM (ESI): m/z 1826.7 ($[M + 2Na]^{2+}$).

Análisis elemental. Calculado para C₁₄₄H₂₁₃N₇O₉₈: C, 47.91; H, 5.95; N, 2.72. Encontrado: C, 47.80; H, 5.74; N, 2.66.

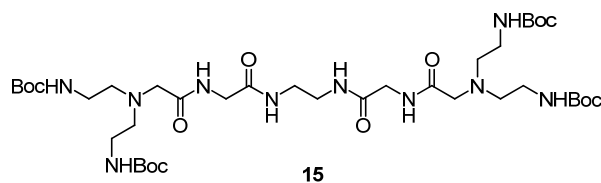
Glicodendrón Hexavalente (14). La desacetilación del conjugado de CD hexavalente **13** siguiendo el procedimiento descrito en los Métodos Generales permitió aislar **14** con un rendimiento prácticamente cuantitativo. $[\alpha]_D = +68.1$ (c 0.46, H₂O).

¹H RMN (500 MHz, D₂O, 298 K): $\delta = 4.95$ (m, 7 H, H-1_{Glc}), 4.70 (d, 6 H, $J_{1,2} = 1.3$ Hz, H-1_{Man}), 3.84 (m, 14 H, CH₂Oa, H-2_{Man}, HNCH₂CO), 3.83 (m, 7 H, H-3_{Glc}), 3.81 (m, 7 H, H-6a_{Glc}), 3.75 (dd, 6 H, $J_{6a,6b} = 11.8$ Hz, $J_{5,6a} = 1.5$ Hz, H-6a_{Man}), 3.71 (m, 7 H, H-5_{Glc}), 3.66 (dd, 6 H, $J_{3,4} = 8.6$ Hz, H-3_{Man}), 3.65 (m, 6 H, CH₂Ob), 3.63 (m, 6 H, H-6b_{Man}), 3.59 (m, 7 H, H-6b_{Glc}), 3.53 (t, 6 H, $J_{4,5} = 8.6$ Hz, H-4_{Man}), 3.52 (m, 7 H, H-2_{Glc}), 3.47 (m, 13 H, H-5_{Man}, H-4_{Glc}), 3.10, 3.05 (2 m, 6 H, NCH₂CH₂NHCO, NCH₂CO), 2.57 (m, 4 H, 2 CH₂N).

¹³C RMN (125.7 MHz, D₂O, 298 K): $\delta = 171.9$ (CO amida), 159.4 (CO urea), 101.9 (C-1^{I-VII}_{Glc}), 100.3 (C-1_{Man}), 82.8 (C-4^I_{Glc}), 81.2-81.0 (C-4^{II-VII}_{Glc}), 73.1-72.7 (C-2^{I-VII}_{Glc}, C-3^{I-VII}_{Glc}), 72.1-71.8 (C-5^{I-VII}_{Glc}), 70.7 (C-5_{Man}), 70.0 (C-2_{Man}, C-3_{Man}), 66.7 (C-4_{Man}), 66.6 (CH₂O), 60.8 (C-6_{Man}), 60.2 (C-6^{II-VII}_{Glc}), 58.3 (OCH₂)₃C, NCH₂CO), 54.5 (CH₂N), 42.2 (NHCH₂CO), 40.0 (C-6^I_{Glc}), 37.3 (NCH₂CH₂NHCO).

EM (ESI): m/z 2622.4 ($[M + Na]^+$), 1323.4 ($[M + 2 Na]^{2+}$).

Análisis elemental. Calculado para C₉₆H₁₆₅N₇O₇₄: C, 44.32; H, 6.39; N, 3.77. Encontrado: C, 44.16; H, 6.22; N, 3.67.



***N,N'*-bis[bis[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)etil]glicilglicil]etilendiamina (15).**

Sobre una disolución de bis[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)etil]glicilglicina (**18**, 0.1 g, 0.24 mmol), DIPEA (0.14 mL, 3.5 eq.) y TBTU (74 mg, 0.23 mmol, 0.95 eq.) en DMF (5 mL) se adicionó etilendiamina (7.6 μ L, 0.115 mmol, 0.95 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 24 h. Se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se repartió en

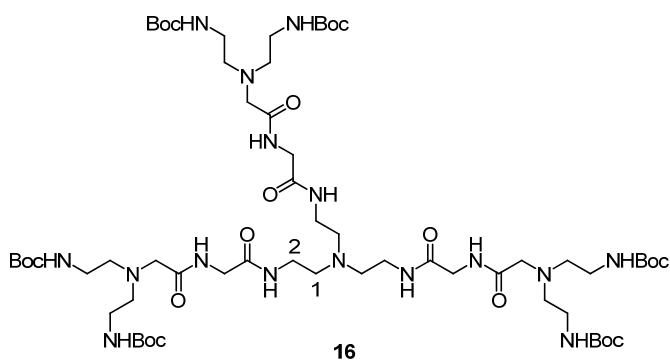
CH₂Cl₂-H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ (x2). Finalmente, el producto se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 9:1) obteniéndose el producto deseado **15**. Rend.: 59 mg (62%). *R_f* = 0.4 (CH₂Cl₂-MeOH 9:1).

¹H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): δ = 3.90 (s, 4 H, NHCH₂CO), 3.35 (s, 4 H, CH_{2,EDA}), 3.25 (s, 4 H, NCH₂CO), 3.16 (t, 8 H, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, CH₂NHBoc), 2.65 (t, 8 H, CH₂N), 1.44 (s, 36 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, MeOD, 298 K): δ = 174.8, 171.9 (2 CO amida), 158.5 (CO carbamato), 80.2 (CMe₃), 59.9 (NCH₂CO), 56.3 (CH₂N), 43.3 (NHCH₂CO), 40.2 (CH_{2,EDA}), 39.8 (CH₂NHBoc), 28.5 (CMe₃).

EM (ESI): *m/z* 883.5 ([M + Na]⁺), 859.5 ([M - H]⁻), 895.4 ([M + Cl]⁻).

Análisis elemental. Calculado para C₃₈H₇₂N₁₀O₁₂: C, 53.01; H, 8.43; N, 16.27. Encontrado: C, 53.12; H, 8.36; N, 16.05.



N,N,N-tris[bis[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)etil]glicilglicilaminoetil]amina

(16). Sobre una disolución de bis[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)etil]glicilglicina (**9**, 0.1 g, 0.24 mmol), DIPEA (0.14 mL, 3.5 eq.) y TBTU (74 mg, 0.23 mmol, 0.95 eq.) en DMF (5 mL) se adicionó tris(2-aminoetil)amina (11.3 μL, 77 μmol, 0.95 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 24 h. Se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se repartió en CH₂Cl₂-H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ (x2). Finalmente, el producto se purificó

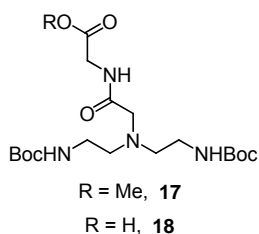
por cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 9:1) obteniéndose el producto deseado **16**. Rend.: 50 mg (46%). *R_f* = 0.4 (CH₂Cl₂-MeOH 9:1).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 313 K): δ = 8.00 (sa, 3 H, CH₂NHCO), 7.69 (sa, 3 H, NHCH₂-2), 5.80 (sa, 6 H, NHBoc), 3.97 (d, 6 H, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, NHCH₂CO), 3.21 (sa, 24 H, CH₂-2, NCH₂CO, CH₂NHBoc), 2.66 (sa, 18 H, CH₂N, CH₂-1), 1.44 (s, 54 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 313 K): δ = 172.7, 170.2 (2 CO amida), 156.8 (CO carbamato), 79.4 (CMe₃), 59.2 (NCH₂CO), 55.7, 54.7 (CH₂-1, CH₂N), 43.1 (NHCH₂CO), 39.9 (CH₂-2, CH₂NHBoc), 28.7 (CMe₃).

EM (ESI): *m/z* 1368.7 ([M + Na]⁺).

Análisis elemental. Calculado para C₆₀H₁₁₄N₁₆O₁₈: C, 53.47; H, 8.53; N, 16.63. Encontrado: C, 53.38; H, 8.41; N, 16.39.



Bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]glicilglicina metil éster (17). A una disolución de bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]glicina (**2**) (0.29 g, 0.8 mmol), Et₃N (0.34 mL, 2.4 mmol, 3 eq.) y TBTU (245 mg, 0.76 mmol, 0.95 eq.) en DMF (5 mL) se adicionó hidrocloreuro de glicina metil éster (101 mg, 0.8 mmol, 1 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 24 h. Se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se repartió en CH₂Cl₂-H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ (x2). Finalmente, el producto se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-éter de petróleo 1:1) obteniéndose el metil éster **17**. Rend.: 0.34 g (99%). *R_f* = 0.36 (AcOEt-éter de petróleo 1:1).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ = 7.70 (sa, 1 H, NHCO), 5.49 (sa, 2 H, NHBoc), 4.09 (d, 2 H, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, NHCH₂CO), 3.75 (s, 3 H, COOCH₃), 3.21 (ca, 4 H, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, CH₂NHBoc), 3.15 (s, 2 H, NCH₂CO), 2.63 (t, 4 H, CH₂N), 1.43 (s, 18 H, CMe₃).

^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta = 171.7, 171.4$ (CO éster + amida), 156.7 (CO carbamato), 79.4 (CMe_3), 58.8 (COOCH_3), 55.4 (CH_2N), 52.5 (NHCH_2CO), 40.5 (NHCH_2CO), 38.7 (CH_2NHBoc), 28.5 (CMe_3).

EM (ESI): m/z 433.3 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 455.2 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 471.2 ($[\text{M} + \text{K}]^+$).

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_7$: C, 52.76; H, 8.39; N, 12.95. Encontrado: C, 52.50; H, 8.64; N, 12.80.

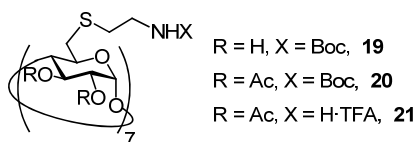
Bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]glicilglicina (18). Una disolución del metil éster **17** (0.2 g, 0.47 mmol) se trató con NaOH (21 mg, 0.47 mmol, 1.1 eq.) en THF- H_2O (1:2, 6 mL) durante 5 h, se neutralizó con resina de intercambio iónico Amberlite IR-120(H^+), se filtró y se evaporó el disolvente obteniéndose **18**. Rend.: 0.2 g (99%). $R_f = 0.49$ (MeCN- H_2O - NH_4OH 10:1:1).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , 323 K): $\delta = 9.17$ (sa, 1 H, COOH), 7.81 (ta, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, NHCH_2CO), 5.65 (sa, 2 H, NHBoc), 4.06 (d, 2 H, NHCH_2CO), 3.24 (s, 2 H, CH_2COOH), 3.21 (t, 4 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz, CH_2N), 2.67 (sa, 4 H, CH_2NHBoc), 1.43 (s, 9 H, CMe_3).

^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta = 171.2$ (CO ácido, CO amida), 156.8 (CO carbamato), 79.7 (CMe_3), 59.2 (CH_2COOH), 55.5 (CH_2N), 40.7 (NHCH_2CO) 38.7 (CH_2NHBoc), 28.5 (CMe_3).

EM (ESI): m/z 419.2 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_7$: C, 51.66; H, 8.19; N, 13.39. Encontrado: C, 51.68; H, 8.33; N, 13.31.



Heptaquis[6-(2-*terc*-butoxicarbonilamino)etil]ciclomaltoheptaosa (19). A una suspensión de heptaquis(6-desoxi-6-bromo)ciclomaltoheptaosa (**117**, 2.52 g, 1.59 mmol) y Cs_2CO_3 (5.13 g, 15.6 mmol, 1.4 eq.) en DMF seca (30 mL) y bajo atmósfera de Ar, se le añadió carbamato de *N-terc*-butil-2-mercaptoetilamina (2.7 mL, 15.9 mmol, 1.4 eq.). La mezcla de reacción se calentó, bajo atmósfera de N_2 , a 60 °C durante 48 h. Posteriormente, se dejó alcanzar la t.a., se vertió la mezcla sobre H_2O /hielo (200 mL) y se dejó agitando durante 16 h. El sólido resultante se filtró y se lavó con abundante H_2O fría. Rend.: 3.56 g (99%). $R_f = 0.60$ (CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O 40:10:1). $[\alpha]_D = + 79.7$ (c 0.8, MeOH).

^1H RMN (500 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 4.95$ (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 4.00 (m, 7 H, H-5), 3.80 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 3.48 (dd, 7 H, H-2), 3.26 (t, 21 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, H-4, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.20 (m, 7 H, H-6a), 2.91 (m, 7 H, H-6b), 2.77 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 1.45 (sa, 63 H, CMe_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 104.1$ (C-1), 86.5 (C-4), 80.3 (C_q), 74.6 (C-3), 74.4 (C-2), 73.3 (C-5), 41.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 34.9 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 34.5 (C-6), 29.1 (CMe_3).

EM (ESI): m/z 1147.4 $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$, 2271.8 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{91}\text{H}_{161}\text{N}_7\text{O}_{42}\text{S}_7$: C, 48.58; H, 7.21; N, 4.36. Encontrado: C, 48.44; H, 6.80; N, 4.27.

Heptaquis[2,3-di-*O*-acetil-6-(2-*terc*-butoxicarbonilamino)etil]ciclomaltoheptaosa (20). El compuesto **20** se obtuvo por acetilación convencional de **19** (0.56 g, 0.25 mmol), empleando el procedimiento descrito en los métodos generales, seguido de cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 40:1 \rightarrow 20:1). Rend.: 0.58 g (81%). $R_f = 0.80$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_D = + 18.9$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 313 K): δ = 5.39 (sa, 7 H, NHBoc), 5.28 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4$ Hz, H-3), 5.15 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, H-1), 4.84 (dd, 7 H, H-2), 4.20 (m, 7 H, H-5), 3.82 (t, 7 H, $J_{4,5} = 9.4$ Hz, H-4), 3.63 (ca, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, CH_2NHBoc), 3.16 (dd, 7 H, $J_{5,6a} = 2.1$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.6$ Hz, H-6a), 3.06 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 6.0$ Hz, H-6b), 2.82 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.06, 2.02 (2 s, cada 21 H, COCH_3), 1.42 (s, 63 H, CMe_3).

^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3 , 313 K): δ = 171.1, 169.8 (2 CO éster), 156.4 (CO carbamato), 97.1 (C-1), 79.7 (C-4), 79.4 (C_q), 71.7 (C-3), 71.3 (C-2), 70.9 (C-5), 40.6 (CH_2NHBoc), 34.1 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$, C-6), 28.9 (CMe_3), 21.2 (COCH_3).

EM (ESI): m/z 1442.0 [$\text{M} + 2 \text{Na}$] $^{2+}$, 2860.5 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{119}\text{H}_{189}\text{N}_7\text{O}_{56}\text{S}_7$: C, 50.63; H, 6.71; N, 3.45. Encontrado: C, 50.21; H, 6.46; N, 3.35.

De forma alternativa, el compuesto **20** se sintetizó acetilando de la forma convencional la heptaquis(6-bromo-6-desoxi)ciclomaltoheptaosa¹⁵⁷ (**117**, 294 mg, 0.1 mmol) y haciéndola reaccionar en DMF seca (3 mL) con Cs_2CO_3 (326 mg, 1.0 mmol, 10 eq.) y carbamato de *N-terc*-butil-2-mercaptoetilo (164 μL , 1.0 mmol, 1.4 eq.). Rend.: 254 mg (70%).

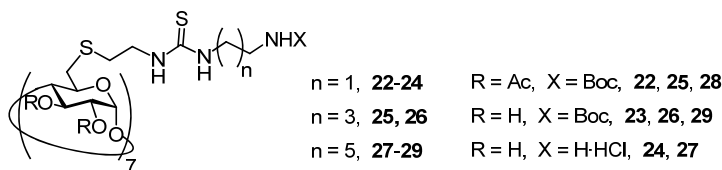
Heptahidrocloruro de heptaquis[2,3-di-*O*-acetil-6-(2-aminoetil-*ti*o)]-ciclomaltoheptaosa (21). Se hidrolizaron los grupos carbamato del compuesto **20** (560 mg, 0.2 mmol) de la forma habitual, obteniéndose con rendimiento cuantitativo el heptatrilfluoroacetato **21** (580 mg). $[\alpha]_{\text{D}} = +51.7$ (c 1.0, H_2O).

^1H RMN (500 MHz, D_2O , 313 K): δ = 5.41 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.0$ Hz, H-3), 5.39 (d, 7 H, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-1), 5.03 (dd, 7 H, H-2), 4.12 (m, 14 H, H-4, H-5), 3.63 (t, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_2NH_2), 3.30 (dd, 7 H, $J_{5,6a} = 5.5$ Hz, $J_{6a,6b} = 13.5$ Hz, H-6a), 3.06 (m, 21 H, H-6b, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.23 (s, 42 H, COCH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 313 K): δ = 172.0, 171.9 (2 CO), 97.9 (C-1), 79.9 (C-4), 73.8 (C-3), 72.2 (C-2), 71.9 (C-5), 40.6 (CH_2NH_2), 34.8 (C-6), 31.8 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 21.2, 20.9 (COCH_3).

EM (ESI): m/z 1069.2 [$\text{M} + 2 \text{H}$] $^{2+}$, 2136.4 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$;

Análisis elemental. Calculado para $C_{98}H_{140}F_{21}N_7O_{56}S_7 \cdot 2H_2O$: C, 39.61; H, 4.88; N, 3.30; S, 7.65. Encontrado: C, 39.57; H, 4.85; N, 3.09; S 7.49.



Heptaakis[2,3-di-*O*-acetil-6-(2-(*N'*-(2-aminoetil)tioureido)etil)tiol]-

ciclomaltoheptaosa (22). A una disolución de **21** (58 mg, 20 μ mol) en CH_2Cl_2 seco (1.5 mL) se le añadió, gota a gota, una disolución de 2-(*terc*-butoxicarbonilamino)etil isotiocianato (**114**, 34 mg, 0.17 mmol, 1.2 eq.) en CH_2Cl_2 seco (1.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 24 h, se secó (Na_2SO_4), se concentró y se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 50:1 \rightarrow 20:1). Rend.: 50 mg (70%). $R_f = 0.37$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_D = +69.0$ (c 0.4, $CHCl_3$).

1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$, 313 K): $\delta = 7.20, 7.01$ (2 sa, 14 H, NHCS), 5.44 (sa, 7 H, NH carbamato), 5.24 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.8$ Hz, H-3), 5.10 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1), 4.78 (dd, 7 H, H-2), 4.17 (m, 7 H, H-5), 3.75 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.5$ Hz, H-4), 3.74, 3.58 (2 sa, 28 H, CH_2NHCS), 3.29 (m, 14 H, $^3J_{H,H} = 5.6$ Hz, CH_2NHBoc), 3.21 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.0$ Hz, H-6a), 3.03 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 7.6$ Hz, H-6b), 2.94, 2.82 (2m, 14 H, CH_2S_{Cist}), 2.05, 2.00 (2 s, cada 21 H, $COCH_3$), 1.42 (s, 63 H, CMe_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$, 313 K): $\delta = 182.6$ (CS), 171.0, 169.6 (2 CO éster), 157.2 (CO carbamato), 97.2 (C-1), 80.2 (C-4), 79.7 (CMe_3), 72.0 (C-3), 71.3 (C-2), 70.9 (C-5), 45.4, 45.0 (CH_2NHCS), 40.5 (CH_2NHBoc), 34.1 (CH_2S_{Cist}), 33.3 (C-6), 28.9 (CMe_3), 21.0 ($COCH_3$).

EM (ESI): m/z 1818.8 $[M + 2 K]^{2+}$, 1806.8 $[M + Na + K]^{2+}$, 1798.8 $[M + 2 Na]^{2+}$.

Análisis elemental. Calculado para $C_{140}H_{231}N_{21}O_{56}S_{14}$: C, 47.32; H, 6.55; N, 8.28; S, 12.63. Encontrado: C, 47.41; H, 6.62; N, 8.15; S, 12.48.

Heptaquis[6-(2-(*N'*-(2-*terc*-butoxicarbonilaminoetil)tioureido)etiltio)]-ciclomaltoheptaosa (23). El compuesto **23** se obtuvo por desacetilación convencional de **22** (50 mg, 14 μ mol). Rend.: 42 mg (99%). $R_f = 0.59$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 10:2:1). $[\alpha]_D = +34.9$ (c 0.24, MeOH).

¹H RMN (500 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 4.99$ (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, H-1), 4.05 (m, 7 H, H-5), 3.81 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$ Hz, H-3), 3.73, 3.58 (2 sa, 28 H, CH₂NHCS), 3.50 (m, 14 H, H-2, H-4), 3.26 (m, 21 H, H-6a, CH₂NHBoc), 2.98 (m, 7 H, H-6b), 2.92 (m, 14 H, CH₂S_{Cist}), 1.46 (sa, 63 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 183.7$ (CS), 158.6 (CO), 104.1 (C-1), 86.4 (C-4), 80.6 (C_q), 74.5 (C-3), 74.4 (C-2), 73.5 (C-5), 45.3, 45.2 (CH₂NHCS), 41.2 (CH₂NHBoc), 35.0 (CH₂S_{Cist}), 33.8 (C-6), 29.1 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 1501.8 [M + H + K]²⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₁₂H₂₀₃N₂₁O₄₂S₁₄: C, 45.37; H, 6.90; N, 9.92. Encontrado: C, 45.11; H, 6.69; N, 9.80.

Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-(*N'*-(2-aminoetil)tioureido)etiltio)]-ciclomaltoheptaosa (24). Se hidrolizaron los grupos carbamato de **23** (42 mg, 17 μ mol) mediante tratamiento con TFA-CH₂Cl₂, según se describe en los métodos generales, obteniéndose el compuesto **24**. Rend.: 32 mg (99%). $[\alpha]_D = +46.5$ (c 0.5, H₂O).

¹H RMN (500 MHz, D₂O, 333 K): $\delta = 5.42$ (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.1$ Hz, H-1), 4.25 (ta, 7 H, $J_{4,5} = 9.1$ Hz, H-5), 4.20 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1$ Hz, H-3), 4.14 (t, 14 H, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, CH₂CH₂NH₂), 3.99 (sa, 14 H, CH₂NHCS), 3.96 (dd, 7 H, H-2), 3.87 (t, 7 H, H-4), 3.55 (t, 14 H, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, CH₂NH₂), 3.52 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.8$ Hz, H-6a), 3.28 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 7.8$ Hz, H-6b), 3.21 (t, 14 H, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, CH₂S_{Cist}).

¹³C RMN (125.7 MHz, D₂O, 333 K): $\delta = 182.8$ (CS), 101.6 (C-1), 84.1 (C-4), 73.6 (C-3), 72.5 (C-2), 72.0 (C-5), 44.3, 41.6 (CH₂NHCS), 39.8 (CH₂NH₂), 34.1 (C-6), 32.4 (CH₂S_{Cist}).

EM (ESI): m/z 1132.8 [M + 2 H]²⁺.

Análisis elemental. Calculado para $C_{77}H_{154}Cl_7N_{21}O_{28}S_{14}$: C, 36.71; H, 6.16; N, 11.68; S, 17.82. Encontrado: C, 36.48, H, 5.95; N, 11.44, S, 17.49.

Heptaquis[2,3-di-*O*-acetil-6-(2-(*N'*-(4-*terc*-butoxicarbonilaminobutil)-tioureido)etiltilio)]ciclomaltoheptaosa (25). A una disolución de **21** (64 mg, 22 μ mol) y Et_3N (54 μ L, 0.39 mmol, 2.5 eq.) en CH_2Cl_2 (2.5 mL), se le añadió una disolución de 4-*terc*-butoxicarbonilaminobutil isotiocianato (43 mg, 18 μ mol, 1.2 eq.) en CH_2Cl_2 (2.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 24 h. El disolvente se eliminó bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatográfica en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). Rend.: 64 mg (78%). $R_f = 0.30$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_D = +48.4$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$, 313 K): $\delta = 6.93$ (sa, 14 H, NHCS), 5.27 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 5.13 (sa, 7 H, $J_{1,2} = 3.3$ Hz, H-1), 4.95 (sa, 14 H, NHBoc), 4.80 (dd, 7 H, H-2), 4.19 (m, 7 H, H-5), 3.77 (m, 21 H, H-4, $CH_2CH_2S_{Cist}$), 3.49 (sa, 14 H, CH_2NHCS), 3.24 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.5$ Hz, H-6a), 3.12 (ta, 14 H, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH_2NHBoc), 3.05 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 6.5$ Hz, H-6b), 2.95 (m, 7 H, $CH_2S_{Cist}a$), 2.84 (m, 7 H, $CH_2S_{Cist}b$), 2.08, 2.04 (2 s, 42 H, $COCH_3$), 1.61 (m, 14 H, CH_2CH_2NHCS), 1.54 (m, 14 H, CH_2CH_2NHBoc), 1.44 (s, 63 H, CMe_3).

^{13}C RMN (125.5 MHz, $CDCl_3$, 313 K): $\delta = 182.4$ (CS), 170.9, 169.5 (2 CO éster), 156.6 (CO carbamato), 97.0 (C-1), 79.5 (CMe_3 , C-4), 71.8 (C-5), 71.1 (C-3), 70.8 (C-2), 44.3 (CH_2NHCS), 44.0 ($CH_2CH_2S_{Cist}$), 40.4 (CH_2NHBoc), 33.9 (C-6), 33.2 (CH_2S_{Cist}), 28.7 (CMe_3), 27.8 (CH_2CH_2NHBoc), 26.6 (CH_2CH_2NHCS), 20.9 (2 $COCH_3$).

EM (ESI): m/z 1897.5 $[M + 2 Na]^{2+}$.

Análisis elemental. Calculado para $C_{154}H_{259}N_{21}O_{56}S_{14}$: C, 49.33; H, 6.96; N, 7.84; S, 11.97. Encontrado: C, 48.98; H, 6.71; N, 7.60; S, 11.62.

Heptaquis[6-(2-(*N'*-(4-*terc*-butoxicarbonilaminobutil)tioureido)etiltilio)]-ciclomaltoheptaosa (26). El compuesto **26** se obtuvo por desacetilación convencional de **25** (45 mg, 12 μ mol), siguiendo el procedimiento descrito en los métodos generales.

Rend.: 37 mg (98%). $R_f = 0.6$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 10:2:1). $[\alpha]_D = + 44.4$ (c 0.94, MeOH).

¹H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 5.00$ (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.0$ Hz, H-1), 4.05 (m, 7 H, H-5), 3.83 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 3.75 (sa, 14 H, SCH₂CH₂NHCS), 3.56 (t, 7 H, H-4), 3.52 (dd, 7 H, H-2), 3.48 (sa, 14 H, CH₂NHCS), 3.26 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.5$ Hz, H-6a), 3.10 (t, 14 H, $^3J_{H,H} = 6.7$ Hz, CH₂NHBoc), 3.01 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 6.0$ Hz, H-6b), 2.93 (m, 14 H, CH₂S_{Cist}), 1.61 (m, 14 H, CH₂CH₂NHCS), 1.54 (m, 14 H, CH₂CH₂NHBoc), 1.45 (s, 63 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 183.3$ (CS), 158.4 (CO), 104.0 (C-1), 86.1 (C-4), 80.0 (CMe₃), 74.6 (C-3), 74.4 (C-2), 73.4 (C-5), 45.0 (2 CH₂NHCS), 41.3 (CH₂NHBoc), 34.8 (C-6), 34.0 (CH₂S_{Cist}), 29.1 (CMe₃), 28.6 (CH₂CH₂NHBoc), 27.7 (CH₂CH₂NHCS).

EM (ESI): m/z 3159.1 [M + H]⁺, 1091.1 [M + 3 K]³⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₂₆H₂₃₁N₂₁O₄₂S₁₄: C, 47.87; H, 7.37; N, 9.30; S, 14.20. Encontrado: C, 47.62; H, 7.09; N, 8.99; S, 13.84.

Heptaquis[2,3-di-*O*-acetil-6-(2-(*N'*-(6-*terc*-butoxicarbonilamino)hexil)-tioureido)etiltio]ciclomaltoheptaosa (27). A una disolución de **21** (64 mg, 22 μ mol) y Et₃N (54 μ L, 0.39 mmol, 2.5 eq.) en CH₂Cl₂ (2.5 mL), se añadió una disolución de 6-*terc*-butoxicarbonilaminohexil isotiocianato (48 mg, 0.18 mmol, 1.2 eq.) en CH₂Cl₂ (2.5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 20:1). Rend.: 61 mg (70%). $R_f = 0.48$ (CH₂Cl₂-MeOH 20:1). $[\alpha]_D = + 55.5$ (c 1.0, CH₂Cl₂).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 313 K): $\delta = 6.84$ (sa, 14 H, NHCS), 5.27 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.7$ Hz, H-3), 5.13 (da, 7 H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1), 4.80 (dd, 7 H, H-2), 4.78 (sa, 14 H, NHBoc), 4.20 (m, 7 H, H-5), 3.79 (m, 21 H, H-4, CH₂CH₂S_{Cist}), 3.46 (m, 14 H, CH₂NHCS), 3.23 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, H-6a), 3.09 (t, 14 H, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH₂NHBoc), 3.05 (m, 7 H, H-6b), 2.96 (m, 7 H, CH₂S_{cista}), 2.85 (m, 7 H, CH₂S_{cistb}), 2.08, 2.04 (2 s, 42 H, COCH₃), 1.59 (m, 14 H, CH₂CH₂NHCS), 1.49 (m, 14 H,

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 1.44 (s, 63 H, CMe_3), 1.36 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$).

^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3 , 313 K): δ = 182.1 (CS), 170.9, 169.5 (2 CO éster), 156.5 (CO carbamato), 97.0 (C-1), 79.4 (CMe_3 , C-4), 71.8 (C-5), 71.1 (C-3), 70.8 (C-2), 44.6 (CH_2NHCS), 44.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 40.7 (CH_2NHBoc), 33.9 (C-6), 33.2 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 30.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 29.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 28.7 (CMe_3), 26.7, 26.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 20.9 (COCH_3).

EM (ESI): m/z 1995.6 $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{168}\text{H}_{287}\text{N}_{21}\text{O}_{56}\text{S}_{14}$: C, 51.13; H, 7.33; N, 7.45. Encontrado: C, 50.79; H, 6.98; N, 7.20.

Heptaquis[6-(2-(*N'*-(6-*terc*-butoxicarbonilaminohexil)tioureido)etiltilio)]-

ciclomaltoheptaosa (28). El compuesto **28** se obtuvo por desacetilación convencional de **27** (50 mg, 12.7 μmol), siguiendo el procedimiento descrito en los métodos generales. Rend.: 41.5 mg (98%). R_f = 0.55 (MeCN- H_2O - NH_4OH 10:2:1). $[\alpha]_D$ = +48.1 (c 0.3, MeOH).

^1H RMN (300 MHz, MeOD, 323 K): δ = 4.99 (d, 7 H, $J_{1,2}$ = 3.0 Hz, H-1), 4.04 (m, 7 H, H-5), 3.83 (t, 7 H, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 9.3 Hz, H-3), 3.74 (ta, 14 H, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.3 Hz, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 3.5 (m, 28 H, CH_2NHCS , H-2, H-4), 3.25 (dd, 7 H, $J_{6a,6b}$ = 13.8 Hz, H-6a), 3.06 (t, 14 H, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.7 Hz, CH_2NHBoc), 2.98 (m, 21 H, H-6b, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 1.47 (m, 119 H, CMe_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 323 K): δ = 183.3 (CS), 158.4 (CO), 104.1 (C-1), 86.3 (C-4), 80.0 (CMe_3), 74.6 (C-3), 74.4 (C-2), 73.5 (C-5), 45.3, 45.0 (CH_2NHCS), 41.6 (CH_2NHBoc), 34.8 (C-6), 34.1 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 31.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 30.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 29.1 (CMe_3), 27.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$).

EM (ESI): m/z 1706.2 $[\text{M} + \text{Na} + \text{K}]^{2+}$, 1155.9 $[\text{M} + 3 \text{K}]^{3+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{140}\text{H}_{259}\text{N}_{21}\text{O}_{42}\text{S}_{14}$: C, 50.08; H, 7.78; N, 8.76. Encontrado: C, 49.94; H, 7.50; N, 8.61.

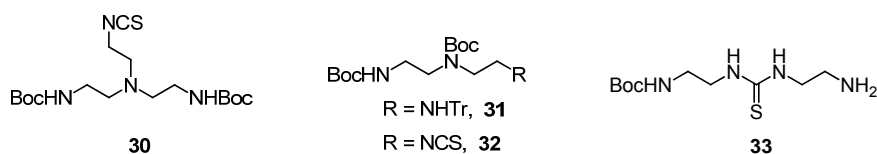
Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-(*N*'-(6-aminohexil)tioureido)etil)]-ciclomaltoheptaosa (29). Se hidrolizaron los grupos carbamato del compuesto **29** (40 mg, 11.9 μ mol), siguiendo el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose el compuesto **29**. Rend.: 34.7 mg (99%). $[\alpha]_D = +20.9$ (*c* 0.5, H₂O).

¹H RMN (500 MHz, D₂O, 333 K): δ = 5.41 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 4.33 (m, 7 H, H-5), 4.17 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.6$ Hz, H-3), 4.02 (m, 21 H, SCH₂CH₂NHCS, H-2), 3.87 (t, 7 H, H-4), 3.73 (m, 14 H, CH₂NHCS), 3.60 (dd, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.5$ Hz, H-6a), 3.33 (t, 14 H, $^3J_{H,H} = 7.6$ Hz, CH₂NH₂), 3.27 (m, 7 H, H-6b), 3.25 (t, 14 H, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, CH₂S_{Cist}), 2.00 (m, 14 H, CH₂CH₂NH₂), 1.93 (m, 14 H, CH₂CH₂NHCS) 1.72 (m, 28 H, CH₂CH₂CH₂NH₂, CH₂CH₂CH₂NHCS).

¹³C RMN (125.7 MHz, D₂O, 333 K): δ = 180.2 (CS), 102.3 (C-1), 85.1 (C-4), 73.5 (C-3), 72.5 (C-2), 72.2 (C-5), 44.4, 44.1 (CH₂NHCS), 40.1 (CH₂NH₂), 34.0 (CH₂S_{Cist}), 32.6 (C-6), 28.7, 27.1, 26.1, 25.9 (NHCSCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂).

EM (ESI): m/z 1329.0 [M + 2 H]²⁺, 886.1 [M + 3 H]³⁺, 664.8 [M + 4 H]⁴⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₀₅H₂₁₀Cl₇N₂₁O₂₈S₁₄·7H₂O: C, 41.51; H, 7.43; N, 9.68; S, 14.78. Encontrado: C, 41.54; H, 7.39; N, 9.65; S, 14.65.



2-[Bis[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)etil]amino]etil isotiocianato (30). A una disolución de 2-azidoetil-bis[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)etil]amina (**129**, 235 mg, 0.63 mmol) en dioxano (5 mL) se añadieron, bajo atmósfera de nitrógeno, TPP seca (184 mg, 0.7 mmol, 1.1 eq.) y CS₂ (0.38 mL, 6.3 mmol, 10 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 16 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-éter de petróleo 1:2). Rend.: 185 mg (76%). $R_f = 0.72$ (AcOEt-éter de petróleo 1:1).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ = 5.14 (sa, 2 H, NHBoc), 3.47 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, CH_2NCS), 3.14 (c, 4 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$, CH_2NHBoc), 2.75 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCS}$), 2.59 (t, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 1.43 (s, 9 H, CMe_3).

^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ = 156.2 (CO), 133.0 (NCS), 79.3 (CMe_3), 54.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCS}$), 43.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 43.9 (CH_2NCS), 38.6 (CH_2NHBoc), 28.4 (CMe_3).

EM (ESI): m/z 389.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$:

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$: C, 52.55; H, 8.30; N, 14.42.

Encontrado: C, 52.77; H, 8.27; N, 14.85.

(*tert*-Butoxicarbonil)-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]-[2-(trifenilmetilamino)etil]amina (31). A una disolución de 2-aminoetil-2-(trifenilmetilamino)etilamina³⁵⁶ (2.2 g, 6.4 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL) se añadió, gota a gota, una disolución de dicarbonato de di-*tert*-butilo (3.08 g, 14.1 mmol, 1.1 eq.) en CH_2Cl_2 (10 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-éter de petróleo 1:3). Rend.: 3.22 g (93%). R_f = 0.66 (AcOEt-éter de petróleo 1:3).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , 323 K): δ = 7.45 (d, 6 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, H-2_{Ph}, H-6_{Ph}), 7.26 (t, 6 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, H-3_{Ph}, H-5_{Ph}), 7.17 (t, 3 H, H-4_{Ph}), 4.80 (sa, 1 H, NHBoc), 3.33 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHTr}$), 3.31 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 3.21 (c, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, CH_2NHBoc), 2.36 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, CH_2NHTr), 1.43 (sa, 18 H, CMe_3).

^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ = 156.0 (CO), 146.0 (C-1_{Ph}), 128.6 (C-2_{Ph}, C-6_{Ph}), 127.8 (C-3_{Ph}, C-5_{Ph}), 126.2 (C-4_{Ph}), 79.9 (CMe_3), 70.9 (CPh_3), 48.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHTr}$), 47.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 42.6 (CH_2NHTr), 39.7 (CH_2NHBoc), 28.4 (CMe_3).

EM (ESI): m/z 546.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_4$: C, 72.63; H, 7.94; N, 7.70. Encontrado:

C, 72.54; H, 7.67; N, 7.56.

2-[[2-(*tert*-Butoxicarbonilamino)etil]-(*tert*-butoxicarbonil)amino]etil]-isotiocianato (32). El compuesto **31** (0.35 g, 0.64 mmol) se trató con una disolución de TFA al 2% en CH₂Cl₂ (10 mL) durante 1.5 h. A continuación, se suspendió el crudo en H₂O-CH₂Cl₂ (1:1, 10 mL), se añadió CaCO₃ (641 mg, 6.4 mmol, 10 eq.) y la mezcla se agitó vigorosamente durante unos minutos. Se enfrió la disolución a 0 °C, se añadió CSeCl₂ (73 µL, 0.96 mmol, 1.5 eq.) y se agitó durante 1 h. Se decantó la fase orgánica, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-éter de petróleo 1:2). Rend.: 0.14 g (64%). *R*_f = 0.5 (AcOEt-éter de petróleo 1:2).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 323 K): δ = 4.75 (sa, 1 H, NHBoc), 3.64 (ta, 2 H, CH₂NCS), 3.45 (t, 2 H, ³*J*_{H,H} = 6.1 Hz, CH₂CH₂NCS), 3.35 (t, 2 H, ³*J*_{H,H} = 6.0, CH₂CH₂NHBoc), 3.24 (m, 2 H, ³*J*_{H,H} = 6.0 Hz, CH₂NHTr), 1.46, 1.42 (s, 18 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.5 MHz, CDCl₃, 313 K): δ = 156.0 (CO), 128.1 (NCS), 81.0 (CMe₃), 47.8 (CH₂CH₂NCS, CH₂CH₂NHBoc), 44.0 (CH₂NCS), 39.7 (CH₂NHBoc), 28.6 (CMe₃).

EM (ESI): *m/z* 368.2 [M + Na]⁺, 384.1 [M + K]⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₅H₂₇N₃O₄S: C, 52.15; H, 7.88; N, 12.16. Encontrado: C, 51.96; H, 7.723, N, 12.01.

***N*-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]-*N'*(2-aminoetil)tiourea (33).** Una disolución de 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil isotiocianato (**114**, 0.5 g, 2.47 mmol) en acetona (10 mL) se añadió sobre una disolución de etilendiamina (0.74 g, 12.35 mmol, 10 eq.) en H₂O (10 mL), gota a gota y con buena agitación. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (MeCN-H₂O-NH₄OH 30:2:1). Rend.: 0.65 g (82%). *R*_f = 0.34 (MeCN-H₂O-NH₄OH 30:2:1).

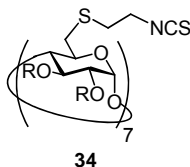
¹H RMN (300 MHz, MeOD, 298 K): δ = 3.54 (m, 4 H, CH₂NHCS), 3.23 (t, 2 H, ³*J*_{H,H} = 6.2 Hz, CH₂NH₂), 2.81 (t, 2 H, ³*J*_{H,H} = 6.3 Hz, CH₂NHBoc), 1.44 (s, 9 H, CMe₃).

¹³C RMN (75.5 MHz, MeOD, 313 K): δ = 184.2 (CS), 158.8 (CO), 80.3 (CMe₃), 47.3 (CH₂CH₂NHBoc), 45.2 (CH₂CH₂NH₂), 41.8 (CH₂NH₂), 40.9 (CH₂NHBoc), 28.8 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 263.1 $[M + H]^+$.

Análisis elemental. Calculado para $C_{10}H_{22}N_4O_4S$: C, 45.78; H, 8.45; N, 21.35.

Encontrado: C, 45.40; H, 8.16; N, 21.02.



Heptaquis[2,3-di-O-acetil-6-(2-isotiocianatoetiltilio)]ciclomaltoheptaosa (34).

A una mezcla heterogénea de **21** (0.52 g, 0.18 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL), $CaCO_3$ (438 mg 4.38 mmol, 3.5 eq.) y H_2O (10 mL), se añadió $CSCl_2$ (115 μ L, 0.21 mmol, 1.2 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h y, posteriormente, se añadió CH_2Cl_2 (6 mL) y se lavó con disolución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (6 mL). La fase orgánica se decantó, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). Rend.: 0.39 g (90%). $R_f = 0.29$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_D = +120.3$ (c 0.92, CH_2Cl_2).

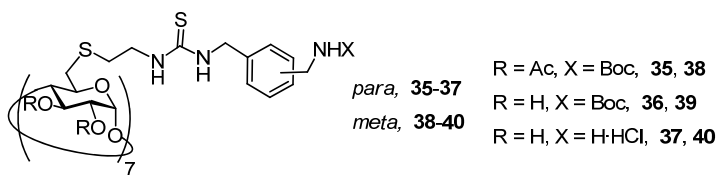
1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$, 313 K): $\delta = 5.30$ (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.9$ Hz, H-3), 5.13 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 4.85 (dd, 7 H, H-2), 4.19 (m, 7 H, H-5), 3.86 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.9$ Hz, H-4), 3.82 (t, 14 H, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, CH_2NCS), 3.22 (dd, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.5$ Hz, $J_{5,6a} = 1.6$ Hz, H-6a), 3.04 (m, 21 H, H-6b, CH_2S_{Cist}), 2.11, 2.07 (2 s, 42 H, $COCH_3$).

^{13}C RMN (100.6 MHz, $CDCl_3$, 313 K): $\delta = 170.6$, 169.5 (2 CO éster), 132.1 (NCS), 96.9 (C-1), 78.9 (C-4), 71.7 (C-3), 70.7 (C-2), 70.4 (C-5), 45.6 (CH_2NCS), 34.1 (CH_2S_{Cist} , C-6), 20.8 ($COCH_3$).

EM (ESI): m/z 2446.9 $[M + Na]^+$, 1235.1 $[M + 2 Na]^{2+}$.

Análisis elemental. Calculado para $C_{91}H_{119}N_7O_{42}S_{14}$: C, 44.94; H, 4.93; N, 4.03; S, 18.46.

Encontrado: C, 45.15; H, 4.76; N, 3.87; S, 18.27.



Heptaakis[2,3-di-O-acetil-6-(2-(N'-(4-(*tert*-butoxycarbonilaminometil)-

bencil)tioureido)etil)tiolo]ciclomaltoheptaosa (35). A una disolución de **21** (52 mg, 17.6 μ mol) y Et₃N (34 μ L, 0.25 mmol, 2 eq.) en CH₂Cl₂ seco (1.5 mL) se le añadió, gota a gota, una disolución de 4-(*tert*-butoxycarbonilaminometil)-bencilisotiocianato³⁵³ (**119**, 39 mg, 0.136 mmol, 1.1 eq.) en CH₂Cl₂ seco (1.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 24 h, se secó (Na₂SO₄), se concentró y se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 20:1). Rend.: 51 mg (71%). *R*_f = 0.52 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1). [α]_D = +48.4 (*c* 0.98, CH₂Cl₂).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, 313 K): δ = 7.15, 7.14 (2 s, 28 H, Ar), 6.96 (sa, 14 H, NHCS), 5.28 (t, 7 H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 8.8 Hz, H-3), 5.25 (sa, 7 H, *NHBoc*), 5.15 (sa, 7 H, H-1), 4.80 (dd, 7 H, *J*_{1,2} = 3.2 Hz, H-2), 4.52 (sa, 14 H, PhCH₂NHCS), 4.19 (m, 21 H, H-5, CH₂NHBoc), 3.77 (t, 7 H, *J*_{4,5} = 8.0 Hz, H-4), 3.69 (sa, 14 H, CH₂CH₂S_{Cist}), 3.25 (da, 7 H, *J*_{6a,6b} = 12.8 Hz, H-6a), 3.02 (m, 7 H, H-6b), 2.90 (m, 7 H, CH₂S_{Cist}a), 2.79 (m, 7 H, CH₂S_{Cist}b), 2.10, 2.07 (2 s, 42 H, COCH₃), 1.44 (s, 63 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 313 K): δ = 182.2 (CS), 170.7, 169.3 (2 CO éster), 156.2 (CO carbamato), 138.4, 136.6, 127.9, 127.5 (Ph), 96.8 (C-1), 79.6 (CMe₃), 79.4 (C-4), 71.7 (C-5), 70.8 (C-3), 70.6 (C-2), 48.0 (PhCH₂NCS), 44.3 (CH₂NHBoc), 43.9 (CH₂CH₂S_{Cist}), 33.7 (C-6), 33.0 (CH₂S_{Cist}), 28.4 (CMe₃), 20.7 (COCH₃).

EM (ESI): *m/z* 2071.1 [M + 2 Na]²⁺, 1388.1 [M + 3 Na]³⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₈₂H₂₅₉N₂₁O₅₆S₁₄: C, 53.50; H, 6.39; N, 7.20; S, 10.99. Encontrado: C, 53.28; H, 6.12; N, 6.97; S, 10.77.

Heptaquis[6-(2-(*N'*-(4-(*terc*-butoxicarbonilaminometil)bencil)tioureido)-etil]ciclomaltoheptaosa (36). El compuesto **36** se obtuvo por desacetilación convencional de **35** (55 mg, 13 μ mol), siguiendo el procedimiento descrito en los métodos generales. Rend.: 45.3 mg (96%). $R_f = 0.58$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 10:2:1). $[\alpha]_D = +37.7$ (*c* 0.8, MeOH).

¹H RMN (500 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 7.20$ (m, 28 H, Ph), 4.92 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, H-1), 4.60 (m, 14 H, PhCH₂NHCS), 4.19 (m, 14 H, CH₂NHBoc), 4.01 (m, 7 H, H-5), 3.77 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$ Hz, H-3), 3.64 (m, 28 H, CH₂NHCS), 3.48 (m, 14 H, H-2, H-4), 3.14 (m, 7 H, H-6a), 2.93 (dd, 7 H, $J_{6a,6b} = 14.4$ Hz, $J_{5,6b} = 7.8$ Hz, H-6b), 2.82 (m, 14 H, CH₂S_{Cist}), 1.42 (s, 63 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 182.3$ (CS), 156.9 (CO), 138.7, 137.2, 127.4, 127.2, 127.1, 127.0 (Ph), 102.6 (C-1), 84.8 (C-4), 79.0 (C_q), 73.2 (C-3), 72.9 (C-2), 72.1 (C-5), 46.8 (PhCH₂NCS), 43.7 (CH₂NHBoc), 33.3 (CH₂S_{Cist}), 32.6 (C-6), 27.7 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 1771.0 [M + 2 Na]²⁺, 1188.9 [M + 3 Na]³⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₅₄H₂₃₁N₂₁O₄₂S₁₄: C, 52.88; H, 6.66; N, 8.41. Encontrado: C, 52.53; H, 6.30; N, 8.24.

Heptahidrocloreuro de heptaquis[6-(2-(*N'*-(4-aminometil)bencil)tioureido)-etil]ciclomaltoheptaosa (37). Se hidrolizaron los grupos carbamato del compuesto **36** (33 mg, 9.4 μ mol) mediante el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose el compuesto **37** analíticamente puro. Rend.: 29 mg, (99%). $[\alpha]_D = +11.2$ (*c* 1.0, H₂O).

¹H RMN (300 MHz, D₂O, 323 K): $\delta = 7.64$, 7.56 (sa, 28 H, Ar), 5.24 (sa, 7 H, H-1), 4.84 (sa, 14 H, PhCH₂NHCS), 4.39 (m, 14 H, CH₂NH₂), 4.19 (sa, 7 H, H-5), 3.90 (m, 28 H, H-3, CH₂NHCS, H-2), 3.69 (sa, 7 H, H-4), 3.48 (sa, 7 H, H-6a), 3.11 (m, 21 H, H-6b, CH₂S_{Cist}).

¹³C RMN (100.6 MHz, D₂O, 323 K): $\delta = 183.5$ (CS), 141.6, 134.4, 131.7, 131.6, 130.3, 130.2 (Ph), 104.5 (C-1), 87.2 (C-4), 78.0 (C-3), 75.5 (C-2), 74.6 (C-5), 49.5 (PhCH₂NCS), 45.8 (CH₂NHCS), 45.5 (CH₂NH₂), 36.1 (C-6), 34.6 (CH₂S_{Cist}).

EM (ESI): m/z 1399.3 $[M + 2 H]^2+$, 932.6 $[M + 3 H]^3+$, 699.7 $[M + 4 H]^4+$

Análisis elemental. Calculado para $C_{119}H_{182}Cl_7N_{21}O_{28}S_{14}$: C, 46.83; H, 6.01; N, 9.64; S, 14.71. Encontrado: C, 46.51; H, 6.12, N, 9.33; S, 14.36.

Heptaquis[2,3-di-*O*-acetil-6-(2-(*N'*-(3-(*tert*-butoxicarbonilaminometil)-bencil)tioureido)etil)io]ciclomaltoheptaosa (38). A una disolución de **21** (52 mg, 17.6 μ mol) y Et_3N (34 μ L, 0.25 mmol, 2 eq.) en CH_2Cl_2 seco (2.5 mL) se le añadió, gota a gota, una disolución de 3-(*tert*-butoxicarbonilaminometil)bencilisotiocianato³⁵³ (**118**, 39 mg, 0.136 mmol, 1.1 eq.) en CH_2Cl_2 seco (2.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 24 h, se secó (Na_2SO_4), se concentró y se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). Rend.: 53 mg (74%). $R_f = 0.6$ (CH_2Cl_2 -MeOH 10:1). $[\alpha]_D = +56.8$ (c 1.03, CH_2Cl_2).

1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$, 313 K): $\delta = 7.19$ (t, 7 H, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, Ar-5), 7.10 (d, 7 H, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, Ar-6), 7.06 (d, 7 H, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, Ar-4), 7.02 (s, 7 H, Ar-2), 6.95 (sa, 14 H, NHCS), 5.25 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4$ Hz, H-3), 5.23 (sa, 7 H, *NHBoc*), 5.11 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, H-1), 4.77 (dd, 7 H, H-2), 4.46 (m, 14 H, $PhCH_2NHCS$), 4.16 (m, 21 H, H-5, CH_2NHBoc), 3.75 (t, 7 H, $J_{4,5} = 9.0$ Hz, H-4), 3.71 (sa, 14 H, $CH_2CH_2S_{cist}$), 3.21 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.3$ Hz, H-6a), 3.04 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 6.3$ Hz, H-6b), 2.89 (m, 7 H, $CHaS_{cist}$), 2.78 (m, 7 H, $CHbS_{cist}$), 2.06, 2.02 (2 s, 42 H, $COCH_3$), 1.39 (s, 63 H, CMe_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$, 313 K): $\delta = 182.3$ (CS), 170.7, 169.3 (2 CO éster), 156.2 (CO carbamato), 139.5, 138.0, 128.9, 126.6, 126.5, 126.2 (Ph), 96.8 (C-1), 79.8 (CMe_3), 79.3 (C-4), 71.6 (C-5), 70.9 (C-3), 70.6 (C-2), 48.2 ($PhCH_2NCS$), 44.5 (CH_2NHBoc), 43.9 ($CH_2CH_2S_{cist}$), 33.6 (C-6), 33.0 (CH_2S_{cist}), 28.4 (CMe_3)

EM (ESI): m/z 2062.5 $[M + 2 Na]^2+$.

Análisis elemental. Calculado para $C_{182}H_{259}N_{21}O_{56}S_{14}$: C, 53.50; H, 6.39; N, 7.20; S, 10.99. Encontrado: C, 53.42; H, 6.20; N, 6.98; S, 10.69.

Heptaquis[6-(2-(N'-(3-(*tert*-butoxicarbonilaminometil)bencil)tioureido)-etil)]ciclomaltoheptaosa (39). El compuesto **39** se obtuvo por desacetilación convencional de **38** (54 mg, 13 μ mol), siguiendo el procedimiento descrito en los métodos generales. Rend.: 45.5 mg (99%). $R_f = 0.55$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 10:2:1). $[\alpha]_D = +41.2$ (c 0.6, MeOH).

¹H RMN (400 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 7.23$ (t, 7 H, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, Ar-5), 7.18 (s, 7 H, Ar-2), 7.14 (da, 14 H, Ar-4, Ar-6), 4.93 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1), 4.60 (sa, 14 H, PhCH₂NHCS), 4.19 (s, 14 H, CH₂NHBoc), 4.01 (m, 7 H, H-5), 3.78 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$ Hz, H-3), 3.67 (m, 28 H, CH₂NHCS), 3.48 (m, 14 H, H-2, H-4), 3.17 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.3$ Hz, H-6a), 2.93 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 6.3$ Hz, H-6b), 2.84 (m, 14 H, CH₂S_{Cist}), 1.42 (s, 63 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 182.3$ (CS), 156.9 (CO), 140.3, 139.9, 128.5, 126.2, 126.0, 125.9 (Ph), 102.3 (C-1), 84.8 (C-4), 79.1 (C_q), 73.2 (C-3), 73.0 (C-2), 72.1 (C-5), 46.8 (PhCH₂NCS), 44.0 (CH₂NHBoc), 33.4 (CH₂S_{Cist}), 32.6 (C-6), 27.7 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 1771.2 [M + 2 Na]²⁺, 1188.8 [M + 3 Na]³⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₅₄H₂₃₁N₂₁O₄₂S₁₄: C, 52.88; H, 6.66; N, 8.41. Encontrado: C, 52.70; H, 6.536; N, 8.266.

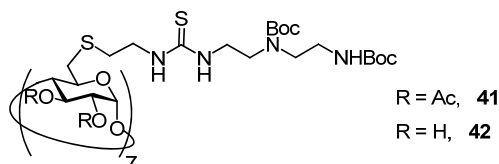
Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-(N'-(3-aminometil)bencil)tioureido)-etil)]ciclomaltoheptaosa (40). Se hidrolizaron los grupos carbamato del compuesto **39** (38 mg, 10.9 μ mol) mediante el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose el compuesto **40**. Rend.: 33 mg (99%). $[\alpha]_D = +13.1$ (c 1.0, H₂O).

¹H RMN (500 MHz, D₂O, 313 K): $\delta = 7.67$ (t, 7 H, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, Ar-5), 7.60 (d, 7 H, Ar-5), 7.56 (s, 7 H, Ar-2), 7.55 (d, 7 H, Ar-4), 5.25 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 4.90 (sa, 14 H, PhCH₂NHCS), 4.40 (s, 14 H, CH₂NH₂), 4.21 (ta, 7 H, $J_{4,5} = 9.0$ Hz, H-5), 3.99 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 3.91 (ta, 14 H, CH₂NHCS), 3.86 (dd, 7 H, H-2), 3.70 (t, 7 H, H-4), 3.49 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.2$ Hz, H-6a), 3.14 (m, 21 H, H-6b, CH₂S_{Cist}).

^{13}C RMN (125.7 MHz, D_2O , 313 K): $\delta = 181.1$ (CS), 139.2, 133.3, 129.8, 127.9, 127.7 (Ph), 102.0 (C-1), 84.8 (C-4), 73.1 (C-3), 72.2 (C-2, C-5), 47.3 (PhCH₂NCS), 43.9 (CH₂NHCS), 43.2 (CH₂NH₂), 33.6 (C-6), 32.2 (CH₂S_{Cist}).

EM (ESI): m/z 1398.3 [M + 2 H]²⁺, 932.6 [M + 3 H]³⁺, 699.7 [M + 4 H]⁴⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₁₉H₁₈₂Cl₇N₂₁O₂₈S₁₄: C, 46.83; H, 6.01; N, 9.64; S, 14.71. Encontrado: C, 46.58; H, 6.19; N, 9.43; S, 14.46.



Heptaakis[2,3-di-O-acetil-6-(2-(N'-[2-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)etil]-tioureido)etil]tioureido)etil]ciclomaltoheptaosa (41). A una disolución de **21** (0.1 g, 34 μmol) y Et₃N (83 μL , 0.60 mmol, 2.5 eq.) en CH₂Cl₂ (2.5 mL) se adicionó una disolución de **32** (90 mg, 0.26 mmol, 1.1 eq.) en CH₂Cl₂ (2.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 24 h. Los disolventes se evaporaron bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 20:1). Rend.: 110 mg (71%). $R_f = 0.41$ (CH₂Cl₂-MeOH 20:1). $[\alpha]_D = +63.0$ (c 0.99, CH₂Cl₂).

^1H RMN (300 MHz, CDCl₃, 313 K): $\delta = 7.28$ (sa, 14 H, NHCS), 5.28 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 5.12 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1), 5.11 (sa, 7 H, NHBoc), 4.78 (dd, 7 H, H-2), 4.17 (m, 7 H, H-5), 3.82 (t, 7 H, $J_{4,5} = 9.0$ Hz, H-4), 3.71 (m, 14 H, CH₂CH₂S_{Cist}), 3.62 (m, 14 H, CSNHCH₂CH₂NBoc), 3.39 (ta, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, CSNHCH₂CH₂NBoc), 3.33 (m, 14 H, CH₂CH₂NHBoc), 3.23 (ca, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.3$ Hz, CH₂NHBoc), 3.19 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 12.7$ Hz, H-6a), 3.07 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 4.7$ Hz, H-6b), 2.86 (m, 14 H, CH₂S_{Cist}), 2.06, 2.02 (2 s, 42 H, COCH₃), 1.46, 1.41 (2 s, 126 H, CMe₃).

^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl₃, 313 K): $\delta = 182.2$ (CS), 170.8, 169.5 (2 CO éster), 156.6, 156.3 (2 CO carbamato), 96.9 (C-1), 80.7, 79.5 (2 CMe₃), 79.0 (C-4), 71.6 (C-5), 71.1

(C-3), 70.8 (C-2), 47.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 47.0 ($\text{BocNCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 43.9 ($\text{BocNCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 43.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 39.8 (CH_2NHBoc), 33.8 (C-6), 33.0 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 28.6 (CMe_3), 20.9 (COCH_3).

EM (ESI): m/z 2320.6 $[\text{M} + 2 \text{K}]^{2+}$, 1552.8 $[\text{M} + 3 \text{K}]^{3+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{189}\text{H}_{322}\text{N}_{28}\text{O}_{70}\text{S}_{14}$: C, 49.83; H, 7.12; N, 8.61; S, 9.85.

Encontrado: C, 49.57; H, 6.79; N, 8.33; S, 9.51.

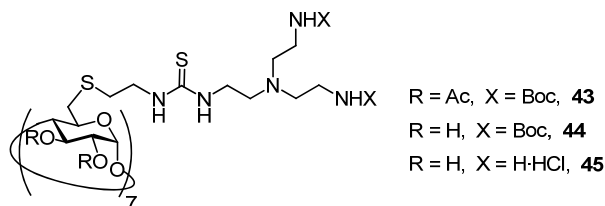
Heptaquis[6-(2-(*N*'-[2-(2-(*terc*-butoxicarbonilamino)etil)-(terc-butoxi-carbonilamino)etil]tioureido)etil)tiociclomaltoheptaosa (42): El compuesto **42** se obtuvo por desacetilación convencional de **41** (33 mg, 7 μmol), siguiendo el procedimiento descrito en los métodos generales. Rend.: 28 mg (97%). $R_f = 0.6$ (MeCN- H_2O - NH_4OH 10:2:1). $[\alpha]_{\text{D}} = +30.0$ (c 1.02, MeOH).

^1H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 5.00$ (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 4.02 (m, 7 H, H-5), 3.83 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.6$ Hz, H-3), 3.73 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.66 (m, 14 H, $\text{BocNCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 3.57 (t, 7 H, $J_{4,5} = 9.6$ Hz, H-4), 3.53 (dd, 7 H, H-2), 3.44 (t, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2\text{NBoc}$), 3.36 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 3.23 (m, 21 H, CH_2NHBoc , H-6a), 3.01 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 6.0$ Hz, $J_{6a,6b} = 14.1$ Hz, H-6b), 2.93 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 1.50, 1.46 (2 s, 126 H, CMe_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 184.1$ (CS), 158.2, 157.7 (2 CO), 104.0 (C-1), 86.1 (C-4), 81.5, 80.2 (2 CMe_3), 74.5 (C-3), 74.3 (C-2), 73.6 (C-5), 49.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 47.2 ($\text{NBocCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 45.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 43.8 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 40.1 (CH_2NHBoc), 34.8 (C-6), 34.0 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 29.0 (CMe_3).

EM (ESI): m/z 2011.5 $[\text{M} + \text{Na} + \text{K}]^{2+}$, 1349.4 $[\text{M} + 2 \text{Na} + \text{K}]^{3+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{161}\text{H}_{294}\text{N}_{28}\text{O}_{56}\text{S}_{14}$: C, 48.74; H, 7.47; N, 9.89; S, 11.32. Encontrado: C, 48.33; H, 7.13; N, 9.56; S, 11.01.



Heptaakis[2,3-di-O-acetil-6-(2-(N'-(2-(N,N-bis(2-(*tert*-butoxicarbonyl-amino)etil)amino)etil)tioureido)etil)tiol]ciclomaltoheptaosa (43). A una disolución de **21** (80 mg, 28 μmol) y Et_3N (68 μL , 0.49 mmol, 2.5 eq.) en CH_2Cl_2 seco (2.5 mL) se le añadió, gota a gota, una disolución de **30** (92 mg, 0.24 mmol, 1.2 eq.) en CH_2Cl_2 seco (2.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 24 h, se secó (Na_2SO_4), se concentró y se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). Rend.: 105 mg (76%). $R_f = 0.5$ (CH_2Cl_2 -MeOH 9:1). $[\alpha]_D = +51.0$ (c 0.98, CH_2Cl_2).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 313 K): $\delta = 7.23, 7.14$ (2 sa, 14 H, NHCS), 5.26 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 5.21 (sa, 14 H, NHBoc), 5.10 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1), 4.77 (dd, 7 H, H-2), 4.17 (m, 7 H, H-5), 3.82 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.7$ Hz, H-4), 3.75 (sa, 14 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.52 (sa, 14 H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 3.13 (m, 42 H, H-6a, H-6b, CH_2NHBoc), 2.87 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{cist}}$), 2.65 (ta, 14 H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 2.56 (ta, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 2.06, 2.02 (2 s, 42 H, COCH_3), 1.43 (s, 126 H, CMe_3).

^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3 , 313 K): $\delta = 184.8$ (CS), 172.9, 171.6 (2 CO éster), 158.8 (CO carbamato), 99.0 (C-1), 81.6 (CMe_3), 81.5 (C-4), 73.0 (C-5, C-3, C-2), 56.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 56.3 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 44.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 41.0 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$, CH_2NHBoc), 36.0 (C-6), 35.3 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{cist}}$), 30.6 (CMe_3), 23.0, 22.9 (COCH_3).

EM (ESI): m/z 2463.4 $[\text{M} + 2 \text{Cl}]^{2-}$, 2458.8 $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{203}\text{H}_{357}\text{N}_{35}\text{O}_{70}\text{S}_{14}$: C, 50.20; H, 7.41; N, 10.09; S, 9.24. Encontrado: C, 50.01; H, 7.22; N, 9.81; S, 8.94.

Heptaquis[6-(2-(N'-2-(N,N-bis-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino)-etil)tioureido)etiltio]ciclomaltoheptaosa (44). El compuesto **44** se obtuvo por desacetilación convencional de **43** (76 mg, 15.7 μ mol), siguiendo el procedimiento descrito en los métodos generales. Rend.: 45.5 mg (99%). $R_f = 0.50$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 10:1:1). $[\alpha]_D = +33.3$ (c 0.8, MeOH).

¹H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 4.96$ (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 4.03 (m, 7 H, H-5), 3.79 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.8$ Hz, H-3), 3.74 (ta, 14 H, CH₂CH₂S_{cist}), 3.51 (m, 28 H, H-2, H-4, NCH₂CH₂NHCS), 3.24 (m, 7 H, $J_{6a,6b} = 14.3$ Hz, $J_{5,6a} = 1.8$ Hz, H-6a), 3.12 (ta, 14 H, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, CH₂NHBoc), 2.97 (m, 7 H, $J_{5,6b} = 5.9$ Hz, H-6b), 2.87 (m, 14 H, CH₂S_{cist}), 2.69 (ta, 14 H, $^3J_{H,H} = 5.6$ Hz, NCH₂CH₂NHCS), 2.59 (ta, 28 H, CH₂CH₂NHBoc), 1.44 (sa, 126 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 183.6$ (CS), 158.5 (CO), 104.1 (C-1), 86.2 (C-4), 80.3 (C_q), 74.5 (C-3), 74.4 (C-2), 73.6 (C-5), 55.7 (CH₂CH₂NHBoc), 54.8 (NCH₂CH₂NHCS), 45.3 (CH₂CH₂S_{cist}), 43.6 (NCH₂CH₂NHCS), 40.1 (CH₂NHBoc), 34.9 (C-6), 34.2 (CH₂S_{cist}), 29.1 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 2135.1 [M + 2 H]²⁺, 1441.3 [M + 3 Na]³⁺

Análisis elemental. Calculado para C₁₇₅H₃₂₉N₃₅O₅₆S₁₄: C, 49.24; H, 7.77; N, 11.48. Encontrado: C, 49.25; H, 7.71; N, 11.37.

Alternativamente, el compuesto **44** se preparó por reacción de **113** (0.1 g, 55 μ mol) y Et₃N (0.19 mL, 1.35 mmol, 3.5 eq.) con **30** (0.18 g, 0.47 mmol, 1.2 eq.) en una mezcla de H₂O-piridina (1:2, 6 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a t.a. Se eliminaron los disolventes a presión reducida y el residuo se lavó con tolueno (3 x 10 mL), se disolvió en CH₂Cl₂ (20 mL) y se lavó con H₂O (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró obteniéndose **47** (0.22 g, 93%).

Tetradecahidrocloreuro de heptaquis[6-(2-(N'-2-(N,N-bis-(2-aminoetil)amino)-etil)tioureido)etiltio]ciclomaltoheptaosa (45). Se hidrolizaron los grupos carbamato del compuesto **44** (44 mg, 10.3 μ mol) mediante el procedimiento descrito en los métodos

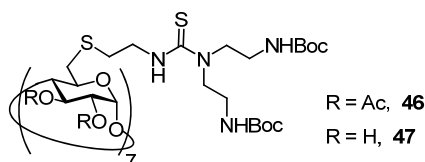
generales, obteniéndose el compuesto **45** puro. Rend.: 34.7 mg (99%). $[\alpha]_D = + 20.3$ (c 1.0, H₂O).

¹H RMN (500 MHz, D₂O, 333 K): $\delta = 5.46$ (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.3$ Hz, H-1), 4.30 (m, 7 H, H-5), 4.26 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 4.09 (m, 28 H, NCH₂CH₂NHCS, CH₂CH₂S_{Cist}), 4.02 (dd, 7 H, H-2), 3.98 (t, 7 H, H-4), 3.65 (m, 28 H, CH₂NH₂), 3.52 (m, 35 H, CH₂CH₂NH₂, H-6a), 3.40 (m, 21 H, H-6b, CH₂S_{Cist}), 3.29 (m, 14 H, NCH₂CH₂NHCS).

¹³C RMN (75.5 MHz, D₂O, 333 K): $\delta = 181.9$ (CS), 102.2 (C-1), 84.8 (C-4), 73.3 (C-3), 72.4 (C-2, C-5), 53.4 (NCH₂CH₂NHCS), 50.9 (NCH₂CH₂NHCS), 44.2 (CH₂CH₂S_{Cist}), 39.8 (CH₂NH₂), 35.2 (CH₂CH₂NH₂), 33.8 (C-6), 32.4 (CH₂S_{Cist}).

EM (ESI): m/z 1434.1 [M + 2 H]²⁺, 956.4 [M + 3 H]³⁺, 717.2 [M + 4 H]⁴⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₀₅H₂₃₁Cl₁₄N₃₅O₂₈S₁₄: C, 37.34; H, 6.89; N, 14.52. Encontrado: C, 37.01; H, 6.67; N, 14.22.



Heptaquis[2,3-di-O-acetil-6-(2-(N',N'-bis(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)-tioureido)etil)]ciclomaltoheptaosa (46**).** A una disolución de **34** (0.11 g, 45 μ mol) en CH₂Cl₂ (5 mL) se añadió una disolución de bis(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amina²⁵ (97, 105 mg, 0.35 mmol, 1.1 eq.) y Et₃N (50 μ L, 0.35 mmol, 1.1 eq.) en CH₂Cl₂ (5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 50:1 \rightarrow 20:1). Rend.: 178 mg (83%). $R_f = 0.37$ (CH₂Cl₂-MeOH 20:1). $[\alpha]_D = + 59.0$ (c 1.0, CH₂Cl₂).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 313 K): $\delta = 7.35$ (sa, 7 H, NHCS), 5.45 (sa, 14 H, NHBoc), 5.30 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4$ Hz, H-3), 5.15 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1), 4.82 (dd, 7 H, H-2), 4.22 (m, 7 H, H-5), 3.90 (m, 21 H, H-4, CH₂CH₂S_{Cist}), 3.36 (m, 28 H,

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 3.36 (m, 28 H, CH_2NHBoc), 3.19 (m, 14 H, H-6), 2.99 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.10, 2.06 (2 s, 42 H, COCH_3), 1.47 (s, 126 H, CMe_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, CDCl_3 , 313 K): δ = 181.8 (CS), 170.6, 169.3 (2 CO éster), 156.6 (CO carbamato), 96.8 (C-1), 79.7 (CMe_3), 78.7 (C-4), 71.3 (C-5), 70.7 (C-3, C-2), 50.8 (CH_2NCS), 45.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 38.6 (CH_2NHBoc), 33.6 (C-6), 32.7 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 28.5 (CMe_3), 20.7 (COCH_3).

EM (ESI): m/z 2297.5 $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{189}\text{H}_{322}\text{N}_{28}\text{O}_{70}\text{S}_{14}$: C, 49.83; H, 7.12; N, 8.61; S, 9.85.

Encontrado: C, 49.61; H, 6.85; N, 8.29; S, 9.50.

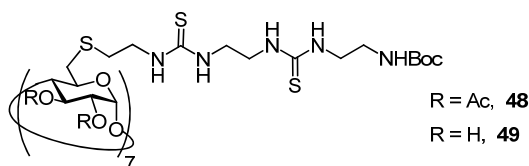
Heptaquis[6-(2-(N',N' -bis-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)tioureido)-etil)]ciclomaltoheptaosa (47). El compuesto **47** se obtuvo por desacetilación convencional de **46** (74 mg, 16 μmol), siguiendo el procedimiento descrito en los métodos generales. Rend.: 54 mg (85%). R_f = 0.88 (MeCN- H_2O - NH_4OH 6:3:1). $[\alpha]_D^{25} = +19.4$ (c 0.92, MeOH).

^1H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): δ = 5.01 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 4.03 (m, 7 H, H-5), 3.91 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.88 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 3.84 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$ Hz, H-3), 3.79 (m, 28 H, CH_2NHBoc), 3.32 (m, 7 H, H-6a), 3.00 (ta, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.98 (m, 7 H, H-6b), 1.49 (s, 126 H, CMe_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, CDCl_3 , 313 K): δ = 181.8 (CS), 170.6, 169.3 (2 CO éster), 156.6 (CO carbamato), 96.8 (C-1), 79.7 (CMe_3), 78.7 (C-4), 71.3 (C-5), 70.7 (C-3, C-2), 50.8 (CH_2NCS), 45.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 38.6 (CH_2NHBoc), 33.6 (C-6), 32.7 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 28.5 (CMe_3), 20.7 (COCH_3).

EM (ESI): m/z 2011.0 $[\text{M} + \text{Na} + \text{K}]^{2+}$, 1348.8 $[\text{M} + \text{H} + 2 \text{K}]^{3+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{161}\text{H}_{294}\text{N}_{28}\text{O}_{56}\text{S}_{14}$: C, 48.74; H, 7.47; N, 9.89; S, 11.32. Encontrado: C, 48.48; H, 7.20; N, 9.59; S, 11.12.



Heptaakis[2,3-di-*O*-acetil-6-(2-(*N'*-[2-(*N'*-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-etil]tioureido)etil]tioureido)etil]tioureido)ciclomaltoheptaosa (48**).** A una disolución de **34** (60 mg, 25 μmol) en CH_2Cl_2 (1.5 mL), se añadió una disolución de **22** (54 mg, 0.21 mmol, 1.2 eq.) y Et_3N (29 μL , 0.21 mmol, 1.2 eq.) en CH_2Cl_2 (1.5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). Rend.: 71 mg (67%). $R_f = 0.66$ (CH_2Cl_2 -MeOH 9:1). $[\alpha]_D = +38.2$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

^1H RMN (500 MHz, DMSO, 333 K): $\delta = 7.53$ (ta, 7 H, $\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 7.45 (ta, 7 H, $\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 7.42 (ta, 7 H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 7.37 (ta, 28 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, $\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 6.58 (sa, 7 H, NHBoc), 5.23 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$ Hz, H-3), 5.12 (m, 7 H, H-1), 4.74 (dd, 7 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-2), 4.14 (m, 7 H, H-5), 3.92 (m, 7 H, H-4), 3.6 (m, 14 H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 3.54 (m, 28 H, $\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 3.45 (ca, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, $\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 3.09 (m, 28 H, H-6, CH_2NHBoc), 2.82 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.09, 2.06 (2 s, 42 H, COCH_3), 1.40 (s, 63 H, CMe_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, DMSO, 313 K): $\delta = 183.2$ (CS), 170.4, 169.7 (2 CO éster), 156.2 (CO carbamato), 97.1 (C-1), 79.3 (CMe_3), 78.3 (C-4), 71.8 (C-5), 70.9 (C-2, C-3), 44.1 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$, $\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 43.5 ($\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 40.5 (CH_2NHBoc), 33.9 (C-6), 33.1 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 28.8 (CMe_3), 20.9 (COCH_3).

EM (ESI): m/z 2153.0 $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{161}\text{H}_{273}\text{N}_{35}\text{O}_{56}\text{S}_{21}$: C, 45.30; H, 6.45; N, 11.49; S, 15.78. Encontrado: C, 45.02; H, 6.20; N, 11.22; S, 15.41.

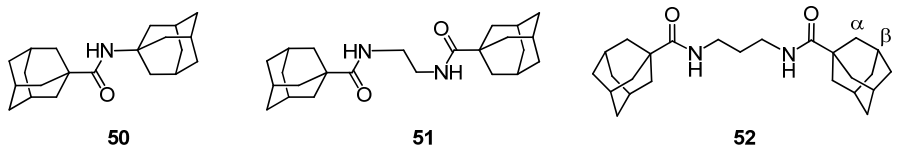
Heptaquis[6-(2-(*N*'-[2-(*N*'-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)tioureido)etil]-tioureido)etil]tioureido)ciclomaltoheptaosa (49). El compuesto **49** se obtuvo por desacetilación convencional de **48** (50 mg, 11.7 μmol), siguiendo el procedimiento descrito en los métodos generales. Rend.: 43 mg (99%). $R_f = 0.7$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 6:3:1). $[\alpha]_D = +36.7$ (c 0.29, DMSO).

¹H RMN (400 MHz, DMSO, 333 K): $\delta = 7.80\text{-}7.40$ (m, 28 H, NHCS), 6.54 (sa, 7 H, *NHBoc*), 4.91 (m, 7 H, H-1), 3.87 (m, 7 H, H-5), 3.67 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$ Hz, H-3), 3.60 (m, 14 H, SCH₂CH₂NHCS), 3.51 (m, 28 H, CSNHCH₂CH₂NHCS), 3.44 (m, 21 H, CSNHCH₂CH₂NHBoc, H-4), 3.40 (dd, 7 H, $J_{1,2} = 2.8$, Hz, H-2), 3.17 (sa, 14H, OH), 3.09 (t, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, CH₂NHBoc), 3.06 (m, 7 H, H-6a), 2.95 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 5.8$ Hz, $J_{6a,6b} = 13.2$ Hz, H-6b), 2.78 (ta, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, CH₂S_{Cist}), 1.40 (s, 63 H, CMe₃).

¹³C RMN (100.6 MHz, DMSO, 333 K): $\delta = 183.2$ (CS), 156.1 (CO carbamato), 102.7 (C-1), 84.7 (C-4), 79.0 (CMe₃), 73.1 (C-3), 72.9 (C-2), 71.9 (C-5), 44.1 (SCH₂CH₂NHCS, CSNHCH₂CH₂NHBoc), 43.5 (CSNHCH₂CH₂NHCS), 40.5 (CH₂NHBoc), 33.9 (C-6), 32.8 (SCH₂CH₂NHCS), 28.8 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 1862.1 [$M + 2 \text{ Na}$]²⁺, 1249.0 [$M + 3 \text{ Na}$]³⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₃₃H₂₄₅N₃₅O₄₂S₂₁: C, 43.41; H, 6.71; N, 13.32; S, 18.30. Encontrado: C, 43.09; H, 6.43; N, 12.97; S, 17.94.



***N*-(1-Adamantanil)adamantano-1-carboxamida (50).** A una disolución de cloruro de 1-adamantanocarbonilo (75 mg, 0.38 mmol) en CH₂Cl₂ (3 mL) se añadió una disolución de hidrócloruro de 1-adamantanilamina (71 mg, 0.38 mmol, 1 eq.) y DIPEA (0.17 mL, 0.94 mmol, 2.5 eq.) en CH₂Cl₂ (3 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 2.5 h y, posteriormente, se eliminó el disolvente a presión reducida y se

suspendió el residuo en H₂O (10 mL). La mezcla se agitó vigorosamente durante 16 h, se filtró y el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (10 mL), se lavó con H₂SO₄ 2N (5 mL), disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (5 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. Rend.: 104 mg (87%). $R_f = 0.77$ (AcOEt-éter de petróleo 1:5).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta = 5.24$ (sa, 1 H, NH), 2.09 (sa, 3 H, β H'), 2.05 (sa, 3 H, β H), 2.00 (da, 6 H, $^3J_{H,H} = 3$ Hz, α H'), 1.83 (da, 12 H, $^3J_{H,H} = 3$ Hz, α H), 1.75 (dd, 3 H, $^1J_{H,H} = 12.5$ Hz, γ Ha), 1.70 (m, 9 H, γ Hb, γ H').

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta = 177.3$ (CO), 51.2 (Cq'), 41.7 (α C'), 40.9 (Cq), 39.4 (α C), 36.6 (γ C), 36.4 (γ C'), 29.5 (β C'), 28.3 (β C).

EM (ESI): m/z 336.2 [M + Na]⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₂₁H₃₁NO: C, 80.46; H, 9.97; N, 4.47. Encontrado: C, 80.50; H, 9.65; N, 4.39.

***N,N'*-Bis(1-adamantanocarbonil)etilendiamina (51).** A una disolución de cloruro de 1-adamantanocarbonilo (100 mg, 0.5 mmol) en CH₂Cl₂ (4 mL) se añadió una disolución de etilendiamina (15.3 μ L, 0.24 mmol, 0.95 eq.) y DIPEA (101.5 μ L, 0.57 mmol, 1.25 eq.) en CH₂Cl₂ (4 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 2.5 h y, posteriormente, se eliminó el disolvente y se suspendió el residuo en H₂O (10 mL). La mezcla se agitó vigorosamente durante 16 h, se filtró y el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (10 mL), se lavó con H₂SO₄ 2N (5 mL), disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (5 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. Rend.: 88 mg (99%).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta = 6.40$ (sa, 2 H, NH), 3.41 (d, 4 H, $^3J_{H,H} = 4.5$ Hz, CH₂N), 2.07 (sa, 6 H, β H), 1.86 (da, $^3J_{H,H} = 2.6$ Hz, 12 H, α H), 1.76 (dda, 6 H, $^1J_{H,H} = 15$ Hz, γ Ha), 1.71 (dda, 6 H, $^3J_{H,H} = 5$ Hz, γ Hb).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta = 179.5$ (CO), 40.6 (CqAd), 40.3 (CH₂N), 39.2 (α C), 36.5 (γ C), 28.1 (β C).

EM (ESI): m/z 407.3 [M + Na]⁺, 419.2 [M + Cl]⁻.

Análisis elemental. Calculado para C₂₄H₃₆N₂O₂: C, 74.96; H, 9.44; N, 7.28. Encontrado: C, 74.88; H, 9.34; N, 7.17.

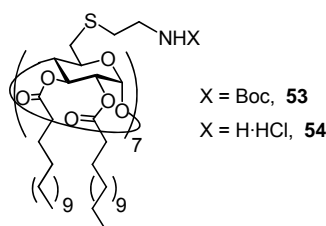
***N,N'*-Bis(1-adamantanocarbonil)-1,3-propilendiamine (52)**. A una disolución de cloruro de 1-adamantanocarbonilo (100 mg, 0.5 mmol) en CH₂Cl₂ (4 mL) se añadió una disolución de 1,3-propilendiamina (19.3 µL, 0.24 mmol, 0.95 eq.) y DIPEA (101.5 µL, 0.57 mmol, 1.25 eq.) en CH₂Cl₂ (4 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 2.5 h y, posteriormente, se eliminó el disolvente y se suspendió el residuo en H₂O (10 mL). La mezcla se agitó vigorosamente durante 16 h, se filtró y el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (10 mL), se lavó con H₂SO₄ 2N (5 mL), disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (5 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. Rend.: 88 mg (96%). *R*_f = 0.73 (AcOEt-éter de petróleo 1:5).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ = 6.32 (ta, 2 H, ³*J*_{H,H} = 5.9 Hz, NH), 3.26 (c, 4 H, ³*J*_{H,H} = 5.9 Hz, CH₂N), 2.07 (sa, 6 H, βH), 1.90 (da, 12 H, ³*J*_{H,H} = 2.5 Hz, αH), 1.75 (m, 12 H, γHa, γHb), 1.60 (t, 2 H, ³*J*_{H,H} = 5.9 Hz, CH₂CH₂N).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 298 K): δ = 178.8 (CO), 40.7 (CqAd), 39.3 (αC), 36.6 (γC), 35.1 (CH₂N), 30.1 (CH₂CH₂N), 28.2 (βC).

EM (ESI): *m/z* 399.1 [M + H]⁺, 421.3 [M + Na]⁺, 437.2 [M + K]⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₂₅H₃₈N₂O₂: C, 75.33; H, 9.61; N, 7.03. Encontrado: C, 75.21, H, 9.43; N, 6.89.



Heptaakis[6-(2-*tert*-butoxycarbonilaminoethyltio)-2,3-di-*O*-miristoil]-ciclomaltoheptaosa (53). Una mezcla de **19** (0.2 g, 89 µmol), DMAP (0.46 g, 3.73 mmol, 3 eq.) y anhídrido mirístico (2.18 g, 4.97 mmol, 4.0 eq.) se disolvió en DMF seca (15 ml) a 0 °C bajo atmósfera de Ar. La suspensión resultante se agitó a t.a. durante 48 h. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y, el residuo resultante, se dejó 1 h a

reflujo con CH_2Cl_2 -MeOH (5:95, 100 mL), se decantó y el residuo se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-éter de petróleo 1:2). Rend.: 0.32 g (67%). $R_f = 0.56$ (AcOEt-éter de petróleo 1:2). $[\alpha]_D = +49.2$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 313 K): $\delta = 5.38$ (sa, 7 H, NH), 5.26 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.9$ Hz, H-3), 5.08 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, H-1), 4.74 (dd, 7 H, H-2), 4.13 (m, 7 H, H-5), 3.76 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.7$ Hz, H-4), 3.30 (da, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.10 (d, 7 H, $J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, H-6a), 3.01 (da, 7 H, H-6b), 2.72, 2.70 (2 dt, 14 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.38-2.11 (m, 28 H, CH_2CO), 1.53 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.43 (sa, 63 H, CMe_3), 1.25 (m, 280 H, CH_2 -Mir), 0.88 (2 t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, CDCl_3 , 313 K): $\delta = 173.3$, 171.6 (2 CO éster), 155.9 (CO carbamato), 96.6 (C-1), 79.2 (CMe_3), 78.7 (C-4), 71.3 (C-5), 70.5 (C-3, C-2), 40.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 34.2 (CH_2CO), 33.9 (C-6, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 32.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 29.8-29.3 (CH_2 -Mir), 28.5 (CMe_3), 24.8, 24.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 22.6 (CH_2CH_3), 14.0 (CH_3).

EM (ESI): m/z 2619.5 $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{287}\text{H}_{5251}\text{N}_7\text{O}_{56}\text{S}_7$: C, 66.36; H, 10.19; N, 1.89. Encontrado: C, 66.01; H, 9.62; N, 1.65.

Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-aminoetiltilio)-2,3-di-O-miristoil]-ciclomaltoheptaosa (54). Los grupos carbamato del compuesto **53** (112 mg, 21.6 μmol) se hidrolizaron, siguiendo el procedimiento descrito en los métodos generales, para dar **54**. Rend.: 102 mg (99%). $[\alpha]_D = +43.3$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

^1H RMN (500 MHz, 9:1 MeOD- CDCl_3 , 323 K) $\delta = 5.36$ (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 5.12 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 4.77 (dd, 7 H, H-2), 4.12 (m, 7 H, H-5), 3.85 (t, 7 H, $J_{4,5} = 9.0$ Hz, H-4), 3.20 (m, 21 H, H-6a, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.05 (m, 7 H, H-6b), 2.99, 2.95 (2 dt, 14 H, $^2J_{\text{H,H}} = 14.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.45-2.18 (m, 28 H, CH_2CO), 1.59 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.30 (m, 280 H, CH_2 -Mir), 0.88 (t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

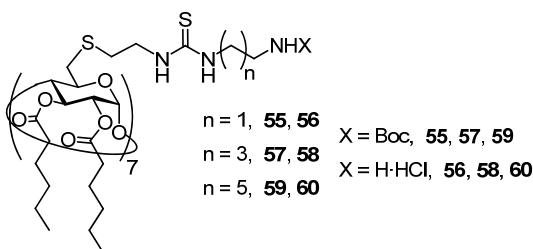
^{13}C RMN (125.7 MHz, 9:1 MeOD- CDCl_3): $\delta = 174.3$, 173.5 (2 CO), 98.2 (C-1), 80.3 (C-4), 73.6 (C-5), 71.9 (C-2), 71.4 (C-3), 40.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 35.0 (CH_2CO), 34.3 (C-6),

33.2 (CH₂CH₂CH₃), 31.7 (CH₂S_{Cist}), 31.3-30.1 (CH₂-Mir), 26.0, 25.9 (2 CH₂CH₂CO), 23.9 (CH₂CH₃), 14.8 (CH₃).

EM (ESI): m/z 4491.6 [M + H]⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₂₅₂H₄₇₆Cl₇N₇O₄₂S₇: C, 63.73; H, 10.10; N, 2.06.

Encontrado: C, 63.55; H, 9.84; N, 1.95.



Heptaakis[6-(2-(N'-(2-(N-terc-butoxicarbonilamino)etil)tioureido)etil)ti]-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (55). A una disolución de heptaakis[2,3-di-O-hexanoil-6-(2-isotiocianatoetil)ti]ciclomaltoheptaosa (**123**, 114 mg, 35 μmol) en CH₂Cl₂ (2 mL) se añadió, gota a gota, una disolución de *N-terc*-butoxicarboniletilendiamina (0.37 mmol, 59 mg, 1.5 eq.) en CH₂Cl₂ (1 mL) y la mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 20 h. Se añadió H₂O (10 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). Se separaron las fases y la fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 20:1). Rend.: 129 mg (85%). $R_f = 0.27$ (CH₂Cl₂-MeOH 20:1). $[\alpha]_D = +78.4$ (c 1.05, CH₂Cl₂).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 313 K): $\delta = 7.19, 7.00$ (2 sa, 14 H, NHCS), 5.46 (sa, 7 H, NHBoc), 5.25 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.8$ Hz, H-3), 5.08 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1), 4.76 (dd, 7 H, H-2), 4.15 (m, 7 H, H-5), 3.75 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.8$ Hz, H-4), 3.72 (m, 14 H, CH₂CH₂S_{Cist}), 3.58 (m, 14 H, CH₂NHCS), 3.29 (m, 14 H, CH₂NHBoc), 3.20 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.4$ Hz, H-6a), 3.04 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, H-6b), 2.93, 2.81 (2 dt, 14 H, $^2J_{H,H} = 13.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, CH₂S_{Cist}), 2.38-2.11 (m, 28 H, CH₂CO), 1.56 (m, 28 H,

CH_2CH_2CO), 1.42 (s, 9 H, CMe_3), 1.24 (m, 56 H, CH_3CH_2 , $CH_3CH_2CH_2$), 0.90, 0.87 (2 t, cada 21 H, $^3J_{H,H} = 7.1$ Hz, CH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$, 313 K): $\delta = 182.0$ (CS), 173.4, 171.6 (2 CO éster), 156.9 (CO carbamato), 96.7 (C-1), 79.8 (C_q), 79.0 (C-4), 71.5 (C-5), 70.5 (C-3), 70.4 (C-2), 44.6 (CH_2NH), 43.8 ($CH_2CH_2S_{Cist}$), 40.0 (CH_2NHBoc), 34.0 (CH_2CO), 33.8 (C-6), 32.9 (CH_2S_{Cist}), 31.4, 31.2 (2 $CH_3CH_2CH_2$), 28.5 (CMe_3), 24.4, 24.3 (2 CH_2CH_2CO), 22.3 (CH_3CH_2), 13.8 (CH_3).

EM (ESI): m/z 2191.2 $[M + 2 Na]^{2+}$.

Análisis elemental. Calculado para $C_{196}H_{343}N_{21}O_{56}S_{14}$: C, 54.26; H, 7.97; N, 6.78. Encontrado: C, 54.10; H, 7.84; N, 6.67.

Alternativamente, **55** se preparó a partir de heptaquis[6-(2-aminoetil)tioureido]-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (**122**) como sigue: A una disolución de **122** (80 mg, 25 μ mol) y Et_3N (26 μ L, 192 μ mol, 1.1 eq.) en CH_2Cl_2 (1.5 mL), se añadió una disolución de 2-(*terc*-butoxicarbonilamino)etilisotiocianato²⁸⁷ (**114**, 39 mg, 192 μ mol, 1.1 eq.) en CH_2Cl_2 (1.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 16 h, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 50:1 \rightarrow 20:1). Rend.: 98 mg (90%).

Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-(*N'*-(2-aminoetil)tioureido)etil)tioureido]-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (56**).** Los grupos carbamato del compuesto **55** (104 mg, 24 μ mol) se hidrolizaron mediante el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose **56**. Rend.: 90 mg (96%). $[\alpha]_D = +80.7$ (c 1.0, DMSO).

1H RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$, 333 K): $\delta = 8.08$ (sa, 14 H, NH_2), 7.92, 7.72 (2 sa, 14 H, NHCS), 5.21 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.8$ Hz, H-3), 5.05 (d, 7 H, $J_{1,2} = 2.9$ Hz, H-1), 4.67 (dd, 7 H, H-2), 4.12 (m, 7 H, H-5), 3.85 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.8$ Hz, H-4), 3.68 (m, 14 H, CH_2NHCS), 3.59 (m, 14 H, $CH_2CH_2S_{Cist}$), 3.10 (d, 14 H, H-6a, H-6b), 2.98 (t, 14 H, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, CH_2NH_2), 2.79, 2.77 (2 dt, 14 H, $^2J_{H,H} = 13.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH_2S_{Cist}),

2.35-2.11 (m, 28 H, CH₂CO), 1.50 (m, 28 H, CH₂CH₂CO), 1.24 (m, 56 H, CH₃CH₂, CH₃CH₂CH₂), 0.84, 0.83 (2 t, 42 H, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, CH₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, DMSO-*d*₆, 333 K): δ = 183.4 (CS), 172.9, 171.9 (2 CO), 96.7 (C-1), 78.5 (C-4), 71.5 (C-5), 70.7 (C-3, C-2), 44.2 (CH₂CH₂S_{Cist}), 41.7 (CH₂NHCS), 39.0 (CH₂NH₂), 34.0 (CH₂CO), 33.7 (C-6), 32.9 (CH₂S_{Cist}), 31.3, 31.1 (2 CH₃CH₂CH₂), 24.3, 24.2 (2 CH₂CH₂CO), 22.2 (CH₃CH₂), 14.0 (CH₃).

EM (ESI): *m/z* 1213.3 [M + 3 H]³⁺, 1819.4 [M + 2 H]²⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₆₁H₂₉₄Cl₇N₂₁O₄₂S₁₄: C, 49.67; H, 7.61; N, 7.56. Encontrado: C, 49.27; H, 7.30; N, 7.32.

Heptaquis[6-(2-(*N'*-(4-*N*-*terc*-butoxicarbonilaminobutil)tioureido)etil)tió]-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (57). Una disolución de heptaquis[2,3-di-*O*-hexanoil-6-(2-isotiocianatoetil)tió]ciclomaltoheptaosa (**123**, 110 mg, 35 μmol) en CH₂Cl₂ (2 mL) se añadió, gota a gota, a una disolución de *N*-*terc*-butoxicarbonilbutilendiamina (75 μL, 0.37 mmol, 1.5 eq.) en CH₂Cl₂ (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 16 h, se añadió H₂O (10 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se filtró. Se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 20:1→15:1). Rend.: 114 mg (72%). *R*_f = 0.37 (CH₂Cl₂-MeOH 9:1). [α]_D = + 65.8 (*c* 1.0, CH₂Cl₂).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 313 K): δ = 6.89 (sa, 14 H, NHCS), 5.25 (t, 7 H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 9.2 Hz, H-3), 5.08 (d, 7 H, *J*_{1,2} = 3.7 Hz, H-1), 4.95 (sa, 7 H, *NHBoc*), 4.75 (dd, 7 H, H-2), 4.14 (m, 7 H, H-5), 3.75 (t, 7 H, *J*_{4,5} = 9.2 Hz, H-4), 3.76 (m, 14 H, CH₂CH₂S_{Cist}), 3.46 (m, 14 H, CH₂NHCS), 3.19 (da, 7 H, *J*_{6a,6b} = 12.2 Hz, H-6a), 3.10 (m, 14 H, CH₂NHBoc), 3.03 (dd, 7 H, *J*_{5,6b} = 5.6 Hz, H-6b), 2.92, 2.80 (2 dt, 14 H, ²*J*_{H,H} = 13.3 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.5 Hz, CH₂S_{cist}), 2.38-2.11 (m, 28 H, CH₂CO), 1.60-1.49 (m, 56 H, CH₂CH₂CO, CH₂CH₂NHCS, CH₂CH₂NHBoc), 1.41 (s, 9 H, CMe₃), 1.31-1.24 (m, 56 H, CH₃CH₂, CH₃CH₂CH₂), 0.89, 0.87 (2 t, 42 H, ³*J*_{H,H} = 7.1 Hz, CH₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 313 K): δ = 182.0 (CS), 173.4, 171.6 (2 CO éster), 156.4 (CO carbamato), 96.6 (C-1), 79.3 (CMe₃), 78.9 (C-4), 71.5 (C-5), 70.4 (C-2, C-3), 44.2

(CH₂NHCS), 43.8 (CH₂CH₂S_{Cist}), 40.3 (CH₂NHBoc), 34.1 (CH₂CO), 33.8 (C-6), 33.1 (CH₂S_{Cist}), 31.4, 31.2 (2 CH₃CH₂CH₂), 28.5 (CMe₃), 27.6 (CH₂CH₂NHBoc), 26.4 (CH₂CH₂NHCS), 24.4, 24.3 (2 CH₂CH₂CO), 22.3 (CH₃CH₂), 13.8 (CH₃).

EM (ESI): m/z 1533.9 [M + 3 Na]³⁺, 2288.9 [M + 2 Na]²⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₂₁₀H₃₇₁N₂₁O₅₆S₁₄: C, 55.61; H, 8.25; N, 6.49. Encontrado: C, 55.36; H, 8.30; N, 6.26.

Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-(N'-(4-aminobutil)tioureido)etil)tió]-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (58). Los grupos carbamato del compuesto **57** (58 mg, 13 μmol) se hidrolizaron mediante el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose **58**. Rend.: 52.8 mg (99%). [α]_D = + 65.8 (c 1.0, CH₂Cl₂).

¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆, 333 K): δ = 7.89 (sa, 14 H, NH₂), 7.68, 7.54 (2 sa, 14 H, NHCS), 5.21 (t, 7 H, J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2 Hz, H-3), 5.04 (d, 7 H, J_{1,2} = 3.1 Hz, H-1), 4.67 (dd, 7 H, H-2), 4.11 (m, 7 H, H-5), 3.85 (t, 7 H, J_{4,5} = 9.2 Hz, H-4), 3.58 (m, 14 H, CH₂CH₂S_{Cist}), 3.37 (m, 14 H, CH₂NHCS), 3.10 (m, 14 H, H-6a, H-6b), 2.76 (m, 28 H, CH₂NH₂, CH₂S), 2.34-2.11 (m, 28 H, CH₂CO), 1.58-1.48 (m, 56 H, CH₂CH₂CO, CH₂CH₂NHCS, CH₂CH₂NH₂), 1.25-1.22 (m, 56 H, CH₃CH₂, CH₃CH₂CH₂), 0.84, 0.83 (2 t, 42 H, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, CH₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, DMSO-d₆, 313 K): δ = 183.1 (CS), 172.9, 171.9 (2 CO), 96.7 (C-1), 78.5 (C-4), 71.6 (C-5), 70.7 (C-2, C-3), 44.1 (CH₂CH₂S_{Cist}), 43.5 (CH₂NHCS), 39.2 (CH₂NH₂), 33.9 (CH₂CO), 33.7 (C-6), 33.1 (CH₂S_{cist}), 31.3, 31.1 (2 CH₂CH₃CH₂), 26.3, 25.0 (CH₂CH₂NHCS, CH₂CH₂NH₂), 24.3, 24.2 (2 CH₂CH₂CO), 22.2 (CH₃CH₂), 14.0 (CH₃).

EM (ESI): m/z 1278.5 [M + 3 H]³⁺, 1917.3 [M + 2 H]²⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₇₅H₃₂₂Cl₇N₂₁O₄₂S₁₄: C, 51.40; H, 7.94; N, 7.19. Encontrado: C, 51.31; H, 7.75; N, 6.96.

Heptaquis[6-(2-(*N'*-(6-*N-terc*-butoxicarbonilhexil)tioureido)etiltio)-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (59). A una disolución de heptaquis[2,3-di-*O*-hexanoil-6-(2-isotiocianatoetiltio)]ciclomaltoheptaosa (**123**, 110 mg, 35 μ mol) en CH_2Cl_2 (2 mL) se añadió, gota a gota, una disolución de *N-terc*-butoxicarbonilhexilendiamina (82 μ L, 0.37 mmol, 1.5 eq.) en CH_2Cl_2 (1 mL) y la mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 20 h. Se añadió H_2O (10 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). Se separaron las fases y la fase orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1 \rightarrow 15:1). Rend.: 107 mg (65%). $R_f = 0.38$ (CH_2Cl_2 -MeOH 9:1). $[\alpha]_D = +65.6$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 313 K): $\delta = 6.89, 6.82$ (2 sa, 14 H, NHCS), 5.26 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$ Hz, H-3), 5.09 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1), 4.76 (m, 7 H, NHBoc), 4.75 (dd, 7 H, H-2), 4.15 (m, 7 H, H-5), 3.76 (t, 7 H, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, H-4), 3.72 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.43 (m, 14 H, CH_2NHCS), 3.18 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 12.1$ Hz, H-6a), 3.06 (m, 21 H, CH_2NHBoc , H-6b), 2.92, 2.79 (2 dt, 14 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.38-2.11 (m, 28 H, CH_2CO), 1.56 (m, 42 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 1.45 (m, 14H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 1.41 (s, 9 H, CMe_3), 1.31-1.24 (m, 84 H, CH_3CH_2 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_{2\text{-Hex}}$), 0.89, 0.87 (2 t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, CH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, CDCl_3 , 313 K): $\delta = 182.0$ (CS), 173.5, 171.6 (2 CO éster), 156.2 (CO carbamato), 96.6 (C-1), 79.1 (CMe_3), 78.8 (C-4), 71.4 (C-5), 70.4 (C-2, C-3), 44.5 (CH_2NHCS), 43.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 40.5 (CH_2NHBoc), 34.1 (CH_2CO), 33.8 (C-6), 33.1 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 31.4, 31.3 (2 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 30.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 29.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 28.5 (CMe_3), 26.5, 26.4 ($\text{CH}_{2\text{-Hex}}$), 24.4, 24.3 (2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 22.3 (CH_3CH_2), 13.8 (CH_3). EM (ESI): m/z 2388.4 $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{224}\text{H}_{399}\text{N}_{21}\text{O}_{56}\text{S}_{14}$: C, 56.86; H, 8.50; N, 6.22. Encontrado: C, 56.61; H, 8.30; N, 6.10.

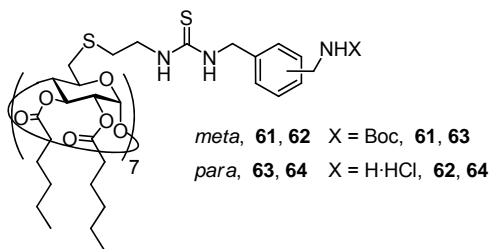
Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-(*N'*-(6-aminohexil)tioureido)etiltio)-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (60). Los grupos carbamato del compuesto **59** (33.4 mg, 7 μ mol) se hidrolizaron mediante el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose **60**. Rend: 30 mg (99%). $[\alpha]_D = +65.6$ (*c* 1.0, CH₂Cl₂).

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆, 333 K): $\delta = 7.79$ (sa, 14 H, NH₂), 7.54, 7.43 (2 sa, 14 H, NHCS), 5.22 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$ Hz, H-3), 5.04 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.0$ Hz, H-1), 4.67 (dd, 7 H, H-2), 4.11 (m, 7 H, H-5), 3.85 (t, 7 H, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, H-4), 3.58 (m, 14 H, CH₂CH₂S_{Cist}), 3.34 (m, 14 H, CH₂NHCS), 3.08 (m, 14 H, H-6a, H-6b), 2.75 (m, 28 H, CH₂NH₂, CH₂S_{Cist}), 2.34-2.11 (m, 28 H, CH₂CO), 1.55-1.45 (m, 56 H, CH₂CH₂CO, CH₂CH₂NHCS, CH₂CH₂NH₂), 1.29-1.22 (m, 84 H, CH₃CH₂, CH₃CH₂CH₂, CH₂-Hex), 0.84, 0.83 (2 t, 42 H, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, CH₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, DMSO-*d*₆, 333 K): $\delta = 182.9$ (CS), 172.9, 171.9 (2 CO), 96.7 (C-1), 78.4 (C-4), 71.6 (C-5), 70.6 (C-2, C-3), 44.1 (CH₂NHCS, CH₂CH₂S_{Cist}), 39.4 (CH₂NH₂), 33.9 (CH₂CO), 33.7 (C-6), 33.2 (CH₂S_{Cist}), 31.3, 31.1 (2 CH₂CH₃CH₂), 29.1 (CH₂CH₂NH), 27.4 (CH₂CH₂NH₂), 26.4, 26.1 (2 CH₂-Hex), 24.3, 24.2 (2 CH₂CH₂CO), 22.2 (CH₃CH₂), 14.0 (CH₃).

EM (ESI): *m/z* 1343.8 [M + 3 H]³⁺, 2015.3 [M + 2 H]²⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₈₉H₃₅₀Cl₇N₂₁O₄₂S₁₄: C, 52.96; H, 8.23; N, 6.86. Encontrado: C, 53.02; H, 8.18; N, 6.63.



Heptaakis[6-(2-(*N*²-(3-(*tert*-butoxycarbonylamino)metil)-bencil)tiureido)-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (61): A una disolución de hidrocloreuro de heptaakis[6-(2-aminoetiltilio)-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (**122**, 66 mg, 20.7 μ mol) y Et₃N (22 μ L, 160 μ mol, 1.1 eq.) en CH₂Cl₂ (1.5 mL) se añadió una disolución de 3-(*tert*-butoxycarbonylamino)metil)bencilisotiocianato³⁵³ (**118**, 44.3 mg, 160 μ mol, 1.1 eq.) en CH₂Cl₂ (1.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 16 h, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 50:1 \rightarrow 20:1). Rend: 90 mg (88%). $R_f = 0.48$ (CH₂Cl₂-MeOH 20:1). $[\alpha]_D = +63.2$ (c 1.1, CH₂Cl₂).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 313 K): $\delta = 7.18$ (t, 7 H, ³ $J_{H,H} = 9.4$ Hz, H-5_{Ph}), 7.10 (d, 7 H, ³ $J_{H,H} = 9.4$ Hz, H-6_{Ph}), 7.05 (d, 7 H, ³ $J_{H,H} = 9.4$ Hz, H-4_{Ph}), 7.01 (s, 7 H, H-2_{Ph}), 6.95 (sa, 14 H, NHCS), 5.24 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 5.18 (sa, 7 H, *NHBoc*), 5.09 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, H-1), 4.75 (dd, 7 H, H-2), 4.45 (sa, 14 H, PhCH₂NHCS), 4.14 (m, 21 H, H-5, PhCH₂NHBoc), 3.75 (t, 7 H, $J_{4,5} = 9.0$ Hz, H-4), 3.70 (sa, 14 H, CH₂CH₂S_{Cist}), 3.21 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.1$ Hz, H-6a), 3.04 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 5.5$ Hz, H-6b), 2.82 (m, 14 H, CH₂S_{Cist}), 2.40-2.10 (m, 28 H, CH₂CO), 1.60 (m, 28 H, CH₂CH₂CO), 1.40 (s, 63 H, CMe₃), 1.28 (m, 56 H, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃), 0.89-0.88 (m, 42 H, ³ $J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 313 K): $\delta = 182.5$ (CS), 173.7, 171.9 (2 CO éster), 156.7 (CO carbamato), 139.8, 138.3, 129.1, 126.8, 126.4, 126.0 (6 Ph), 96.9 (C-1), 80.0 (CMe₃), 79.2 (C-4), 71.8 (C-5), 70.7 (C-3, C-2), 48.4 (PhCH₂NCS), 44.8 (PhCH₂NHBoc), 44.2 (CH₂CH₂S_{Cist}), 34.3 (CH₂CO), 34.1 (C-6), 33.2 (CH₂S_{Cist}), 31.7, 31.5 (CH₂CH₂CH₃), 28.7 (CMe₃), 24.7, 24.6 (CH₂CH₂CO), 22.6 (CH₂CH₃), 14.1 (CH₃).

EM (ESI): m/z 2455.3 $[M + K + H]^{2+}$, 1649.9 $[M + K + 2 Na]^{2+}$;

Análisis elemental. Calculado para $C_{238}H_{371}N_{21}O_{56}S_{14}$: C, 58.68; H, 7.68; N, 6.04. Encontrado: C, 58.62; H, 7.66; N, 5.85.

Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-(*N'*-(3-aminometilbencil)tioureido)etil)tioureido)-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (62). Los grupos carbamato del compuesto **61** (30 mg, 6.2 μ mol) se hidrolizaron mediante el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose **62**. Rend.: 27 mg (99%). $[\alpha]_D = + 47.8$ (c 1.0, MeOH).

1H RMN (500 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 7.40$ (m, 28 H, Ph), 5.36 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.7$ Hz, H-3), 5.19 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.0$ Hz, H-1), 4.85 (dd, 7 H, H-2), 4.77 (sa, 14 H, PhCH₂NHCS), 4.18 (m, 21 H, H-5, PhCH₂NH₂), 3.95 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.7$ Hz, H-4), 3.79 (sa, 14 H, CH₂CH₂S_{Cist}), 3.31 (da, 7 H, H-6a), 3.20 (da, 7 H, $J_{6b,6b} = 13.0$ Hz, H-6b), 2.94 (m, 14 H, CH₂C_{ist}), 2.5-2.2 (m, 28 H, CH₂CO), 1.66 (m, 28 H, CH₂CH₂CO), 1.35 (m, 56 H, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃), 0.96-0.94 (2 t, 42 H, $^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH₃).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 182.4$ (CS), 173.4, 172.1 (2 CO), 140.0, 133.1, 129.1, 128.0, 127.7, 127.3 (6 Ph), 96.9 (C-1), 78.7 (C-4), 71.9 (C-5), 70.6 (C-3), 70.3 (C-2), 48.4 (PhCH₂NCS), 44.1 (CH₂CH₂S_{Cist}), 43.1 (PhCH₂NH₂), 33.8 (CH₂CO), 33.7 (C-6), 32.8 (CH₂S_{Cist}), 31.2, 31.1 (CH₂CH₂CH₃), 24.2 (CH₂CH₂CO), 24.2 (CH₂CH₃), 12.9 (CH₃).

EM (ESI): m/z 2085.2 $[M + 2 H]^{2+}$, 1390.4 $[M + 3 H]^{3+}$, 1043.0 $[M + 4 H]^{4+}$, 883.6 $[M + 5 H]^{5+}$.

Análisis elemental. Calculado para $C_{203}H_{329}N_{21}O_{42}S_{14}Cl_{14}$: C, 55.09; H, 7.33; N, 6.65. Encontrado: C, 54.88; H, 7.29; N, 6.24.

Heptaquis[6-(2-(*N'*-(4-(*terc*-butoxicarbonilaminometil)bencil)tioureido)etil)tioureido)-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (63). A una disolución de heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-aminoetil)tioureido)-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (**122**, 66 mg, 20.7 μ mol) y Et₃N (22 μ L, 160 μ mol, 1.1 eq.) en CH₂Cl₂ (1.5 mL) se añadió

una disolución de 4-(*terc*-butoxicarbonilaminometil)bencilisotiocianato³⁵³ (**119**, 44.3 mg, 160 μmol , 1.1 eq.) en CH_2Cl_2 (1.5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 16 h, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 50:1 \rightarrow 20:1). Rend: 85 mg (84%). $R_f = 0.48$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_D = +66.9$ (c 1.1, CH_2Cl_2).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 313 K): $\delta = 7.10$ (m, 28 H, Ph), 6.95, 6.83 (2 sa, 14 H, NHCS), 5.25 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1$ Hz, H-3), 5.16 (sa, 7 H, NHBoc), 5.09 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1), 4.74 (dd, 7 H, H-2), 4.48 (sa, 14 H, PhCH_2NHCS), 4.15 (m, 21 H, H-5, CH_2NHBoc), 3.73 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.7$ Hz, H-4), 3.64 (sa, 14 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.20 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.2$ Hz, H-6a), 3.01 (dd, 7 H, $J_{6b,5} = 5.5$ Hz, H-6b), 2.80 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.40-2.10 (m, 28 H, CH_2CO), 1.60 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.40 (s, 63 H, CMe_3), 1.28 (m, 56 H, CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.89, 0.88 (2 t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH_3).

^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3 , 313 K): $\delta = 182.5$ (CS), 173.9, 172.0 (2 CO éster), 156.7 (CO carbamato), 138.8, 128.3, 127.9, 127.5 (4 Ph), 97.0 (C-1), 80.0 (CMe_3), 79.4 (C-4), 72.0 (C-5), 70.8 (C-3, C-2), 48.4 (PhCH_2NCS), 44.8 ($\text{PhCH}_2\text{NHBoc}$), 44.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 34.5 (CH_2CO), 34.2 (C-6), 33.4 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 31.8, 31.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28.8 (CMe_3), 24.8, 24.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 22.7 (CH_2CH_3), 14.2 (CH_3).

EM (ESI): m/z 2454.8 [$\text{M} + \text{K} + \text{H}$]²⁺, 1643.5 [$\text{M} + \text{K} + \text{Na} + \text{H}$]²⁺.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{238}\text{H}_{371}\text{N}_{21}\text{O}_{56}\text{S}_{14}$: C, 58.68; H, 7.68; N, 6.04. Encontrado: C, 58.76; H, 7.60; N, 5.88.

Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-(*N'*-(4-aminometilbencil)tioureido)-etilio)-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (64). Los grupos carbamato del compuesto **63** (30 mg, 6.2 μmol) se hidrolizaron mediante el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose **64**. Rend.: 27 mg (99%). $[\alpha]_D = +54.9$ (c 1.0, MeOH).

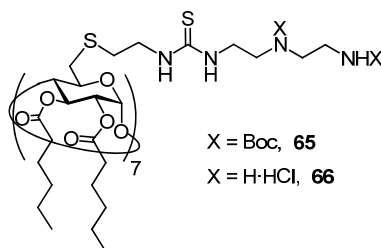
^1H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 7.35$ (m 28 H, Ph), 5.32 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.8$ Hz, H-3), 5.15 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1), 4.80 (dd, 7 H, H-2), 4.67 (sa, 14 H, PhCH_2NHCS), 4.17 (m, 21 H, H-5), 4.06 (s, 14 H, PhCH_2NH_2), 3.90 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.8$

Hz, H-4), 3.72 (sa, 14 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.27 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 14.2$ Hz, H-6a), 3.16 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 5.2$ Hz, H-6b), 2.90 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.5-2.2 (m, 28 H, CH_2CO), 1.60 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.30 (m, 56 H, CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.90, 0.89 (2 t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, CH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 184.0$ (CS), 174.8, 173.5 (2 CO), 141.3, 130.1, 129.3, 129.0 (4 Ph), 98.2 (C-1), 80.0 (C-4), 73.2 (C-5), 71.9 (C-3), 71.7 (C-2), 49.4 (PhCH_2NCS), 45.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 44.1 (PhCH_2NH_2), 35.2 (CH_2CO), 35.1 (C-6), 34.1 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 32.6, 32.4 (2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 25.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 23.5 (CH_2CH_3), 14.2 (CH_3).

EM (ESI): m/z 2085.2 $[\text{M} + 2 \text{H}]^{2+}$, 1390.4 $[\text{M} + 3 \text{H}]^{3+}$, 1043.0 $[\text{M} + 4 \text{H}]^{4+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{203}\text{H}_{329}\text{N}_{21}\text{O}_{42}\text{S}_{14}\text{Cl}_{14}$: C, 55.09; H, 7.33; N, 6.65. Encontrado: C, 54.89; H, 7.40; N, 6.51.



Heptaquis[6-(2-(N'-[2-(2-(N-terc-butoxicarbonilamino)etil)-(N-terc-butoxicarbonilamino)etil]tioureido)etil)-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (65). A una disolución de heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-aminoetil)-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (**122**, 98 mg, 31 μmol) y Et_3N (33 μL , 0.24 mmol, 1.1 eq.) en CH_2Cl_2 (2 mL), se añadió una disolución de **32** (89 mg, 0.26 mmol, 1.2 eq.) en CH_2Cl_2 (2 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 16 h. El disolvente se eliminó bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 50:1 \rightarrow 20:1). Rend.: 149 mg (90%). $R_f = 0.48$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_{\text{D}} = +62.8$ (c 0.8, CH_2Cl_2).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 313 K): δ = 7.42 - 6.90 (m, 14 H, NHCS), 5.27 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.9$ Hz, H-3), 5.08 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1), 5.06 (sa, 7 H, NHBoc), 4.75 (dd, 7 H, H-2), 4.15 (m, 7 H, H-5), 3.80 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.9$ Hz, H-4), 3.70 (sa, 14 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.62 (sa, 14 H, BocNCH₂CH₂NHCS), 3.39 (m, 14H, CSNHCH₂CH₂NBoc), 3.32 (m, 14H, BocNHCH₂CH₂NBoc), 3.23 (ca, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, CH₂NHBoc), 3.17 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 10.9$ Hz, H-6a), 3.08 (da, 7 H, H-6b), 2.85 (m, 14 H, CH₂S_{Cist}), 2.4-2.1 (m, 28 H, CH₂CO), 1.60 (m, 28 H, CH₂CH₂CO), 1.45 (s, 63 H, CMe₃), 1.41 (s, 63 H, CMe₃), 1.32 (m, 56 H, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃), 0.91, 0.89 (2 t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, CH₃).

^{13}C RMN (125.7 MHz, CDCl_3 , 313 K): δ = 179.8 (CS), 173.6, 171.8 (2 CO éster), 156.4 (CO carbamato), 96.8 (C-1), 80.8 (CMe₃), 78.8 (C-4), 71.6 (C-5), 70.7 (C-3, C-2), 58.1 (BocNCH₂CH₂NHBoc), 57.5 (BocNCH₂CH₂NHCS), 44.0 (CH₂CH₂S_{Cist}), 43.5 (BocNCH₂CH₂NHCS), 40.1 (CH₂NHBoc), 34.3, 34.0 (CH₂CO, C-6), 33.0 (CH₂S_{Cist}), 31.6, 31.5 (2 CH₂CH₂CH₃), 28.7 (CMe₃), 24.6 (CH₂CH₂CO), 22.5 (CH₂CH₃), 14.0 (CH₃).
EM (ESI): m/z 2691.9 $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$, 1808.3 $[\text{M} + 2 \text{Na} + \text{K}]^{3+}$.

Análisis elemental. Calculado para C₂₄₅H₄₃₄N₂₈O₇₀S₁₄: C, 55.09; H, 8.19; N, 7.34. Encontrado: C, 54.79; H, 8.09; N, 7.23.

Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-[N²-(2-(2-aminoetil)aminoetil)-tioureido]etil)-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (66). Los grupos carbamato del compuesto **65** (45.5 mg, 8.55 μmol) se hidrolizaron mediante el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose **66**. Rend.: 38 mg (99%). $R_f = 0.05$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 6:3:1). $[\alpha]_{\text{D}} = +29.4$ (c 1.0, MeOH).

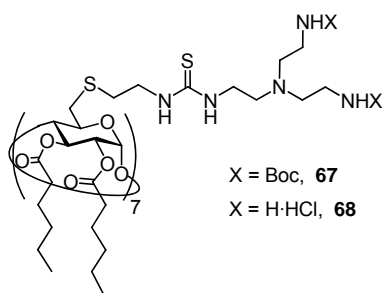
^1H RMN (500 MHz, MeOD-D₂O 5:1, 313 K): δ = 5.30 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.7$ Hz, H-3), 5.14 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.54$ Hz, H-1), 4.80 (dd, 7 H, H-2), 4.15 (m, 7 H, H-5), 3.97 (sa, 14 H, HNCH₂CH₂NHCS), 3.89 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.7$ Hz, H-4), 3.75 (sa, 14 H, CH₂CH₂S_{Cist}), 3.50 (t, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, CH₂NH₂), 3.46 (t, 14 H, NH₂CH₂CH₂NH), 3.41 (t, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, CSNHCH₂CH₂NH), 3.25 (da, 7 H, H-6a), 3.14 (m, 7 H, H-6b), 2.91 (m, 14 H,

$\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$, 2.50-2.15 (m, 28 H, CH_2CO), 1.60 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.30 (m, 56 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, CH_2CH_3), 0.91, 0.88 (2 t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 184.3$ (CS), 173.6, 172.2 (2 CO éster), 96.8 (C-1), 78.8 (C-4), 71.9 (C-5), 70.6 (C-3), 70.3 (C-2), 57.5 ($\text{HNCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 44.7 (CH_2NH_2), 44.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 40.2 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 35.7 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 33.9 (C-6), 33.8 (CH_2CO), 32.6 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 31.2, 31.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 22.1, 22.0 (2 CH_2CH_3), 13.1, 12.9 (2 CH_3).

EM (ESI): m/z 1968.9 [$\text{M} + 2 \text{H}$] $^{2+}$, 1313.4 [$\text{M} + 3 \text{H}$] $^{3+}$, 985.6 [$\text{M} + 4 \text{H}$] $^{4+}$, 788.7 [$\text{M} + 5 \text{H}$] $^{5+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{175}\text{H}_{336}\text{N}_{28}\text{O}_{42}\text{S}_{14}\text{Cl}_{14}$: C, 47.23; H, 7.61; N, 8.81. Encontrado: C, 47.13; H, 7.66; N, 8.29.



Heptaquis[6-(2-(N'-2-(N,N-di-(2-(N-terc-butoxicarbonilamino)etil)amino)etil)tioureido)etiltio)-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (67). A una disolución de heptahidrocloruro de **122** (60 mg, 18.8 μmol) y Et_3N (37 μL , 265 μmol , 2.0 eq.) en CH_2Cl_2 (1.5 mL) se añadió una disolución de **30** (61 mg, 158 μmol , 1.2 eq.) en CH_2Cl_2 (1.5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 16 h, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 50:1 \rightarrow 20:1). Rend.: 90 mg (85%). $R_f = 0.46$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_{\text{D}} = +57.4$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , 313 K): $\delta = 7.22$, 7.16 (2 sa, 14 H, NHCS), 5.29 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$ Hz, H-3), 5.24 (sa, 14 H, NHBoc), 5.08 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 4.77 (dd, 7 H, H-2), 4.17 (m, 7 H, H-5), 3.83 (t, 7 H, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, H-4), 3.77 (m, 14 H,

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.54 (m, 14 H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 3.15 (m, 42 H, H-6a, H-6b, CH_2NHBoc), 2.87 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.67 (ta, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 2.58 (ta, 28 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 2.43-2.11 (m, 28 H, CH_2CO), 1.60 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.44 (s, 126 H, CMe_3), 1.30 (m, 56 H, CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.91, 0.89 (2 t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, CH_3).

^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3 , 313 K): $\delta = 182.8$ (CS), 173.8, 172.0 (2 CO éster), 156.9 (CO carbamato), 97.0 (C-1), 79.8 (CMe_3), 79.0 (C-4), 71.8 (C-5), 70.9 (C-3, C-2), 55.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 54.0 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 44.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 42.9 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 39.5 (CH_2NHBoc), 34.4, 34.2 (CH_2CO , C-6), 33.6 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 31.8, 31.7 (2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28.9 (CMe_3), 24.8, 24.7 (2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 22.7 (CH_2CH_3), 14.2 (CH_3).

EM (ESI): m/z 2820.3 [$\text{M} + 2 \text{H}$] $^{2+}$, 1880.7 [$\text{M} + 3 \text{H}$] $^{3+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{259}\text{H}_{469}\text{N}_{35}\text{O}_{70}\text{S}_{14}$: C, 55.13; H, 8.38; N, 8.69. Encontrado: C, 54.76; H, 8.21; N, 8.50.

Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-(N'-(2-(N,N-bis(2-aminoetil)amino)etil)tioureido)etil)ti]ciclomaltoheptaosa (68). Los grupos carbamato del compuesto **67** (30 mg, 5.3 μmol) se hidrolizaron mediante el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose **68**. Rend.: 25 mg (99%). $[\alpha]_{\text{D}} = +48.2$ (c 0.67, MeOH).

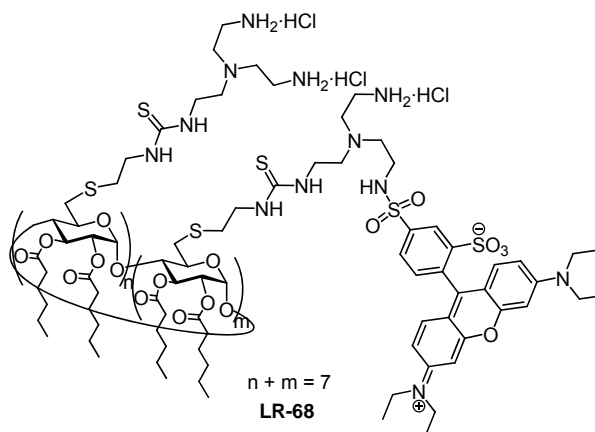
^1H RMN (500 MHz, MeOD- D_2O 5:1, 333 K): $\delta = 5.27$ (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.6$ Hz, H-3), 5.13 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1), 4.82 (dd, 7 H, H-2), 4.14 (m, 7 H, H-5), 3.89 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.6$ Hz, H-4), 3.73 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 3.25 (t, 28 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, CH_2NH_2), 3.14 (m, 14 H, H-6a, H-6b), 3.14 (t, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.97 (t, 28 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 2.90 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.50-2.15 (m, 28 H, CH_2CO), 1.60 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.30 (m, 56 H, CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.91, 0.89 (2 t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, CH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD- D_2O 5:1, 333 K): $\delta = 183.5$ (CS), 175.0, 173.4 (2 CO éster), 98.1 (C-1), 80.1 (C-4), 73.1 (C-5), 71.9 (C-3), 71.5 (C-2), 53.5 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 52.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 45.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 42.1 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 38.1 (CH_2NH_2), 35.2

(C-6), 35.0 (CH₂CO), 33.9 (CH₂S_{Cist}), 32.3, 32.2 (2 CH₂CH₂CH₃), 25.4, 25.3 (2 CH₂CH₂CO), 23.2, 23.1 (2 CH₂CH₃), 14.2 (CH₃).

EM (ESI): m/z 2119.6 [M + 2 H]²⁺, 1413.8 [M + 3 H]³⁺, 1060.3 [M + 4 H]⁴⁺, 848.7 [M + 5 H]⁵⁺, 707.3 [M + 6 H]⁶⁺, 606.3 [M + 7 H]⁷⁺.

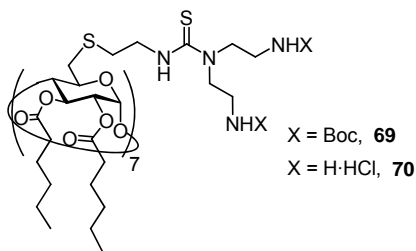
Análisis elemental. Calculado para C₁₈₉H₃₇₁N₃₅O₄₂S₁₄Cl₁₄: C, 47.78; H, 7.87; N, 10.32. Encontrado: C, 47.45; H, 7.34; N, 10.35.



Conjugado fluorescente LR-68. La síntesis de **LR-68** se llevó a cabo de forma estadística, añadiendo cloruro de lisamina-rodamina sulfonilo (CLRS, 10 mg, 17 μ mol) a una disolución de **68** (83 mg, 17 μ mol) y Et₃N (50 μ L, 0.35 mmol, 1.5 eq.) en CH₂Cl₂ recién destilado (10 mL) bajo atmósfera de N₂. La reacción se agitó a t.a. durante 2 días en oscuridad. Se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se purificó por cromatografía de exclusión sobre gel (Sephadex LH-20, MeOH). El compuesto marcado **LR-68** se obtuvo en forma de escamas de color rojo oscuro tras liofilizarlo en ácido clorhídrico diluido (75 mg, 82%).

¹H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): δ = 8.75, 8.24, 7.62 y 7.26-6.97 (señales de rodamina).

EM (ESI): m/z 1196.5 [M-LR + 4 H]⁴⁺, 1061.5 [M + 4 H]⁴⁺, 957.3 [M-LR + 5 H]⁵⁺, 848.8 [M + 5 H]⁵⁺.



Heptaquis[6-(2-(*N',N'*-bis(2-(*N*-*terc*-butoxicarbonilamino)etil)tioureido)-etil)tioureido]-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (69**).** A una disolución de bis(2-(*terc*-butoxicarbonilamino)etil)amina²⁵ (**97**, 36 mg, 120 μmol , 1.1 eq.) y Et_3N (17 μL , 122 μmol , 1.1 eq.) en CH_2Cl_2 (2.5 mL) se añadió una disolución de heptaquis[2,3-di-*O*-hexanoil-6-(2-isotiocianatoetil)tioureido]ciclomaltoheptaosa (**123**, 50 mg, 15.5 μmol) en CH_2Cl_2 (2.5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 16 h, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 50:1 \rightarrow 20:1). Rend.: 83 mg (99%). $R_f = 0.41$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_D = +57.0$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

^1H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 5.30$ (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.6$ Hz, H-3), 5.13 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, H-1), 4.79 (dd, 7 H, H-2), 4.17 (m, 7 H, H-5), 3.93 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.6$ Hz, H-4), 3.86 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.74 (m, 28 H, CH_2NCS), 3.20 (m, 42 H, H-6a, H-6b, CH_2NHBoc), 2.98 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.40-2.10 (m, 28 H, CH_2CO), 1.60 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.44 (s, 126 H, CMe_3), 1.30 (m, 56 H, CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.91, 0.89 (2 t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, CH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 181.6$ (CS), 173.6, 172.5 (2 CO éster), 157.6 (CO carbamato), 97.2 (C-1), 80.3 (CMe_3), 79.0 (C-4), 72.1 (C-5), 71.0 (C-3, C-2), 50.9 (CH_2NCS), 45.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 38.4 (CH_2NHBoc), 34.2 (CH_2CO), 34.0, (C-6), 32.8 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 31.7, 31.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28.9 (CMe_3), 24.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 22.6 (CH_2CH_3), 13.5 (CH_3).

EM (ESI): m/z 2701.3 $[\text{M} + \text{Na} + \text{K}]^{2+}$, 1813.9 $[\text{M} + \text{Na} + 2 \text{K}]^{3+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{245}\text{H}_{434}\text{N}_{28}\text{O}_{70}\text{S}_{14}$: C, 55.09; H, 8.19; N, 7.34. Encontrado: C, 54.83; H, 8.08; N, 7.26.

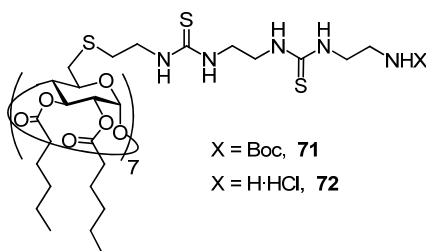
Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-(*N,N'*-bis-(2-aminoetil)tioureido)-etil)tiio]-6-desoxi-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (70). Los grupos carbamato del compuesto **69** (30 mg, 5.6 μ mol) se hidrolizaron siguiendo el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose **70**. Rend.: 25 mg (99%). $[\alpha]_D = + 19.5$ (*c* 0.85, MeOH).

^1H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 5.32$ (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.9$ Hz, H-3), 5.13 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1), 4.77 (dd, 7 H, H-2), 4.14 (m, 7 H, H-5), 4.02 (m, 56 H, CH_2NCS), 3.91 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.6$ Hz, H-4), 3.84 (t, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.25 (t, 56 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, CH_2NH_2), 3.22 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.2$ Hz, H-6a), 3.22 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 5.3$ Hz, H-6b), 2.94 (t, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.5-2.15 (m, 28 H, CH_2CO), 1.60 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.30 (m, 56 H, CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.93, 0.92 (2 t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, CH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 182.8$ (CS), 173.4, 172.1 (2 CO éster), 96.8 (C-1), 78.5 (C-4), 71.9 (C-5), 70.5 (C-3), 70.4 (C-2), 47.1 (CH_2NCS), 46.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 36.9 (CH_2NH_2), 33.9 (C-6), 33.8, 33.7 (2 CH_2CO), 32.2 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 31.2, 31.1 (2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 22.1 (CH_2CH_3), 13.2, 13.1 (2 CH_3).

EM (ESI): m/z 1969.4 $[\text{M} + 2 \text{H}]^{2+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{175}\text{H}_{336}\text{N}_{28}\text{O}_{42}\text{S}_{14}\text{Cl}_{14}$: C, 47.23; H, 7.61; N, 8.81. Encontrado: C, 47.64; H, 7.59; N, 8.85.



Heptaquis[6-desoxi-6-[2-[N²-[2-[N¹-[2-(terc-butoxicarbonilamino)etil]-tioureido]etil]tioureido]etil]tioureido]-2,3-di-O-hexanoil]-ciclomaltoheptaosa (71). A una disolución de heptahidrocloruro de **122** (100 mg, 31 μmol) y Et_3N (36 μL , 261 μmol , 1.2 eq.) en CH_2Cl_2 (3 mL), se añadió **33** (68 mg, 261 μmol , 1.2 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 16 h, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). Rend.: 115 mg (73%). $R_f = 0.74$ (CH_2Cl_2 -MeOH 6:1). $[\alpha]_D = +63.4$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 313 K): $\delta = 7.52$ -7.13 (m, 28 H, NHCS), 5.44 (sa, 14 H, *NHBoc*), 5.30 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$ Hz, H-3), 5.12 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 4.82 (dd, 7 H, H-2), 4.19 (m, 7 H, H-5), 3.83 (t, 7 H, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, H-4), 3.9-3.5 (m, 56 H, CH_2NHCS), 3.30 (m, 21 H, H-6a, CH_2NHBoc), 3.10 (m, 7 H, H-6b), 2.93 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.50-2.13 (m, 28 H, CH_2CO), 1.75-1.55 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.44 (s, 63 H, CMe_3), 1.4-1.2 (m, 56 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, CH_2CH_3), 1.00-0.97 (m, 42 H, CH_3).

^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3 , 313 K): $\delta = 182.8$ (CS), 173.8, 172.0 (2 CO éster), 156.9 (CO carbamato), 97.0 (C-1), 79.8 (CMe_3), 79.0 (C-4), 71.8 (C-5), 70.9 (C-2, C-3), 55.1 ($\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 54.0 ($\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 44.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 42.9 ($\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 39.5 (CH_2NHBoc), 34.3 (CH_2CO , C-6), 33.6 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 31.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28.9 (CMe_3), 24.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 22.7 (CH_2CH_3), 14.2 (CH_3).

EM (ESI): m/z 2546.2 $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$, 1705.9 $[\text{M} + 3 \text{Na}]^{3+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{217}\text{H}_{385}\text{N}_{35}\text{O}_{56}\text{S}_{21}$: C, 51.57; H, 7.68; N, 9.70. Encontrado: C, 51.39; H, 7.46; N, 9.46.

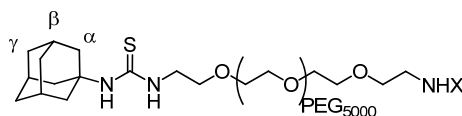
Heptahidrocloruro de heptaquis[6-[2-[N'-[2-[N'-(2-aminoetil)tioureido]etil]-tioureido]etiltio]-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (72). Los grupos carbamato del compuesto **71** (30 mg, 5.9 μ mol) se hidrolizaron siguiendo el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose **72**. Rend.: 21 mg (99%). $[\alpha]_D = + 53.7$ (*c*, 1.0, MeOH).

^1H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 5.35$ (ta, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.9$ Hz, H-3), 5.19 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.0$ Hz, H-1), 4.85 (dd, 7 H, H-2), 4.21 (m, 7 H, H-5), 3.94 (m, 21 H, H-4, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.79 (sa, 14 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.73 (sa, 28 H, $\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$, $\text{CSNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 3.28 (m, 28 H, CH_2NH_2 , H-6a), 2.98 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.5-2.2 (m, 28 H, CH_2CO), 1.75-1.55 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.50-1.30 (m, 56 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, CH_2CH_3), 1.0-0.9 (m, 42 H, CH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 186.3$, 184.7 (2 CS), 176.0, 174.7 (2 CO), 99.4 (C-1), 81.3 (C-4), 74.5 (C-5), 73.2 (C-3), 72.9 (C-2), 46.6 ($\text{SCNHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 45.8 ($\text{SCNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$, $\text{SCNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 43.9 (CH_2NH_2), 42.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 36.4 (CH_2CO , C-6), 35.5 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 33.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 26.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 24.8 (CH_2CH_3), 15.6 (CH_3).

EM(ESI): m/z 2176.2 $[\text{M} + 2 \text{H}]^{2+}$, 1451.0 $[\text{M} + 3 \text{H}]^{3+}$, 1088.5 $[\text{M} + 4 \text{H}]^{4+}$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{182}\text{H}_{338}\text{N}_{35}\text{O}_{42}\text{S}_{21}\text{Cl}_7$: C, 47.43; H, 7.35; N, 5.39. Encontrado: C, 47.11; H, 7.23; N, 10.39.



X = Boc, **73**

X = H, **74**

Conjugado de polietilenglicol 73. Una disolución de 1-adamantanil isotiocianato (1.6 mg, 2 eq.) y Et₃N (25 µL, 45 eq.) en CH₂Cl₂ (0.5 mL) se adicionó a una disolución de *O*-(2-aminoetil)-*O'*-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]polietilen glicol (peso molecular promedio: 5000 Da) (20 mg) en CH₂Cl₂ (0.5 mL). La mezcla se agitó durante 48 h a t.a., se evaporó el disolvente con corriente de N₂ y se lavó el sólido obtenido con H₂O (2 x 2 mL). El extracto se filtró con un filtro de 0.4 µm de tamaño de corte y se liofilizó para obtener **73**. Rend.: 20.7 mg (99%).

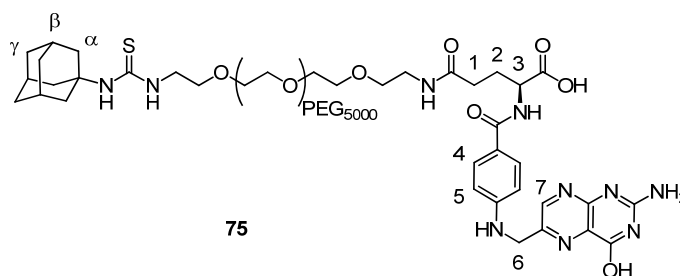
¹H RMN (500 MHz, D₂O): δ = 3.64 (m, ~440 H (n ~ 110), CH₂O, CH₂CH₂NHCS), 3.57 (t, 2 H, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, CH₂CH₂NHBoc), 3.21 (t, 2 H, CH₂NHBoc), 2.05 (sa, 3 H, βH), 2.01 (sa, 6 H, αH), 1.62 (dda, 6 H, γH), 1.38 (s, 9 H, CMe₃).

EM(ESI): *m/z* 2642.7 ± 22n (n = ± 10) [M + 2 H]²⁺.

Conjugado de polietilenglicol 74. El compuesto **74** se preparó a partir de **73** (20.7 mg) mediante tratamiento con TFA-H₂O (1 mL) como se describe en los métodos generales. Rend.: 20.6 mg (99%).

¹H RMN (500 MHz, D₂O): δ = 3.71 (t, 2 H, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, CH₂CH₂NH₂), 3.64 (m, ~440 H (n ~ 110), CH₂O, CH₂CH₂NHCS), 3.16 (t, 2 H, CH₂NH₂), 2.05 (sa, 3 H, βH), 2.01 (sa, 6 H, αH), 1.64 (dda, 6 H, γH).

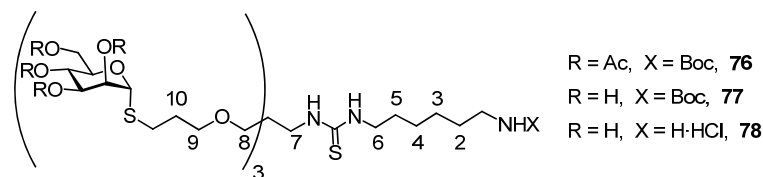
EM(ESI): *m/z* 2691.7 ± 22n (n = ± 10) [M + Na + H]²⁺.



Conjugado de polietilenglicol 75. Una suspensión de ácido fólico (AF, 2.8 mg, 6.2 μmol) y DCC (4.6 mg, 23 μmol) en Py-DMSO (1:1, 1 mL) se agitó durante 1 h a t.a. antes de adicionarse sobre una disolución de **74** en Py-DMSO (1:1, 1 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 48 h. Seguidamente se eliminó el disolvente a presión reducida. Se resuspende el sólido en H_2O y se centrifuga con Na_2CO_3 (3 mg), se elimina el sobrenadante y el residuo sólido se purifica por cromatografía de permeación sobre gel (Shepadex G-25). Rend.: 16 mg (70%).

^1H RMN (500 MHz, D_2O): δ = 8.65 (m, 1 H, H-7), 7.62 (m, 2 H, H-5), 6.72 (m, 2 H, H-4), 4.90 (sa, 2 H, H-6), 4.40 (m, 1 H, H-3), 3.64 (m, ~ 440 H ($n \sim 110$), CH_2O , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 3.19 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz, CH_2NHCO), 2.44 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, H-1), 1.98 (m, 5 H, βH , H-2), 1.83 (sa, 6 H, αH), 1.60 (m, 6 H, γH).

EM(ESI): m/z 2751.3 \pm 22n ($n = \pm 10$) $[\text{M} + \text{Cl}]^2$.



N-(6-*terc*-Butoxicarbonilamino)hexil-N'-2,2,2-tris[5-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosilitio)-2-oxapentil]etiltiourea (76). Una disolución de hidrocloreuro de *N-terc*-butoxicarbonilamino-1,6-hexametilendiamina (91 mg, 0.36 mmol, 1.2 eq.) en CH_2Cl_2 (3 mL) a pH 8 (Et_3N) se agitó durante 20 min y se le añadió una disolución de 2,2,2-tris[5-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosilitio)-2-oxapentil]etil isotiocianato (**133**, 0.42 g, 0.30 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL). La mezcla se agitó durante 24 h, los disolventes se eliminaron bajo presión reducida y el residuo se purificó por columna cromatográfica (AcOEt-éter de petróleo 2:1 \rightarrow 3:1) para dar **73**. Rend.: 430 mg (89%). $R_f = 0.26$ (AcOEt-éter de petróleo 3:1). $[\alpha]_D = +59.1$ (c 0.8, MeOH).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta = 5.36$ (dd, 3 H, $J_{2,3} = 3.4$ Hz, $J_{1,2} = 1.5$ Hz, H-2), 5.34 (t, 3 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.9$ Hz, H-4), 5.30 (d, 3 H, H-1), 5.26 (dd, 3 H, H-3), 4.73 (sa, 1 H, *NHBoc*), 4.39 (ddd, 3 H, $J_{5,6a} = 5.1$ Hz, $J_{5,6b} = 2.2$ Hz, H-5), 4.34 (dd, 3 H, $J_{6a,6b} = 12.1$ Hz, H-6a), 4.12 (dd, 3 H, H-6b), 3.51 (t, 6 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, CH_2 -9), 3.41 (m, 10 H, CH_2 -6, CH_2 -7, CH_2 -8), 3.14 (m, 2 H, CH_2NHBoc), 2.76 y 2.70 (2 dt, 6 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, CH_2 S), 2.19, 2.12, 2.08, 2.01 (4 s, 36 H, COCH_3), 1.92 (q, 6 H, CH_2 -10), 1.60 (m, 2 H, CH_2 -5), 1.51 (m, 2 H, CH_2 -2), 1.46 (s, 9 H, CMe_3), 1.36 (m, 4 H, CH_2 -3, CH_2 -4). ^{13}C RMN (125.7 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta = 181.0$ (CS), 170.4, 169.9, 169.7, 169.6 (4 CO éster), 156.0 (CO carbamato), 82.5 (C-1), 78.8 (CMe_3), 71.0 (C-2), 69.6 (CH_2 -9), 69.4 (C-3, CH_2 -8), 69.0 (C-5), 66.2 (C-4), 62.4 (C-6), 44.5 (CH_2 -7, C_q), 40.6 (CH_2NHBoc), 40.3, (CH_2 -6), 29.8 (CH_2 -5), 29.3 (CH_2 -10), 28.9 (CH_2 -2), 28.4 (CMe_3), 28.1 (CH_2 S), 26.4, 26.3 (CH_2 -3, CH_2 -4), 21.0, 20.8, 20.7, 20.5 (4 COCH_3).

EM (ESI): m/z 1606.4 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 1628.5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1644.2 $[\text{M} + \text{K}]^+$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{68}\text{H}_{107}\text{N}_3\text{O}_{32}\text{S}_4$: C, 50.83; H, 6.71; N, 2.62. Encontrado: C, 50.65; H, 6.67; N, 2.38.

***N*-(6-*tert*-Butoxicarbonilamino)hexil-*N'*-2,2,2-tris[5- α -D-manopiranosilitio-2-oxapentil]etiltiurea (77).** El compuesto 77 se obtuvo por desacetilación convencional de 76 (0.42 g, 0.26 mmol) mediante el procedimiento descrito en los métodos generales. Rend.: 0.27 g (94%). $R_f = 0.30$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 10:2:1). $[\alpha]_D = +129.6$ (c 0.9, MeOH).

¹H RMN (500 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 5.26$ (s, 3 H, H-1), 3.98 (s, 3 H, H-2), 3.92 (m, 3 H, H-5), 3.86 (dd, 3 H, $J_{6a,6b} = 11.9$ Hz, $J_{5,6a} = 2.2$ Hz, H-6a), 3.77 (dd, 3 H, $J_{5,6b} = 5.9$ Hz, H-6b), 3.68 (m, 6 H, H-3, H-4), 3.55 (m, 6 H, CH₂-9), 3.47 (m, 2 H, CH₂-6), 3.45 (m, 8 H, CH₂-7, CH₂-8), 3.06 (m, 2 H, CH₂NHBoc), 2.80, 2.74 (2 dt, 6 H, $^2J_{H,H} = 13.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, CH₂S), 1.93 (q, 6 H, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, CH₂-10), 1.62 (m, 2 H, CH₂-5), 1.51 (m, 2 H, CH₂-2), 1.46 (s, 9 H, CMe₃), 1.39 (m, 4 H, CH₂-3, CH₂-4).

¹³C RMN (100.3 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 181.3$ (CS), 158.6 (CO), 86.6 (C-1), 79.8 (CMe₃), 75.0 (C-5), 73.8 (C-2), 73.2 (C-3), 72.0 (CH₂-8), 70.9 (CH₂-9), 68.4 (C-4), 62.8 (C-6), 45.6 (CH₂-7, C_q), 41.3 (CH₂NHBoc), 40.4 (CH₂-6), 30.9 (CH₂-2), 30.7 (CH₂-10), 30.3 (CH₂-5), 28.9 (CH₂S), 28.9 (CMe₃), 27.7, 27.6 (CH₂-3, CH₂-4).

EM (ESI): m/z 1102.4 [M + H]⁺, 1124.3 [M + Na]⁺, 1140.3 [M + K]⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₄₄H₈₃N₃O₂₀S₄: C, 47.94; H, 7.59; N, 3.81. Encontrado: C, 47.99; H, 7.55; N, 3.76.

Hidrocloruro de *N*-(6-aminohexil)-*N'*-2,2,2-tris[5- α -D-manopiranosilitio-2-oxapentil]etiltiurea (78). El grupo carbamato del compuesto 77 (0.17 g, 0.15 mmol) se hidrolizó mediante el procedimiento descrito en los métodos generales para obtener 78. Rend.: 0.15 g (100%). $R_f = 0.30$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 6:3:1). $[\alpha]_D = +120.6$ (c 1.2, H₂O). ¹H RMN (500 MHz, D₂O, 323 K): $\delta = 5.54$ (s, 3 H, H-1), 4.28 (dd, 3 H, $J_{2,3} = 3.2$ Hz, $J_{1,2} = 1.5$ Hz, H-2), 4.19 (ddd, 3 H, $J_{4,5} = 9.6$ Hz, $J_{5,6b} = 5.6$ Hz, $J_{5,6a} = 2.2$ Hz, H-5), 4.09 (dd, 3 H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, H-6a), 4.03 (dd, 3 H, H-6b), 4.00 (dd, 3 H, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, H-3), 3.94 (t, 3 H, H-4), 3.83 (t, 6 H, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, CH₂-9), 3.73 (m, 2 H, CH₂-6), 3.69 (m, 8 H, CH₂-7, CH₂-8), 3.25 (t, 2 H, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, CH₂NHBoc), 3.00, 2.99 (2 dt, 6 H, $^2J_{H,H} =$

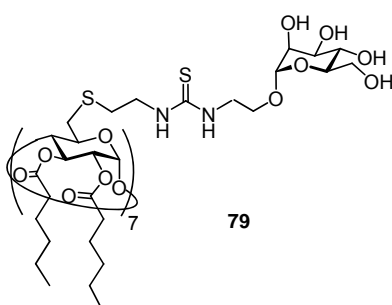
13.2 Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, CH₂S), 2.17 (q, 6 H, CH₂-10), 1.92 (m, 2 H, CH₂-5), 1.86 (m, 2 H, CH₂-2), 1.65 (m, 4 H, CH₂-3, CH₂-4).

¹³C RMN (125.7 MHz, D₂O, 298 K): $\delta = 179.0$ (CS), 85.0 (C-1), 73.2 (C-5), 71.9 (C-2), 71.2 (C-3, CH₂-8), 70.0 (CH₂-9), 67.0 (C-4), 60.8 (C-6), 44.2 (CH₂-7, C_q), 39.5 (CH₂NHBoc, CH₂-6), 28.7 (CH₂-10), 27.8 (CH₂-2, CH₂-5), 26.7 (CH₂S), 25.4 (CH₂-3, CH₂-4).

EM (ESI): m/z 1002.4 [M + H]⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₃₉H₇₆ClN₃O₁₈S₄: C, 45.09; H, 7.37; N, 4.05.

Encontrado: C, 44.92; H, 7.03; N, 3.92.



Heptaquis[2,3-di-O-hexanoil-6-(2-(N'-(2-α-D-manopiranosiloxietil)-tioureido)etil)]ciclomaltoheptaosa (79). Una disolución de **122** (85 mg, 26.9 μmol) en acetona-H₂O (2:1, 3 mL) a pH 8 (NaHCO₃) se agitó durante 20 min y se le añadió una disolución de 2-isotiocianatoetil-α-D-manopiranosido³⁴² (**132**, 75 mg, 0.28 mmol, 1.5 eq.) en H₂O (1 mL). Tras 2 h apareció un precipitado que se disolvió en CH₂Cl₂ (0.5 mL) y la disolución resultante se continuó agitando durante 16 h. Los disolventes orgánicos fueron concentrados y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo resultante se purificó en columna cromatográfica (CH₂Cl₂-MeOH 1:1 → 1:2). Rend.: 49 mg (38%). $[\alpha]_{\text{D}} = +75.1$ (c 1.0, CHCl₃).

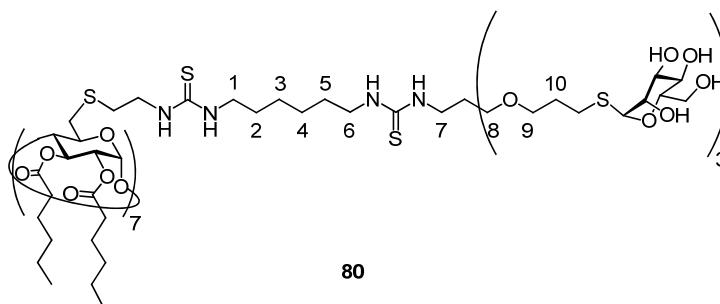
¹H RMN (500 MHz, MeOD-CDCl₃ 9:1, 323 K): $\delta = 5.32$ (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3_{Glc}) 5.14 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, H-1_{Glc}), 4.83 (m, 14 H, H-2, H-1_{Man}), 4.19 (m, 7 H, H-

5_{Glc}), 3.91-3.81 (m, 28 H, H-4, H- 2_{Man} , H- $6a_{\text{Man}}$, CH_2Oa), 3.79-3.68 (m, 28 H, H- 3_{Man} , H- $6b_{\text{Man}}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.66 (m, 7 H, CH_2Ob), 3.64 (t, 7 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.4$ Hz, H- 4_{Man}), 3.58 (m, 7 H, H- 5_{Man}), 3.30 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.27 (m, 7 H, H- $6a_{\text{Glc}}$), 3.18 (m, 7 H, H- $6b_{\text{Glc}}$), 2.94, 2.89 (2 dt, 14 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.45-2.20 (m, 28 H, CH_2CO), 1.62 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.39-1.30 (m, 56 H, CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.92 (m, 42 H, CH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD- CDCl_3 9:1, 323 K): $\delta = 183.8$ (CS), 174.9, 173.4 (2 CO), 101.8 (C- 1_{Man}), 98.2 (C- 1_{Glc}), 80.2 (C- 4_{Glc}), 74.7 (C- 5_{Man}), 73.1 (C- 5_{Glc}), 72.7 (C- 3_{Man}), 72.1 (C- 2_{Glc} , C- 2_{Man}), 71.8 (C- 3_{Glc}), 68.9 (C- 4_{Man}), 67.5 (CH_2O), 63.1 (C- 6_{Man}), 45.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 45.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 35.3 (CH_2CO), 34.2 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 32.7, 32.5 (2 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 30.7 (C- 6_{Glc}), 25.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 23.5 (CH_3CH_2), 14.6 (CH_3).

EM (MALDI-TOF): m/z 4723.45 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{203}\text{H}_{350}\text{N}_{14}\text{O}_{84}\text{S}_{14}$: C, 51.01; H, 7.38; N, 4.10. Encontrado: C, 51.03; H, 7.50; N, 3.97.



Heptaakis[2,3-di-*O*-hexanoil-6-(2-(*N'*-(*N'*-2,2,2-tris(5- α -D-manopiranosiltio-2-oxapentil)tioureido)hexil)tioureido)etiltio]ciclomaltoheptaosa (80). Una disolución de **78** (0.16 g, 0.15 mmol, 1.2 eq.) en DMF (2 mL) a pH 8 (NaHCO_3 saturado) se agitó durante 20 minutos y, después, se añadió una disolución de **122** (57 mg, 17.9 μmol) en DMF (0.5 mL). Tras 24 h se evaporó el disolvente bajo presión reducida, el residuo se lavó con HCl 0.1 M y se purificó mediante cromatografía de permeación sobre gel

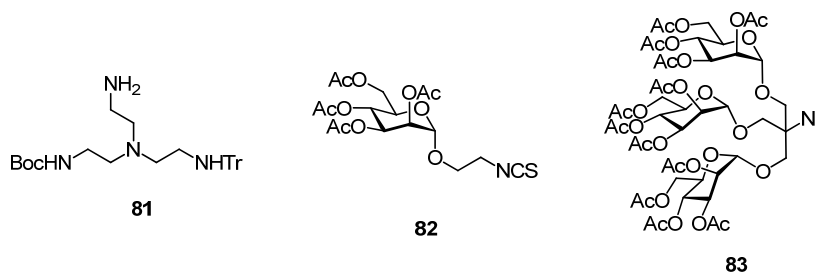
(Sephadex LH-20, MeOH) para dar **80**. Rend.: 0.16 g (87%). $[\alpha]_D = + 118.1$ (c 1.0, MeOH).

^1H RMN (500 MHz, 323 K, MeOD): $\delta = 5.35$ (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3_{Glc}), 5.30 (s, 21 H, H-1_{Man}), 5.20 (d, 7 H, $J_{1,2} = 2.9$ Hz, H-1_{Glc}), 4.86 (dd, 7 H, H-2_{Glc}), 4.21 (m, 7 H, H-5_{Glc}), 3.98 (m, 21 H, H-2_{Man}), 3.93 (m, 28 H, H-4_{Glc}, H-5_{Man}), 3.87 (dd, 21 H, $J_{6a,6b} = 11.8$, $J_{5,6a} = 2.3$ Hz, H-6_{aMan}), 3.83 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 3.80 (dd, 21 H, $J_{5,6b} = 5.4$ Hz, H-6_{bMan}), 3.72 (m, 42 H, H-3_{Man}, H-4_{Man}), 3.57 (ta, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, CH_2 -9), 3.49 (m, 14 H, CH_2 -6), 3.46 (m, 56 H, CH_2 -7, CH_2 -8), 3.30 (m, 14 H, H-6_{aGlc}, H-6_{bGlc}), 3.21 (m, 14 H, CH_2 -1), 2.97 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 2.80, 2.75 (2 dt, 42 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, CH_2 -10), 2.45-2.25 (m, 28 H, CH_2CO), 1.95 (m, 42 H, CH_2S), 1.68-1.62 (m, 42 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$, CH_2 -5), 1.46-1.31 (m, 98 H, CH_2 -2, CH_2 -3, CH_2 -4, CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.95 (m, 42 H, CH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, 333 K, MeOD): $\delta = 184.3$ (CS), 176.0, 174.7 (2 CO), 99.5 (C-1_{Glc}), 87.2 (C-1_{Man}), 81.4 (C-4_{Glc}), 75.1 (C-5_{Man}), 73.8 (C-2_{Man}), 73.5 (C-3_{Man}), 72.5 (C-5_{Glc}), 72.2 (CH_2 -8), 71.8 (C-2_{Glc}, C-3_{Glc}), 71.2 (CH_2 -10), 69.2 (C-4_{Man}), 63.0 (C-6_{Man}), 45.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$, CH_2 -1, CH_2 -7), 42.9 (C_q), 42.1 (CH_2 -6), 36.4 (C-6_{Glc}, CH_2CO), 34.2 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cist}}$), 32.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 30.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 30.7, 30.3 (CH_2 -2, CH_2 -5), 29.1 (CH_2S), 27.7 (CH_2 -3, CH_2 -4), 24.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 23.3 (CH_2CH_3), 14.1 (CH_3).

EM (ESI): m/z 1102.4 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 1124.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1140.3 $[\text{M} + \text{K}]^+$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{420}\text{H}_{756}\text{N}_{28}\text{O}_{168}\text{S}_{42}$: C, 49.29; H, 7.45; N, 3.83. Encontrado: C, 49.14; H, 7.32; N, 3.75.



2-Aminoetil-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]-[2-(trifenilmetilamino)etil]-

amina (81). A una disolución de bis(2-aminoetil)-[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]amina²⁵ (**137**, 2.25 g, 9.15 mmol) en piridina (20 mL) se añadió cloruro de tritilo (1.27 g, 4.57 mmol, 0.5 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 h a t.a. Se eliminó el disolvente y el residuo se suspendió en H₂O (15 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (20 mL). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró, se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna (MeCN-H₂O-NH₄OH 10:1:1). Rend.: 1.56 g (70%). $R_f = 0.6$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 10:1:1). $[\alpha]_D = -1.5$ (c 1.0, MeOH).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta = 7.47$ (d, 6 H, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, H-2_{Ph}, H-6_{Ph}), 7.25 (t, 6 H, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, H-3_{Ph}, H-5_{Ph}), 7.16 (t, 3 H, H-4_{Ph}), 5.07 (sa, 1 H, NH₂Boc), 3.11 (c, 2 H, $^3J_{H,H} = 5.4$ Hz, CH₂NHBoc), 2.64 (t, 2 H, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, CH₂NHTr), 2.55 (t, 2 H, $^3J_{H,H} = 5.8$ Hz, CH₂NH₂), 2.35 (t, 2 H, CH₂CH₂NHBoc), 2.32 (t, 2 H, CH₂CH₂NHTr), 2.20 (t, 2 H, CH₂CH₂NH₂), 1.65 (sa, 2 H, NH₂), 1.34 (s, 9 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta = 156.1$ (CO), 146.2 (C-1_{Ph}), 128.6 (C-2_{Ph}, C-6_{Ph}), 127.8 (C-3_{Ph}, C-5_{Ph}), 126.3 (C-4_{Ph}), 77.3 (CMe₃), 70.8 (CPh₃), 57.2 (CH₂CH₂NHTr), 54.8 (CH₂CH₂NH₂), 53.8 (CH₂CH₂NHBoc), 40.9 (CH₂NH₂), 39.8 (CH₂NHTr), 38.6 (CH₂NHBoc), 28.4 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 489.3 [M + H]⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₃₀H₄₀N₄O₂ · 2 H₂O: C, 68.67; H, 8.45; N, 10.68. Encontrado: C, 68.73; H, 7.95; N, 10.80.

2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosiloxi)etil isotiocianato (82). A una disolución de 2-azidoetil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosido (**134**, 1.15 g, 2.75 mmol) en dioxano (25 mL) se añadieron, bajo atmósfera de N₂, TPP (0.86 g, 3.3 mmol, 1.2 eq.) y CS₂ (1.66 mL, 27.5 mmol, 10 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 72 h. Se eliminó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-éter de petróleo 1:1). Rend.: 1.07 g (90%). $R_f = 0.5$ (AcOEt-éter de petróleo 1:1). $[\alpha]_D = +28.2$ (*c* 1.0, CH₂Cl₂).

IR (NaCl): $\nu_{\max} = 2112.7 \text{ cm}^{-1}$ (NCS).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta = 5.34$ (dd, 1 H, $J_{2,3} = 3.4 \text{ Hz}$, $J_{3,4} = 10.0 \text{ Hz}$, H-3), 5.28 (t, 1 H, $J_{4,5} = 10.0 \text{ Hz}$, H-4), 5.26 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 1.4 \text{ Hz}$, H-2), 4.85 (d, 1 H, H-1), 4.28 (dd, 1 H, $J_{5,6a} = 5.1 \text{ Hz}$, $J_{6a,6b} = 12.3 \text{ Hz}$, H-6a), 4.11 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 2.3 \text{ Hz}$, H-6b), 4.06 (m, 1 H, H-5), 3.88 (m, 1 H, CH₂Oa), 3.72 (m, 3 H, CH₂Ob, CH₂NCS), 2.14, 2.09, 2.03, 1.98 (4 s, 12 H, COCH₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta = 170.6$, 170.0, 169.8, 169.7 (4 CO), 145.4 (NCS), 97.9 (C-1), 69.3 (C-5), 69.1 (C-3), 68.9 (C-2), 66.7 (CH₂O), 65.9 (C-4), 62.4 (C-6), 45.0 (CH₂NCS), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (4 COCH₃).

EM (ESI): m/z 456.1 [M + Na]⁺, 472.0 [M + K]⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₁₇H₂₃NO₁₀S: C, 47.11; H, 5.35; N, 3.23. Encontrado: C, 46.89; H, 5.26; N, 3.18.

Tris(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosiloximetil)metilazida (83). A una disolución de tris(hidroximetil)metilazida³⁴⁴ (**136**, 33.5 mg, 0.23 mmol) y 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-D-manopiranososa (0.32 g, 0.82 mmol, 1.2 eq.) en CH₂Cl₂ recién destilado se añadió, a 0 °C y bajo atmósfera de N₂, trifluoruro de boro eterato (0.43 mL, 3.42 mmol, 5 eq.) y la mezcla se agitó a t.a. durante 24 h. Tras este tiempo se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con H₂O y con una disolución saturada de NaHCO₃ (x2). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-éter de petróleo 1:1 → 2:1). Rend.: 131 mg (50%). $R_f = 0.41$ (AcOEt-éter de petróleo 2:1). $[\alpha]_D = +47.8$ (*c* 1.0, CH₂Cl₂).

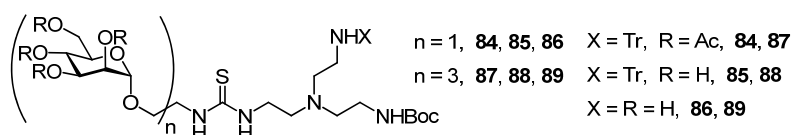
IR (NaCl): $\nu_{\max} = 2113 \text{ cm}^{-1}$ (N_3).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta = 5.29$ (m, 6 H, H-3, H-4), 5.21 (dd, 3 H, $J_{2,3} = 3.0$ Hz, $J_{1,2} = 1.8$ Hz, H-2), 4.89 (d, 3 H, H-1), 4.34 (dd, 3 H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, $J_{5,6a} = 5.0$ Hz, H-6a), 4.14 (dd, 3 H, $J_{5,6b} = 2.4$ Hz, H-6b), 4.01 (ddd, 3 H, $J_{4,5} = 9.1$ Hz, H-5), 3.87, 3.66 (2 d, 6 H, $^2J_{\text{H,H}} = 10.5$ Hz, 3 CH_2O), 2.15, 2.11, 2.04, 1.98 (4 s, 36 H, COCH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta = 170.8, 170.1, 169.9, 169.8$ (4 CO), 98.5 (C-1), 68.3 (C-2), 68.2 (C-3), 69.0 (C-5), 67.5 (CH_2O), 65.9 (C-4), 64.6 (OCH_2)₃C, 62.4 (C-6), 21.0, 20.9, 20.8, 20.7 (4 COCH_3).

EM (ESI): m/z 1160.4 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_{30}$: C, 48.55; H, 5.58; N, 3.69. Encontrado: C, 48.39; H, 5.38, N, 3.41.



[2-(*tert*-Butoxicarbonilamino)etil]-[2-(*N'*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-mano-piranosiloxietil)tioureido)etil]-[2-(trifenilmetilamino)etil]amina (84**). A una disolución de **81** (0.15 g, 0.31 mmol) y Et_3N (50 μL , 0.35 mmol, 1.1 eq.) en CH_2Cl_2 (3 mL), se añadió una disolución de **82** (0.15 g, 0.35 mmol, 1.1 eq.) en CH_2Cl_2 (3 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 14 h, se eliminó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 40:1). Rend.: 0.28 g (98%). $R_f = 0.76$ (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1). $[\alpha]_{\text{D}} = +17.4$ (c 1.0, CH_2Cl_2).**

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta = 7.44$ (d, 6 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, H-2_{Ph}, H-6_{Ph}), 7.24 (t, 6 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, H-3_{Ph}, H-5_{Ph}), 7.14 (t, 3 H, H-4_{Ph}), 5.26 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 1.6$ Hz, $J_{3,4} = 10.4$ Hz, H-3), 5.23 (t, 1 H, $J_{4,5} = 10.4$ Hz, H-4), 5.20 (t, 1 H, $J_{1,2} = 1.6$ Hz, H-2), 4.78 (d, 1 H, H-1), 4.51 (sa, 1 H, NH-Boc), 4.28 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, $J_{5,6a} = 5.2$ Hz, H-6a), 4.08 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 2.1$ Hz, H-6b), 3.99 (m, 1 H, H-5), 3.87 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.69 (m, 1 H, CH_2Oa), 3.60 (m, 3 H, CH_2Ob , $\text{CH}_2\text{NH-Boc}$), 3.15-2.95 (m, 2 H, CH_2NHCS),

2.57 (m, 2 H, CH_2NHTr), 2.53 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 2.19 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 2.10 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHTr}$), 2.12, 2.09, 2.00, 1.94 (4 s, 12 H, CH_3CO), 1.70 (sa, 1 H, NHTr), 1.23 (s, 9 H, CMe_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta = 183.3$ (CS), 170.8, 170.0, 169.8, 169.7 (4 CO éster), 157.0 (CO carbamato), 146.2 (C-1_{Ph}), 128.6 (C-2_{Ph}, C-6_{Ph}), 127.8 (C-3_{Ph}, C-5_{Ph}), 126.3 (C-4_{Ph}), 97.6 (C-1), 80.1 (CMe_3), 70.7 (CPh_3), 69.4 (C-2), 69.2 (C-3), 68.6 (C-5), 67.0 (CH_2O), 66.2 (C-4), 62.4 (C-6), 55.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 54.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 53.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHTr}$), 43.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 43.8 (CH_2NHCS), 40.7 (CH_2NHTr), 39.0 (CH_2NHBoc), 28.3 (CMe_3), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (4 COCH_3).

EM (ESI): m/z 922.4 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{47}\text{H}_{63}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{S}$: C, 61.22; H, 6.89; N, 7.60. Encontrado: C, 61.38; H, 6.97; N, 7.46.

[2-(*tert*-Butoxicarbonilamino)etil]-[2-(*N*²-(α -D-manopiranosiloxietil)-tioureido)etil]-[2-(trifenilmetilamino)etil]amina (85). El compuesto **85** se obtuvo por desacetilación de **84** (0.27 g, 0.29 mmol) mediante el procedimiento descrito en los métodos generales. Rend.: 0.21 g (97%). $R_f = 0.63$ (MeCN- H_2O - NH_4OH 10:2:1). $[\alpha]_D = +14.9$ (c 0.9, CH_2Cl_2).

^1H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 7.45$ (d, 6 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, H-2_{Ph}, H-6_{Ph}), 7.27 (t, 6 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, H-3_{Ph}, H-5_{Ph}), 7.17 (t, 3 H, H-4_{Ph}), 4.76 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, H-1), 3.82 (m, 3 H, H-6a, H-2, CH_2Oa), 3.71 (m, 2 H, H-6b, H-3), 3.63 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.2$ Hz, H-4), 3.58 (m, 6 H, CH_2Ob , H-5, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CH_2NHCS), 3.08 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, CH_2NHBoc), 2.63 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, CH_2NHTr), 2.57 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 2.44 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 2.26 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHTr}$), 1.36 (s, 9 H, CMe_3).

^{13}C RMN (75.5 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 184.1$ (CS), 158.8 (CO), 147.5 (C-1_{Ph}), 129.8 (C-2_{Ph}, C-6_{Ph}), 128.8 (C-3_{Ph}, C-5_{Ph}), 127.2 (C-4_{Ph}), 101.8 (C-1), 80.4 (CMe_3), 74.7 (C-5), 72.6 (C-3), 72.4 (CPh_3), 72.1 (C-2), 68.7 (C-4), 67.3 (CH_2O), 62.9 (C-6, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 56.0

(CH₂NHTr), 55.7 (CH₂CH₂NHBoc), 54.6 (CH₂CH₂NHCS), 42.4 (CH₂CH₂NHTr), 45.0, 43.2 (2 CH₂NHCS), 39.4 (CH₂NHBoc), 28.8 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 754.4 [M + H]⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₃₉H₅₅N₅O₈S: C, 62.13; H, 7.35; N, 9.29. Encontrado: C, 61.97; H, 7.18; N, 9.14.

(2-Aminoetil)-[2-(*terc*-butoxicarbonilamino)etil]-[2-(*N'*-(α -D-manopiranosiloxietil)tioureido)etil]amina (86). El compuesto **85** (0.2 g, 0.27 μ mol) se disolvió en una mezcla de TFA-CH₂Cl₂ (1:99, 7 mL) y se agitó a t.a. durante 1 h. Se eliminaron los disolventes a presión reducida coevaporando varias veces con H₂O y el residuo resultante se liofilizó de una disolución diluida de NH₄OH obteniéndose la amina **86**. Rend.: 0.16 g (99%). $R_f = 0.40$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 10:2:1). $[\alpha]_D = + 5.1$ (c 0.3, H₂O).

¹H RMN (500 MHz, D₂O, 298 K): $\delta = 4.74$ (d, 1 H, H-1), 3.81 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, $J_{2,3} = 3.2$ Hz, H-2), 3.74 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 12.1$ Hz, $J_{5,6a} = 2.0$ Hz, H-6a), 3.64 (m, 3 H, H-3, H-6b, CH₂Oa), 3.53 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.6$ Hz, H-4), 3.50 (m, 6 H, H-5, CH₂Ob, CH₂NHCS, CH₂CH₂O), 3.05 (t, 2 H, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, CH₂NHBoc), 2.97 (t, 2 H, $^3J_{H,H} = 6.1$ Hz, CH₂NH₂), 2.72 (t, 2 H, CH₂CH₂NH₂), 2.63 (t, 2 H, $^3J_{H,H} = 6.7$ Hz, CH₂CH₂NHCS), 2.55 (t, 2 H, CH₂CH₂NHBoc), 1.31 (s, 9 H, CMe₃).

¹³C RMN (100.6 MHz, D₂O, 313 K): $\delta = 180.7$ (CS), 158.4 (CO), 100.0 (C-1), 81.4 (CMe₃), 73.1 (C-5), 70.8 (C-3), 70.2 (C-2), 66.9 (C-4), 66.1 (CH₂O), 61.1 (C-6), 53.2 (CH₂CH₂NHBoc), 52.4 (CH₂CH₂NHCS), 51.0 (CH₂CH₂NH₂), 43.7 (CH₂CH₂O), 43.2 (CH₂NHCS), 38.2 (CH₂NHBoc), 37.4 (CH₂NH₂), 27.9 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 512.3 [M + H]⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₂₀H₄₁N₅O₈S: C, 46.95; H, 8.08; N, 13.69. Encontrado: C, 46.90; H, 8.08; N, 13.50.

[2-(*terc*-Butoxicarbonilamino)etil]-[tris-(*N*'-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosiloximetil)metiltioureido)etil]-[2-(trifenilmetilamino)etil]amina (87). A una disolución de **81** (0.26 g, 0.52 mmol) y Et₃N (80 μ L, 0.58 mmol, 1.1 eq.) en CH₂Cl₂ (5 mL) se añadió una disolución de tris-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosiloximetil)metil isotiocianato (**135**, 0.6 g, 0.52 mmol, 1 eq.) en CH₂Cl₂ (5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 38 h, se eliminó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 20:1). Rend.: 0.69 g (80%). *R*_f = 0.61 (CH₂Cl₂-MeOH 20:1). [α]_D = + 32.1 (*c* 0.7, CH₂Cl₂).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ = 7.44 (d, 6 H, ³*J*_{H,H} = 7.5 Hz, H-2_{Ph}, H-6_{Ph}), 7.25 (t, 6 H, ³*J*_{H,H} = 7.5 Hz, H-3_{Ph}, H-5_{Ph}), 7.15 (t, 3 H, H-4_{Ph}), 6.55 (sa, 1 H, *NHTr*), 5.28 (t, 3 H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9.6 Hz, H-4), 5.20 (dd, 3 H, *J*_{2,3} = 3.5 Hz, H-3), 5.16 (t, 3 H, *J*_{1,2} = 1.2 Hz, H-2), 4.90 (d, 3 H, H-1), 4.57 (sa, 1 H, *NHBoc*), 4.36 (dd, 3 H, *J*_{6a,5} = 4.5 Hz, *J*_{6a,6b} = 12.4 Hz, H-6a), 4.33 (da, 3 H, ²*J*_{H,H} = 11.9 Hz, CH₂Oa), 4.08 (dd, 3 H, *J*_{6b,5} = 2.2 Hz, H-6b), 4.06 (m, 3 H, H-5), 4.01 (da, 3 H, CH₂Ob), 3.47 (sa, 2 H, CH₂*NHBoc*), 3.15-2.95 (m, 2 H, CH₂*NHCS*), 2.60 (sa, 2 H, CH₂*NHTr*), 2.53 (sa, 2 H, CH₂CH₂*NHBoc*), 2.24 (m, 2 H, CH₂CH₂*NHCS*), 2.19 (m, 2 H, CH₂CH₂*NHTr*), 2.13, 2.10, 2.00, 1.95 (4 s, 36 H, COCH₃), 1.30 (s, 9 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 298 K): δ = 182.2 (CS), 170.8, 170.0, 169.8, 169.6 (4 CO éster), 156.9 (CO carbamato), 146.1 (C-1_{Ph}), 128.6 (C-2_{Ph}, C-6_{Ph}), 127.8 (C-3_{Ph}, C-5_{Ph}), 126.3 (C-4_{Ph}), 98.3 (C-1), 79.9 (CMe₃), 71.0 (CPh₃), 69.3 (C-2, C-3), 68.8 (C-5), 65.8 (C-6), 62.1 (C-4, CH₂O), 61.0 (OCH₂)₃C, 55.0 (CH₂CH₂*NHCS*), 54.2 (CH₂CH₂*NHBoc*), 53.4 (CH₂CH₂*NHTr*), 42.0 (CH₂*NHCS*), 40.8 (CH₂*NHTr*), 39.2 (CH₂*NHBoc*), 28.2 (CMe₃), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (4 COCH₃).

EM (ESI): *m/z* 1642.6 [M + H]⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₇₇H₁₀₃N₅O₃₂S: C, 56.30; H, 6.32; N, 4.26. Encontrado: C, 56.25; H, 6.25; N 4.18.

[2-(*terc*-Butoxicarbonilamino)etil]-[2-(*N'*-(tris- α -D-manopiranosiloximetil)-metiltioureido)etil]-[2-(trifenilmetilamino)etil]amina (88). El compuesto **88** se obtuvo por desacetilación de **87** (0.3 g, 0.18 mmol) según el procedimiento descrito en los métodos generales. Rend.: 0.21 g (99%). $R_f = 0.43$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 10:2:1). $[\alpha]_D = +41.1$ (c 0.9, MeOH).

¹H RMN (500 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 7.48$ (d, 6 H, ³ $J_{H,H} = 7.5$ Hz, H-2_{Ph}, H-6_{Ph}), 7.29 (t, 6 H, ³ $J_{H,H} = 7.5$ Hz, H-3_{Ph}, H-5_{Ph}), 7.19 (t, 3 H, H-4_{Ph}), 4.78 (d, 3 H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, H-1), 4.08 (d, 3 H, ² $J_{H,H} = 9.7$ Hz, CH₂Oa), 4.03 (d, 3 H, CH₂Ob), 3.84 (d, 3 H, $J_{6a,6b} = 11.0$ Hz, H-6a), 3.80 (dd, 3 H, $J_{2,3} = 3.4$ Hz, H-2), 3.68 (m, 6 H, H-6b, H-3), 3.58 (m, 6 H, H-4, H-5), 3.55-3.4 (m, 2 H, CH₂NHCS), 3.15-2.95 (m, 2 H, CH₂NHBoc), 2.62 (m, 2 H, CH₂NHTr), 2.52 (t, 2 H, ³ $J_{H,H} = 7.1$ Hz, CH₂CH₂NHCS), 2.40 (t, 2 H, ³ $J_{H,H} = 5.6$ Hz, CH₂CH₂NHBoc), 2.24 (t, 2 H, ³ $J_{H,H} = 5.9$ Hz, CH₂CH₂NHTr), 1.34 (s, 9 H, CMe₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta = 183.7$ (CS), 158.5 (CO), 147.6 (C-1_{Ph}), 130.0 (C-2_{Ph}, C-6_{Ph}), 128.8 (C-3_{Ph}, C-5_{Ph}), 1267.4 (C-4_{Ph}), 102.3 (C-1), 80.2 (CMe₃), 80.2 (C-5), 74.9 (C-3), 72.1 (CPh₃), 72.0 (C-2), 68.8 (C-4), 67.4 (CH₂O), 62.8 (C-6), 62.1 (OCH₂)₃C, 55.9 (CH₂CH₂NHTr), 55.5 (CH₂CH₂NHBoc), 54.5 (CH₂CH₂NHCS), 43.1 (CH₂NHCS), 42.5 (CH₂NHTr), 39.6 (CH₂NHBoc), 28.8 (CMe₃).

EM (ESI): m/z 1138.5 [M + H]⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₅₃H₇₉N₅O₂₀S: C, 55.92; H, 7.00; N, 6.15. Encontrado: C, 55.62; H, 6.73; N, 6.00.

[2-Aminoetil]-[2-(*terc*-butoxicarbonilamino)etil]-[2-(*N'*-(tris- α -D-manopiranosiloximetil)metiltioureido)etil]amina (89). El compuesto **88** (0.18 g, 0.154 μ mol) se disolvió en una mezcla de TFA-CH₂Cl₂ (1:99, 6 mL) y se agitó a t.a. durante 2 h. El disolvente se eliminó a presión reducida coevaporando varias veces con H₂O y el residuo resultante se liofilizó de una disolución diluida de NH₄OH. Rend.: 0.14 g (99%). $R_f = 0.25$ (MeCN-H₂O-NH₄OH 6:3:1). $[\alpha]_D = +33.5$ (c 0.5, H₂O).

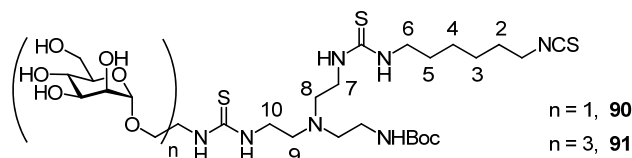
¹H RMN (500 MHz, D₂O, 313 K): $\delta = 4.94$ (d, 3 H, $J_{1,2} = 1.5$ Hz, H-1), 4.19 (d, 3 H, ² $J_{H,H} = 10.2$ Hz, CH₂Oa), 4.03 (dd, 3 H, $J_{2,3} = 3.0$ Hz, H-2), 4.00 (d, 2 H, CH₂Ob), 3.95 (dd, 3

H, $J_{6a,5} = 2.1$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H-6a), 3.84 (dd, 3 H, $J_{6b,5} = 4.6$ Hz, H-6b), 3.83 (dd, 3 H, H-3), 3.75 (t, 3 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.6$ Hz, H-4), 3.68 (m, 8 H, H-5, CH_2NHCS), 3.28 (t, 2 H, ${}^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, CH_2NHBoc), 3.22 (t, 2 H, ${}^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, CH_2NH_2), 3.00 (t, 2 H, $CH_2CH_2NH_2$), 2.90 (t, 2 H, ${}^3J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH_2CH_2NHCS), 2.83 (t, 2 H, CH_2CH_2NHBoc), 1.52 (s, 9 H, CMe_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, D_2O , 313 K): $\delta = 181.4$ (CS), 158.4 (CO), 100.6 (C-1), 81.5 (CMe_3), 73.4 (C-5), 71.0 (C-3), 70.2 (C-2), 66.9 (C-4), 66.5 (CH_2O), 61.4 ($(OCH_2)_3C$), 61.1 (C-6), 53.5 (CH_2CH_2NHBoc), 52.5 (CH_2CH_2NHCS), 50.8 ($CH_2CH_2NH_2$), 41.9 (CH_2NHCS), 38.1 (CH_2NHBoc), 37.1 (CH_2NH_2), 28.0 (CMe_3).

EM (ESI): m/z 896.4 $[M + H]^+$.

Análisis elemental. Calculado para $C_{34}H_{65}N_5O_{20}S$: C, 45.58; H, 7.31; N, 7.82. Encontrado: C, 45.43; H, 6.92; N, 7.64.



[2-(*terc*-Butoxicarbonilamino)etil]-[2-(*N'*-(6-isotiocianatohexil)tiureido)etil]-[2-(*N'*-(α -D-manopiranosiloxietil)tiureido)etil]amina (90). A una disolución de **86** (0.24 g, 0.46 mmol) en H_2O (2 mL) se añadió, gota a gota, una disolución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (0.2 mL) y 1,6-hexametilendiisotiocianato³⁴⁵ (0.18 g, 0.92 mmol, 2 eq.) en acetona (4 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h, se eliminaron los disolventes y el residuo se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-EtOH- H_2O 45:5:3). Rend.: 0.17 g (31%). $R_f = 0.38$ (AcOEt-EtOH- H_2O 45:5:3). $[\alpha]_D = +19.0$ (c 1.0, MeOH).

IR (NaCl): $\nu_{max} = 2110$ cm^{-1} (NCS).

1H RMN (500 MHz, MeOD, 298 K): $\delta = 4.80$ (d, 1 H, $J_{1,2} = 1.4$ Hz, H-1), 3.88 (m, 2 H, H-6a, H-2), 3.72 (m, 3 H, H-3, H-6b, CH_2Oa), 3.64 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.6$ Hz, H-4), 3.55

(m, 12 H, H-5, CH₂Ob, CH₂CH₂O, CH₂NCS, CH₂-6, CH₂-7, CH₂-10), 3.16 (t, 2 H, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, CH₂NHBoc), 2.72 (t, 4 H, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, CH₂-8, CH₂-9), 2.64 (t, 2 H, CH₂CH₂NHBoc), 1.74 (m, 2 H, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, CH₂-2), 1.64 (m, 2 H, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, CH₂-5), 1.47 (s, 9 H, CMe₃) 1.46 (m, 4 H, CH₂-3, CH₂-4).

¹³C RMN (125.7 MHz, MeOD, 313 K): δ = 184.5 (CS), 158.54 (CO), 129.8 (NCS), 101.7 (C-1), 80.1 (CMe₃), 74.6 (C-5), 72.5 (C-3), 71.9 (C-2), 68.6 (C-4), 67.3 (CH₂O), 62.8 (C-6), 55.3 (CH₂CH₂NHBoc), 54.4 (CH₂-2), 54.3 (CH₂-8, CH₂-9), 45.8 (CH₂CH₂O), 45.0 (CH₂NCS), 43.4 (CH₂-6, CH₂-7, CH₂-10), 39.8 (CH₂NHBoc), 30.9 (CH₂-2), 29.9 (CH₂-5), 28.7 (CMe₃), 27.2, 27.0 (CH₂-3, CH₂-4).

EM (ESI): *m/z* 712.3 [M + H]⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₂₈H₅₃N₇O₈S₃: C, 47.24; H, 7.50; N, 13.77. Encontrado: C, 47.09; H, 7.39; N, 13.46.

[2-(*terc*-Butoxicarbonilamino)etil]-[2-(*N'*-(6-hexilisotiocianato)tioureido)etil]-[2-(*N'*-(tris- α -D-manopiranosiloximetil)metiltioureido)etil]amina (91). A una disolución de **89** (0.18 g, 0.2 mmol) en H₂O (2 mL) se añadió, gota a gota, una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (0.1 mL) y 1,6-hexametilendiisotiocianato³⁴⁵ (80 mg, 0.4 mmol, 2 eq.) en acetona (4 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h, se eliminaron los disolventes y el residuo se purificó por cromatografía en columna (MeCN-H₂O-AcOH 3:1:0.6). Rend.: 0.15 g (69%). *R_f* = 0.53 (MeCN-H₂O-AcOH 3:1:0.6). [α]_D = + 18.8 (c 0.5, MeOH).

IR (NaCl): ν_{\max} = 2099 cm⁻¹ (N₃).

¹H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): δ = 4.81 (d, 3 H, *J*_{1,2} = 1.6 Hz, H-1), 4.13 (d, 3 H, ²*J*_{H,H} = 9.8 Hz, CH₂Oa), 4.06 (d, 3 H, CH₂Ob), 3.91 (da, 3 H, *J*_{5,6a} = 2.2 Hz, H-6a), 3.85 (dd, 3 H, *J*_{2,3} = 3.3 Hz, H-2), 3.75 (dd, 3 H, *J*_{5,6b} = 5.0 Hz, *J*_{6a,6b} = 11.8 Hz, H-6b), 3.71 (dd, 3 H, *J*_{3,4} = 8.8 Hz, H-3), 3.64 (t, 3 H, *J*_{4,5} = 9.2 Hz, H-4), 3.61 (m, 7 H, H-5, CH₂-7, CH₂-10), 3.56 (t, 2 H, ³*J*_{H,H} = 6.6 Hz, CH₂NCS), 3.48 (sa, 2 H, CH₂-6), 3.18 (m, 2 H, CH₂NHBoc), 3.79 (t, 4 H, ³*J*_{H,H} = 5.7 Hz, CH₂-8, CH₂-9), 2.71 (t, 2 H, ³*J*_{H,H} = 6.4 Hz,

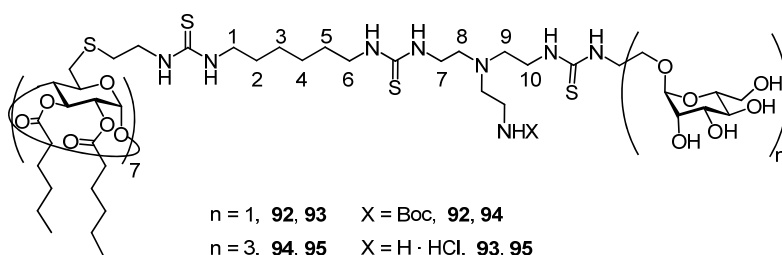
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 1.72 (m, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-2}$), 1.62 (m, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-5}$), 1.47 (s, 9 H, CMe_3) 1.45 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-3}$, $\text{CH}_2\text{-4}$).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 183.7$ (CS), 158.9 (CO), 130.0 (NCS), 102.3 (C-1), 80.2 (CMe_3), 74.8 (C-5), 72.7 (C-3), 71.9 (C-2), 68.8 (C-4), 67.5 (CH_2O), 62.8 (C_q), 62.2 (C-6), 55.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 54.6 ($\text{CH}_2\text{-8}$, $\text{CH}_2\text{-9}$), 45.9 (CH_2NCS), 42.9 ($\text{CH}_2\text{-6}$, $\text{CH}_2\text{-7}$, $\text{CH}_2\text{-10}$), 39.9 (CH_2NHBoc), 31.0 ($\text{CH}_2\text{-2}$), 30.1 ($\text{CH}_2\text{-5}$), 28.9 (CMe_3), 27.4, 27.1 ($\text{CH}_2\text{-3}$, $\text{CH}_2\text{-4}$).

EM (ESI): m/z 1118.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1130.4 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$.

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}_3$: C, 47.24; H, 7.50; N, 13.77; S, 8.77.

Encontrado: C, 45.70; H, 6.83; N, 8.71; S, 8.41.



Heptaquis[6-(2-(*N'*-(6-(*N'*-(2-(*N*-[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)etil]-*N*-[2-(*N'*- α -D-manopiranosiloxietil)tioureido)etil]tioureido)etil]aminoetil)tioureido)hexil)-tioureido)etiltio)-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (92). A una disolución de **122** (36 mg, 12.3 μmol) y Et_3N (13 μL , 95 μmol , 1.1 eq.) en DMF (1 mL), se añadió una disolución de **90** (74 mg, 103 μmol , 1.2 eq.) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó durante for 24 h, se eliminó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía de permeación sobre gel (Sephadex LH-20, MeOH). Rend.: 68.1 mg (70%). $[\alpha]_{\text{D}} = + 36.9$ (*c* 0.23, MeOH).

^1H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 5.35$ (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.8$ Hz, H-3 $_{\text{Glc}}$), 5.20 (d, 7 H, $J_{1,2} = 2.9$ Hz, H-1 $_{\text{Glc}}$), 4.86 (dd, 7 H, H-2 $_{\text{Glc}}$), 4.83 (sa, 7 H, H-1 $_{\text{Man}}$), 4.21 (m, 7 H, H-5 $_{\text{Glc}}$), 3.93 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8.8$ Hz, H-4 $_{\text{Glc}}$), 3.88 (m, 21 H, H-6 $_{\text{aMan}}$, H-2 $_{\text{Man}}$, CH_2Oa), 3.76

(m, 28 H, H-3_{Man}, H-6b_{Man}, CH₂CH₂S_{Cist}), 3.67 (t, 7 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-4_{Man}), 3.60 (m, 56 H, H-5_{Man}, CH₂Ob, CH₂CH₂O, CH₂-7, CH₂-10), 3.49 (m, 28 H, CH₂-1, CH₂-6), 3.31 (m, 7 H, H-6a_{Glc}), 3.19 (m, 21 H, H-6b_{Glc}, CH₂NHBoc), 3.05-2.80 (m, 14 H, CH₂S_{Cist}), 2.77 (m, 28 H, CH₂-8, CH₂-9), 2.68 (m, 14 H, CH₂CH₂NHBoc), 2.50-2.20 (m, 28 H, CH₂CO), 1.65 (m, 56 H, CH₂CH₂CO, CH₂-2, CH₂-5), 1.48 (s, 63 H, CMe₃), 1.40 (m, 84 H, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂-3, CH₂-4), 0.97, 0.95 (2 t, 42 H, $^3J_{H,H} = 7.2$ Hz, CH₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, MeOD, 313 K): $\delta = 183.0-181.0$ (CS), 173.3, 172.1 (2 CO éster), 157.2 (CO carbamato), 100.4 (C-1_{Man}), 96.8 (C-1_{Glc}), 79.0 (CMe₃), 78.7 (C-4_{Glc}), 74.6 (C-5_{Man}), 71.9 (C-5_{Glc}), 71.2 (C-3_{Man}), 70.7 (C-2_{Man}), 70.5 (C-3_{Glc}), 70.2 (C-2_{Glc}), 67.4 (C-4_{Man}), 66.0 (CH₂O), 61.6 (C-6_{Man}), 54.1 (CH₂CH₂NHBoc), 53.2, 53.0 (CH₂-8, CH₂-9), 44.2-43.6 (CH₂-1, CH₂-6, CH₂CH₂S_{Cist}), 42.3-41.8 (CH₂CH₂O, CH₂-7, CH₂-10), 38.4 (CH₂NHBoc), 33.8 (CH₂CO), 33.7 (C-6_{Glc}), 32.8 (CH₂S_{cist}), 31.2, 31.1 (2 CH₂CH₂CH₃), 28.9 (CH₂-2, CH₂-5), 27.6 (CMe₃), 26.4 (CH₂-3, CH₂-4), 24.3, 24.2 (2 CH₂CH₂CO), 22.2, 22.1 (2 CH₂CH₃), 13.2, 13.0 (2 CH₃).

Análisis elemental. Calculado para C₃₃₆H₆₁₆N₅₆O₉₈S₂₈; C, 51.04; H, 7.85; N, 9.92. Encontrado: C, 51.13; H, 7.85; N, 9.83.

Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-(N'-(6-(N'-(2-(N-[2-(*terc*-butoxicarbonilamino)etil]-N-[2-(N'-(α -D-manopiranosiloxietil)tioureido)etil)-tioureido)etil]aminoetil)tioureido)hexil)tioureido)etiltio)-2,3-di-O-hexanoil]ciclo-maltoheptaosa (93). Los grupos carbamato del compuesto **92** (37.8 mg, 4.8 μ mol) se hidrolizaron mediante el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose **93** puro. Rend.: 34.3 mg (99%). $[\alpha]_D = +29.0$ (*c* 0.2, MeOH).

¹H RMN (500 MHz, MeOD-D₂O 5:1, 323 K): $\delta = 5.33$ (sa, 7 H, H-3_{Glc}), 5.19 (sa, 7 H, H-1_{Glc}), 4.87 (sa, 7 H, H-1_{Man}), 4.85 (sa, 7 H, H-2_{Glc}), 4.19 (sa, 7 H, H-5_{Glc}), 4.03 (sa, 28 H, H-4_{Glc}, CH₂NH₂), 3.94 (m, 7 H, H-2_{Man}), 3.87 (m, 21 H, H-6a_{Man}, CH₂Oa), 3.75 (m, 84 H, H-3_{Man}, H-6b_{Man}, CH₂CH₂S_{Cist}, CH₂-1, CH₂-6, CH₂-8, CH₂-9, CH₂Ob, H-4_{Man}), 3.58 (m, 45 H, H-5_{Man}, CH₂CH₂O, CH₂CH₂NH₂), 3.46 (m, 28 H, CH₂-7, CH₂-10), 3.30 (m, 7 H, H-

6a_{Glc}), 3.17 (m, 7 H, H-6b_{Glc}), 2.94 (m, 14 H, CH₂S_{Cist}), 2.50-2.20 (m, 28 H, CH₂CO), 1.63 (m, 56 H, CH₂CH₂CO, CH₂-2, CH₂-5), 1.38 (m, 84 H, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂-3, CH₂-4), 0.94 (m, 42 H, CH₃).

¹³C RMN (125.7 MHz, MeOD, 323 K): δ = 183.0-181.0 (CS), 174.0, 171.0 (2 CO éster), 100.2 (C-1_{Man}), 96.9 (C-1_{Glc}), 79.0 (C-4_{Glc}), 75.0 (C-5_{Glc}), 73.2 (C-5_{Man}), 71.1 (C-3_{Man}), 70.6 (C-2_{Man}), 70.5 (C-3_{Glc}), 67.2 (C-4_{Man}, C-2_{Glc}), 65.9 (CH₂O), 61.3 (C-6_{Man}), 54.6 (CH₂-8, CH₂-9), 50.7 (CH₂CH₂NH₂), 44.4-44.0 (CH₂-1, CH₂-6, CH₂-7, CH₂-10, CH₂CH₂S_{Cist}), 39.2 (CH₂NH₂), 34.4 (CH₂CH₂O), 33.8 (CH₂CO, C-6_{Glc}), 33.0 (CH₂S_{Cist}), 31.2 (CH₂CH₂CH₃), 28.6 (CH₂-2, CH₂-5), 26.4 (CH₂-3, CH₂-4), 24.3, 24.2 (2 CH₂CH₂CO), 22.2 (CH₂CH₃), 13.5, 13.3 (2 CH₃).

EM (ESI): *m/z* 2401.2 [M + 3 H]³⁺, 1801.4 [M + 4 H]⁴⁺, 1442.1 [M + 5 H]⁵⁺.

Análisis elemental. Calculado para C₃₀₁H₅₆₇Cl₇N₅₆O₈₄S₂₈: C, 48.45; H, 7.66; N, 10.51.

Encontrado: C, 48.25; H, 7.43; N, 10.29.

Heptaquis[6-(2-(N'-((6-(N'-((2-(N-[2-(*terc*-butoxicarbonilamino)etil)-N-[2-(N'-((tris- α -D-manopiranosiloximetil)metiltioureido)etil)tioureido)etil]aminoetil)-tioureido)hexil)tioureido)etiltio)-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (94). A una disolución de heptahidrocloreuro de **122** (24 mg, 8.3 μ mol) y Et₃N (9 μ L, 64 μ mol, 1.1 eq.) en DMF (1 mL) se añadió una disolución de **91** (90 mg, 82 μ mol, 1.4 eq.) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 46 h, se eliminó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía de permeación sobre gel (Sephadex LH-20, MeOH). Rend.: 62.7 mg (72%). [α]_D = + 57.0 (c 0.64, MeOH).

¹H RMN (500 MHz, MeOD, 313 K): δ = 5.37 (m, 7 H, H-3_{Glc}), 5.20 (d, 7 H, H-1_{Glc}), 4.85 (m, 7 H, H-2_{Glc}), 4.83 (sa, 21 H, H-1_{Man}), 4.20 (m, 28 H, H-5_{Glc}, CH₂Oa), 4.06 (m, 21 H, CH₂Ob), 3.88 (m, 49 H, H-6a_{Man}, H-2_{Man}, H-4_{Glc}), 3.75 (m, 56 H, H-3_{Man}, H-6b_{Man}, CH₂CH₂S_{Cist}), 3.66 (m, 70 H, H-4_{Man}, H-5_{Man}, CH₂-7, CH₂-10), 3.49 (m, 28 H, CH₂-1, CH₂-6), 3.31 (m, 21 H, H-6a_{Glc}), 3.21 (m, 21 H, H-6b_{Glc}, CH₂NHBoc), 3.05-2.85 (m, 14 H, CH₂S_{cist}), 2.83 (m, 28 H, CH₂-8, CH₂-9), 2.74 (m, 14 H, CH₂CH₂NHBoc), 2.50-2.20 (m, 28 H, CH₂CO), 1.66 (m, 56 H, CH₂CH₂CO, CH₂-2, CH₂-5), 1.48 (s, 63 H, CMe₃),

1.41 (m, 84 H, CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, CH_2 -3, CH_2 -4), 0.96, 0.95 (2 t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, CH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 183.0$ - 180.0 (CS), 173.2, 171.6 (2 CO éster), 157.2 (CO carbamato), 101.0 (C-1_{Man}), 96.8 (C-1_{Glc}), 79.2 (CMe_3 , C-4_{Glc}), 73.5 (C-5_{Man}), 71.4 (C-5_{Glc}, C-3_{Man}), 70.6 (C-2_{Man}, C-3_{Glc}), 70.1 (C-2_{Glc}), 67.5 (C-4_{Man}), 66.2 (CH_2O), 61.6 (C-6_{Man}, C_q), 54.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 53.5, 53.2 (CH_2 -8, CH_2 -9), 44.6-44.1 (CH_2 -1, CH_2 -6, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCist}$), 42.5-41.5 (CH_2 -7, CH_2 -10), 38.4 (CH_2NHBoc), 33.8, 33.7 (CH_2CO , C-6_{Glc}), 32.8 (CH_2SCist), 31.2, 31.1 (2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 29.0, 28.8 (CH_2 -2, CH_2 -5), 27.5 (CMe_3), 26.3 (CH_2 -3, CH_2 -4), 24.2, 24.1 (2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 22.2, 22.1 (2 CH_2CH_3), 13.2, 13.1 (2 CH_3).

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{434}\text{H}_{784}\text{N}_{56}\text{O}_{182}\text{S}_{28}$; C, 49.19; H, 7.46; N, 7.40. Encontrado: C, 48.95; H, 7.29; N, 7.23.

Heptahidrocloruro de heptaquis[6-(2-(N' -(6-(N' -(2-(N -[2-aminoetil], N -[2-(N' -(tris- α -D-manopiranosiloximetil)metiltioureido)etil)tioureido)etil]aminoetil)-tioureido)hexil)tioureido)etiltio)-2,3-di- O -hexanoil]ciclomaltoheptaosa (95). Los grupos carbamato del compuesto **94** (25 mg, 2.36 μmol) se hidrolizaron mediante el procedimiento descrito en los métodos generales, obteniéndose el compuesto **95** puro. Rend.: 23.9 mg (99%). $[\alpha]_{\text{D}} = +37.4$ (c 0.17, H_2O).

^1H RMN (500 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 5.38$ (sa, 7 H, H-3_{Glc}), 5.20 (sa, 7 H, H-1_{Glc}), 4.86 (sa, 7 H, H-2_{Glc}), 4.83 (s, 7 H, H-1_{Man}), 4.19 (sa, 7 H, H-5_{Glc}), 4.17 (da, $J_{5-6a} = 5.4$ Hz, H-6a_{Man}), 4.05 (m, 21 H, H-4_{Glc}, CH_2NH_2), 3.88 (m, 63 H, H-2_{Man}, CH_2Oa , H-6b_{Man}), 3.72 (m, 126 H, H-3_{Man}, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCist}$, CH_2 -7, CH_2 -10, CH_2Ob , H-4_{Man}, H-5_{Man}), 3.48 (sa, 28 H, CH_2 -1, CH_2 -6), 3.26 (m, 14 H, H-6_{Glc}), 3.15 (ta, 14 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.05 (ta, 28 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, CH_2 -8, CH_2 -9), 2.95 (m, 14 H, CH_2SCist), 2.50-2.20 (m, 28 H, CH_2CO), 1.64 (m, 56 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$, CH_2 -2, CH_2 -5), 1.38 (m, 84 H, CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, CH_2 -3, CH_2 -4), 0.94 (m, 42 H, CH_3).

^{13}C RMN (125.7 MHz, MeOD, 323 K): $\delta = 185.0$ - 182.0 (CS), 174.7, 173.8 (2 CO éster), 102.5 (C-1_{Man}), 98.2 (C-1_{Glc}), 79.7 (C-4_{Glc}), 75.1 (C-5_{Man}), 73.6 (C-5_{Glc}), 72.8 (C-3_{Man}),

72.0 (C-2_{Man}), 71.7 (C-3_{Glc}), 69.0 (C-4_{Man}), 67.6 (CH₂O, C-2_{Glc}), 63.1 (C-6_{Man}), 62.6 (C_q), 55.2, 54.8 (CH₂-8, CH₂-9), 49.7 (CH₂CH₂NH₂), 45.4 (CH₂-1, CH₂-6, CH₂-7, CH₂-10), 42.4 (CH₂CH₂S_{Cist}), 38.1 (CH₂NH₂), 34.1 (C-6_{Glc}), 32.5 33.8 (CH₂S_{Cist}), 31.9 (CH₂CO), 30.2 (CH₂CH₂CO, CH₂-2, CH₂-5), 27.6 (CH₂-3, CH₂-4), 25.6 (CH₂CH₂CH₃), 23.5 (CH₂CH₃), 14.3 (2 CH₃).

Análisis elemental. Calculado para C₃₉₉H₇₃₅Cl₇N₅₆O₁₆₈S₂₈; C, 47.21; H, 7.30; N, 7.73; S, 8.84. Encontrado: C, 46.99; H, 7.01; N, 7.46; S, 8.47.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. Bibliografía

- ¹ (a) A. Villiers *Compt. Rend.* **1891**, *112*, 412-437. (b) A. Villiers *Compt. Rend.* **1891**, *112*, 536-538.
- ² (a) F. Schardinger *Unters. Nahr. Genussm.* **1903**, *6*, 865-880. (b) F. Schardinger *Wiener Klin. Wochenschr.* **1904**, *17*, 207-209. (c) F. Schardinger *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Abt. II* **1905**, *14*, 772-781. (d) F. Schardinger *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Abt. II* **1911**, *29*, 188-197.
- ³ J. Szejtli *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1753.
- ⁴ *Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications* (Ed.: H. Dodziuk), WILEY-VCH, Weinheim, **2006**.
- ⁵ K. Freudenberg, F. Cramer, H. Plieninger *German Pat.* 895,769 (**1953**).
- ⁶ M. E. Davis, M. E. Brewster *Nature Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 1023-1035.
- ⁷ (a) J. Li, X. J. Loh *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1000-1017. (b) K. Cal, K. Centkowska *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 467-478. (c) R. L. Carrier, L. A. Miller, I. Ahmed *J. Control. Rel.* **2007**, *123*, 78-99. (d) R. G. Strickley *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 201-230.
- ⁸ H. J. Bushmann, E. Schollmeyer *J. Cosmetic Sci.* **2002**, *53*, 185-191.
- ⁹ E. M. Martín del Valle *Proc. Biochem.* **2004**, *39*, 1033-1046.
- ¹⁰ (a) L. Szenté, J. Szejtli *Trends Food Sci. Tech.* **2004**, *15*, 137-142. (b) G. Astray, C. González-Barreiro, J. C. Mejuto, R. Rial-Otero, J. Simal-Gándar *Food Hydrocol.* **2009**, *23*, 1631-1640.
- ¹¹ (a) Z. Li, M. Wang, F. Wang, Z. Gu, G. Du, J. Wu, J. Chen *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *77*, 245-255 (b) M. Singh, R. Sharma, U. C. Banerjee *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 341-359.
- ¹² (a) S. A. Nepogodiev, J. F. Stoddart *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1959-1976. (b) A. Harada *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 456-464.
- ¹³ G. Wenz, B.-H. Han, A. Müller *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 782-817.
- ¹⁴ D. J. Ahn, J. M. Kim *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 805-816.
- ¹⁵ E. Engeldinger, D. Armspach, D. Matt *Chem. Rev.*, **2003**, *103*, 4147-4174.
- ¹⁶ (a) D. M. Vriezema, M. C. Aragones, J. A. A. W. Elemans, J. J. L. M. Cornelissen, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1445-1489. (b) K. Takahashi *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2013-2033.

- ¹⁷ (a) R. Villalonga, R. Cao, A. Fragoso *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3088-3116. (b) J. Bjerre, C. Rousseau, L. Marinescu, M. Bols *App. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 1-11.
- ¹⁸ K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045-2076.
- ¹⁹ (a) K.-H. Frömring, en *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 3 (Eds.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. C. McNicol, F. Vögtle) Pergamon, Oxford, **1996**, pp. 57-188. (b) T. Loftsson, M. E. Brewster *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1017-1025. (c) J. Szejtli *Med. Res. Rev.* **1994**, *14*, 353-386. (d) G. Wenz *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 803-822. (e) T. Loftsson, D. Duchêne *Int. J. Pharm.* **2007**, *329*, 1-11.
- ²⁰ (a) *Cyclodextrin Technology* (Ed.: J. Szejtli) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1988**. (b) *Cyclodextrins in Pharmacy* (Eds.: K.-H. Frömring, J. Szejtli) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1994**.
- ²¹ (a) T. Nagai, H. Ueda, en *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 3 (Eds.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. C. McNicol, F. Vögtle), Pergamon, Oxford, **1996**, pp. 441-450. 441-450. (b) K. Uekama, T. Irie, en *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 3 (Eds.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. C. McNicol, F. Vögtle), Pergamon, Oxford, **1996**, 451-481. (c) K. Uekama, F. Hirayama, F. Arima *J. Inclus. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2006**, *56*, 3-8.
- ²² J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, J. Defaye *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2006**, *56*, 149-159.
- ²³ A. Vargas-Berenguel, F. Ortega-Caballero, J. M. Casas-Solva *Mini Rev. Org. Synthesis* **2007**, *4*, 1-14.
- ²⁴ C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1982-1990.
- ²⁵ J. M. Benito, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, I. Baussanne, J. Defaye, J. M. García Fernández *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10355-10363.
- ²⁶ A. R. Khan, P. Forgo, K. J. Stine, V. T. D'Souza *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977-1996.
- ²⁷ C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, J. M. García Fernández, H. Law, K. Chmurski, J. Defaye, M. L. O'Sullivan, H. N. Caro *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2523-2531.
- ²⁸ M. Gómez-García, J. M. Benito, D. Rodríguez-Lucena, J.-X. Yu, K. Chmurski, C. Ortiz Mellet, R. Gutiérrez Gallego, A. Maestre, J. Defaye, J. M. García Fernández *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7970-7971.

- ²⁹ (a) F. G. Calvo-Flores, J. Isac-García, F. Hernández-Mateo, F. Pérez-Balderas, J. A. Calvo-Asín, E. Sánchez-Vaquero, F. Santoyo-González *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2499-2502. (b) D. A. Fulton, J. F. Stoddart *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1113-1116.
- ³⁰ N. Qvit, H. Reuveni, S. Gazal, A. Zundevich, G. Blum, M. Y. Niv, A. Feldstein, S. Meushar, D. E. Shalev, A. Friedler, C. Gilon *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 256-266.
- ³¹ L. Baldini, A. Casnati, F. Sansone, R. Ungaro *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 254-266.
- ³² S. André, F. Sansone, H. Kaltner, A. Casnati, J. Kopitz, H.-J. Gabius, R. Ungaro *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1649-1661.
- ³³ V. Wittmann, S. Seeberger *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 900-903.
- ³⁴ S. Horiuchi, Y. Aoyama *J. Control. Rel.* **2006**, *116*, 107-114.
- ³⁵ Y. Aoyama *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 588-593.
- ³⁶ V. Bagnacani, F. Sansone, G. Donofrio, L. Baldini, A. Casnati, R. Ungaro *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3953-3956.
- ³⁷ K. Matsui, S. Horiuchi, S. Sando, T. Sera, Y. Aoyama *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 132-138.
- ³⁸ (a) M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Perez-Balderas, F. Hernández-Mateo, M. D. Girón-González, N. Sevillano-Tripero, R. Salto-González, F. Santoyo-González *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2291-2301. (b) S. André, H. Kaltner, T. Furuike, S.-I. Nishimura, H.-J. Gabius *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 87-98.
- ³⁹ J. J. García-López, F. Hernández-Mateo, J. Isac-García, J. M. Kim, R. Roy, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 522-531. (b) F. Pérez-Balderas, M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernández-Mateo, F. G. Calvo-Flores, J. A. Calvo-Asín, J. Isac-García, F. Santoyo-González *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1951-1954.
- ⁴⁰ (a) F. Ortega-Caballero, J. J. Giménez-Martínez, L. García-Fuentes, E. Ortiz-Salmerón, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7786-7795. (b) N. Jayaraman, J. F. Stoddart *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6767-6770. (c) A. Vargas-Berenguel, F. Ortega-Caballero, F. Santoyo-González, J. J. García-López, J. J. Giménez-Martínez, L. García-Fuentes, E. Ortiz-Salmerón *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 812-827.
- ⁴¹ W. B. Turnbull, J. F. Stoddart *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 231-255.
- ⁴² (a) R. Hoogenboom, B. C. Moore, U. S. Schubert *Chem. Commun.* **2006**, 4010-4012. (b) C. Yang, H. Li, S. H. Goh, J. Li *Biomaterials* **2007**, *28*, 3245-3254.

- ⁴³ (a) D. A. Fulton, J. F. Stoddart *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 655-672. (b) B. T. Houseman, M. Mrksich *Top. Curr. Chem.* **2002**, *218*, 1-44.
- ⁴⁴ (a) N. Smiljanic, V. Moreau, D. Yockot, J. M. Benito, J. M. García Fernández, F. Djedaïni-Pilard *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5465-5468. (b) L. Zhang, Y. Wu, L. Brunsveld *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1798-1802.
- ⁴⁵ (a) F. Guillier, D. Orain, M. Bradley *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157. (b) P. Blaney, R. Grigg, V. Sridharan *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2607-2624.
- ⁴⁶ R. J. Collier, J. A. Young *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2003**, *19*, 45-70.
- ⁴⁷ M. A. Mintzer, E. E. Simanek *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259-302.
- ⁴⁸ D. A. Tomalia *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 294-324.
- ⁴⁹ C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. J. Fréchet, F. C. Szoka *Nature Biotechnol.* **2005**, *23*, 1517-1526.
- ⁵⁰ (a) C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling *Science* **2001**, *291*, 2357-2364. (b) K. M. Koeller, C.-H. Wong *Nature Biotechnol.* **2000**, *18*, 835-841. (c) P. Sears, C.-H. Wong *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1875-1917. (d) R. S. Singh, A. K. Tiwary, J. F. Kennedy *Crit. Rev. Biotechnol.* **1999**, *19*, 145-178. (e) H. Lis, N. Sharon *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674. (f) R. Dwek *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- ⁵¹ D. M. Ratner, E. W. Adams, M. D. Disney, P. H. Seeberger *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1375-1383.
- ⁵² J. J. Lundquist, E. J. Toone *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.
- ⁵³ (a) R. T. Lee, Y. C. Lee *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 543-551. (b) M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.
- ⁵⁴ R. T. Lee, Y. C. Lee *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327.
- ⁵⁵ (a) J. E. Getwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933. (b) C. W. Cairo, J. E. Getwicki, M. Kanai, L. L. Kiessling *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1615-1619.
- ⁵⁶ E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663-2664.
- ⁵⁷ P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle *Nature* **2000**, *403*, 669-672.
- ⁵⁸ S.-K. Choi en *Synthetic Multivalent Molecules: Concepts and Biomedical Applications* (Ed. S.-K. Choi) John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, **2004**.

- ⁵⁹ J. M. Casas-Solvas, E. Ortiz-Salmeron, I. Fernández, L. García-Fuentes, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 8146-8162.
- ⁶⁰ Para un ejemplo pionero en la funcionalización selectiva de CDs, ver: A. Ueno, R. Breslow *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3451-3454.
- ⁶¹ (a) A. J. Pearce, P. Sinay *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3610-3612. (b) T. Lecourt, A. J. Pearce, A. Herault, M. Sollogoub, P. Sinay *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2960-2971. (c) P. Balbuena, D. Lesur, M. J. G. Álvarez, F. Mendicuti, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández *Chem. Commun.* **2007**, 3270-3272. (e) S. Guieu, M. Sollogoub *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2819-2828.
- ⁶² I. Baussanne, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, H. Law, J. Defaye *Chem. Commun.* **2000**, 1489-1490.
- ⁶³ C. Byrne, F. Sallas, D. K. Rai, J. Ogier, R. Darcy *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3763-3771.
- ⁶⁴ (a) R. B. Merrifield *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154. (b) R. B. Merrifield *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801-812. (c) R. B. Merrifield en *Life During a Golden Age of Peptide Chemistry* (Ed.: J. I. Seeman), Profiles, Pathways and Dreams: Autobiographies of Eminent Chemists, American Chemical Society, Washington, DC, **1993**.
- ⁶⁵ (a) A. Kirschning, H. Monenschein, R. Wittenberg *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 650-679. (b) S. V. Ley, I. R. Baxendale, R. N. Bream, P. S. Jackson, A. G. Leach, D. A. Longbottom, M. Nesi, J. S. Scott, R. I. Storer, S. J. Taylor *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 3815-4195. (c) D. H. Drewry, D. M. Coe, S. Poon *Med. Res. Rev.* **1999**, *19*, 97-148. (d) S. V. Ley, I. R. Baxendale *Nature Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 573-586.
- ⁶⁶ (a) Immobilized Catalysts (Ed.: A. Kirschning) *Top. Curr. Chem.* **2004**, Vol. 242. (b) W. Solodenko, Y. Frenzel, A. Kirschning en *Polymeric Materials in Organic Synthesis and Catalysis* (Ed.: M. R. Buchmeiser), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, pp. 201-240. (c) C. A. McNamara, M. J. Dixon, M. Bradley *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3275-3300.
- ⁶⁷ C. C. Leznoff *Chem. Soc. Rev.* **1974**, *3*, 65-85.
- ⁶⁸ A. Kirschning, H. Monenschein, R. Wittenberg *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 4445-4450.
- ⁶⁹ (a) I. R. Baxendale, S. V. Ley, C. D. Smith, G. K. Tranmer *Chem. Commun.* **2006**, 4835-4837. (b) C. D. Smith, I. R. Baxendale, G. K. Tranmer, M. Baumann, S. C. Smith, R. A. Lewthwaite, S. V. Ley *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1562-1568.

- ⁷⁰ (a) I. R. Baxendale, J. Deeley, C. M. Griffiths-Jones, S. V. Ley, S. Saaby, G. K. Tranmer *Chem. Commun.* **2006**, 2566-2568. (b) R. I. Storer, T. Takemoto, P. S. J. Jackson, D. S. Brown, I. R. Baxendale, S. V. Ley *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2529-2547.
- ⁷¹ (a) J. Katajisto, T. Karskela, P. Heinonen, H. Lönnberg *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7995-8001. (b) V. Duléry, O. Renaudet, M. Wilczewski, A. Van der Heyden, P. Labbé, P. Dumy *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 368-371.
- ⁷² G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 636-637.
- ⁷³ (a) E. Flanigan, G. R. Marshall *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 2403-2406. (b) M. Rothe, A. Sander, W. Fischer, W. Mästle, B. Nelson en *Peptides: Proceedings of the 5th American Peptide Symposium*, (M. Goodman, J. Meienhofer, Eds.), John Wiley and Sons, New York, **1977**, pp 506-509. (c) B. A. Dressman, U. Singh, S. W. Kaldor *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3631-3634. (d) A. Chucholowski, T. Masquelin, D. Obrecht, J. Stadlwieser, J. M. Villalgordo *Chimia* **1996**, *50*, 525-530. (e) L. M. Gayo, M. J. Suto *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 211-214.
- ⁷⁴ M. Patek, M. Lebl *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3891-3894.
- ⁷⁵ R. S. Rock, S. I. Chan *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1526-1529.
- ⁷⁶ A. Routledge, C. Abell, S. Balasubramanian *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1227-1230.
- ⁷⁷ (a) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, A. J. Roecker, G.-Q. Cao, S. Barluenga, H. J. Mitchell *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9939-9953. (b) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, S. Barluenga, G.-Q. Cao, R. L. Affleck, J. E. Lillig *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9954-9967. (c) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, S. Barluenga, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, G.-Q. Cao *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9968-9976.
- ⁷⁸ D. A. Horton, R. Severinsen, M. Kofod-Hansen, G. T. Bourne, M. L. Smythe *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 421-435.
- ⁷⁹ B. J. Backes, J. A. Ellman *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322-2330.
- ⁸⁰ B. J. Backes, A. A. Virgilio, J. A. Ellman *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3055-3056.
- ⁸¹ P. Heidler, A. Link *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 585-599.
- ⁸² L. Yang, G. Morriello *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8197-8200.
- ⁸³ R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori, A. Pessi *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11369-11374.
- ⁸⁴ P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- ⁸⁵ J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6851-6855.

- ⁸⁶ (a) Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. H. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11684-11689. (b) H. C. Hang, C. R. Bertozzi *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 727-736.
- ⁸⁷ D. Macmillan, C. R. Bertozzi *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1355-1359. (b) D. Macmillan, A. M. Daines, M. Bayrhuber, S. L. Flitsch *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1467-1470.
- ⁸⁸ (a) C. Piontek, P. Ring, O. Harjes, C. Heinlein, S. Mezzato, N. Lombana, C. Pöhner, M. Puettner, D. Varón Silva, A. Martin, F. X. Schmid, C. Unverzagt *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1936-1940. (b) C. Piontek, D. Varón Silva, C. Heinlein, C. Pöhner, S. Mezzato, P. Ring, A. Martin, F. X. Schmid, C. Unverzagt *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1941-1945.
- ⁸⁹ T. Kanemitsu, C.-H. Wong, O. Kanie *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3591-3599.
- ⁹⁰ (a) L. C. Cooper, G. G. Chicchi, K. Dinnell, J. M. Elliott, G. J. Hollingworth, M. M. Kurtz, K. L. Locker, D. Morrison, D. E. Shaw, K.-L. Tsao, A. P. Watt, A. R. Williams, C. J. Swain *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1233-1236. (b) C. A. Willoughby, S. C. Berk, K. G. Rosauer, S. Degrado, K. T. Chapman, S. L. Gould, M. S. Springer, L. Malkowitz, W. A. Schleif, D. Hazuda, M. Miller, J. Kessler, R. Danzeisen, K. Holmes, J. Lineberger, A. Carella, G. Carver, E. A. Emini *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 3137-3141. (c) D. Fattori, P. D'Andrea, M. Porcelloni *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 811-814.
- ⁹¹ (a) J. M. Palomo, M. Lumbierres, H. Waldmann *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 477-481. (b) L. Bourel-Bonnet, K. V. Rao, M. T. Hamann, A. Ganesan *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1330-1335.
- ⁹² M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schröder, L. Soullère, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830-5834.
- ⁹³ M.-r. Lee, D.-W. Jung, D. Williams, I. Shin *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5477-5480.
- ⁹⁴ (a) A. Golisade, C. Herforth, L. Quirijnen, L. Maes, A. Link *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 159-165. (b) C. Herforth, J. Wiesner, S. Franke, A. Golisade, H. Jomaa, A. Link *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 302-314. (c) C. Herforth, J. Wiesner, P. Heidler, S. Sanderbrand, S. van Calenbergh, H. Jomaa, A. Link *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 755-762. (d) A. Golisade, J. C. Bressi, S. van Calenbergh, M. H. Gelb, A. Link *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 537-544. (e) A. Golisade, S. van Calenbergh, A. Link *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3167-3172. (f) J. C. Bressi, C. L. Verlinde, A. M. Aronov, M. L. Shaw, S. S. Shin, L. N. Nguyen, S. Suresh, F. S. Buckner, W. C. van Voorhis, I. D. Kuntz, W. G. Hol, M. H. Gelb *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2080-2093. (g) S. van Calenbergh, A. Link, S.

- Fujikawa, R. A. de Ligt, V. Vanheusden, A. Golisade, N. M. Blaton, J. Rozenski, A. P. IJzerman, P. Herdewijn *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1845-1852.
- ⁹⁵ P. R. Ashton, E. F. Hounsell, N. Jayaraman, T. M. Nielsen, N. Spencer, J. F. Stoddart, M. Young *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3429-3437.
- ⁹⁶ P. R. Ashton, E. F. Hounsell, N. Jayaraman, S. A. Nepogodiev, J. F. Stoddart *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1115-1128.
- ⁹⁷ (a) S. J. Atkinson, V.-J. Ellis, S. E. Boyd, C. L. Brown *New J. Chem.* **2007**, *31*, 155-162. (b) A. V. Ambade, A. Kumar *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 5134-5145.
- ⁹⁸ Y. Ichikawa, T. Nishiyama, M. Isobe *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4200-4205.
- ⁹⁹ H.-J. Knölker, T. Braxmeier, G. Schlechtingen *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2497-2500.
- ¹⁰⁰ M. Bartra, P. Romea, F. Urpí, J. Villarasa *Tetrahedron* **1990**, *46*, 587-594.
- ¹⁰¹ (a) J. Ø. Duus, M. Meldal, J. R. Winkler *J. Phys. Chem.* **1998**, *104*, 6413-6418. (b) J. M. Benito, M. Meldal *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 117-129.
- ¹⁰² Ejemplos seleccionados de medidas de afinidad por lectinas mediante ELLA: (a) J. B. Corbell, J. J. Lundquist, E. Toone *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 95-111. (b) D. Pagé, R. Roy *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 345-356.
- ¹⁰³ (a) P. Ascenzi, P. Visca, G. Ippolito, A. Spallarossa, M. Bolognesi, C. Montecucco *FEBS Lett.* **2002**, *531*, 384-88. (b) *Anthrax* (Ed. T. M. Koehler), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2002**, *271*, Springer: New York. (c) M. Mourez, D. B. Lacy, K. Cunningham, R. Legmann, B. R. Sellman, J. Mogridge, R. J. Collier *Trends Microbiol.* **2002**, *10*, 287-93. (d) K. Sandvig, B. van Deurs *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2002**, *18*, 1-24.
- ¹⁰⁴ J. G. Bartlett, T. V. Inglesby Jr., L. Borio *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *35*, 851-858.
- ¹⁰⁵ C. Guidi-Rontani, M. Mock *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2002**, *271*, 115-141.
- ¹⁰⁶ B. D. Green, L. Battisti, T. M. Koehler, C. B. Thorne, B. E. Ivins *Infect. Immun.* **1985**, *49*, 291-297.
- ¹⁰⁷ (a) H. Smith *Trends Microbiol.* **2000**, *8*, 199-200. (b) H. Smith, H. B. Stoner *Fed. Proc.* **1967**, *26*, 1554-1557.
- ¹⁰⁸ M. Mock, A. Fouet *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, *55*, 647-671.
- ¹⁰⁹ P. H. Gilligan *Curr. Opin. Microbiol.* **2002**, *5*, 489-495.
- ¹¹⁰ S. H. Leppla, J. B. Robbins, R. Schneerson, J. Shiloach *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 141-144.

- ¹¹¹ A. E. Clatworthy, E. Pierson, D. T. Hung *Nature Chem. Biol.* **2007**, *3*, 541-548.
- ¹¹² S. H. Leppla *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 3162-3166.
- ¹¹³ D. Chin, A. R. Means *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 322-328.
- ¹¹⁴ N. Ahuja, P. Kumar, R. Bhatnagar *Crit. Rev. Microbiol.* **2004**, *30*, 187-196.
- ¹¹⁵ S. H. Leppla en *Bacterial Protein Toxins* (Eds.: K. Aktories, I. Just) Springer, Berlin, **2002**, pp. 445-472.
- ¹¹⁶ (a) G. Vitale, R. Pellizzari, C. Recchi, G. Napolitani, M. Mock, C. Montecucco *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *248*, 706-711. (b) R. Pellizzari, C. Guidi-Rontani, G. Vitale, M. Mock, C. Montecucco *FEBS Lett.* **1999**, *462*, 199-204.
- ¹¹⁷ M. Moayeri, D. Haines, H. A. Young, S. H. Leppla *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 670-682.
- ¹¹⁸ J. M. Park, F. R. Greten, Z.-W. Li, M. Karin *Science* **2002**, *297*, 2048-2051.
- ¹¹⁹ (a) J. A. T. Young, R. J. Collier *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 243-265. (b) L. Abrami, S. Liu, P. Cosson, S. H. Leppla, F. G. van der Goot *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 321-328.
- ¹²⁰ El subíndice hace referencia al peso molecular del antígeno protector.
- ¹²¹ K. A. Bradley, J. Mogridge, M. Mourez, R. J. Collier, J. A. T. Young *Nature* **2001**, *414*, 225-229. (b) H. M. Scobie, G. J. A. Rainey, K. A. Bradley, J. A. T. Young *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5170-5174.
- ¹²² (a) V. Escuyer, R. J. Collier *Infect. Immun.* **1991**, *59*, 3381-3386. (b) A. M. Friedlander, R. Bhatnagar, S. H. Leppla, L. Johnson, Y. Singh *Infect. Immun.* **1993**, *61*, 245-252.
- ¹²³ D. B. Lacy, D. J. Wigelsworth, R. A. Melnyk, S. C. Harrison, R. J. Collier *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13147-13151. (b) J. Mogridge, M. Mourez, R. J. Collier *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2111-2116.
- ¹²⁴ (a) E. L. Benson, P. D. Huynh, A. Finkelstein, R. J. Collier *Biochemistry* **1998**, *37*, 3941-3948. (b) M. Qa'dan, K. A. Christensen, L. Zhang, T. M. Roberts, R. J. Collier *Mol. Cell Biol.* **2005**, *25*, 5492-5498.
- ¹²⁵ J. Mogridge, K. Cunningham, R. J. Collier *Biochemistry* **2002**, *41*, 1079-1082.
- ¹²⁶ <http://www.biologie.uni-hamburg.de/lehre/bza/molnews/anthrax/anthrax.htm>
- ¹²⁷ J. Wesche, J. L. Elliott, P. Ø. Falnes, S. Olsnes, R. J. Collier *Biochemistry* **1998**, *37*, 15737-15746.
- ¹²⁸ (a) G. J. A. Rainey, J. A. T. Young *Nature Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 721-726. (b) B. E. Turk *Biochem. J.* **2007**, *402*, 405-417.

- ¹²⁹ R. Sawada-Hirai, I. Jiang, F. Wang, S. M. Sun, R. Nedellec, P. Ruther, A. Álvarez, D. Millis, P. R. Morrow, A. S. Kang *J. Imm. Based Ther. Vaccines* **2004**, 2, 5.
- ¹³⁰ M. S. Sarac, J. R. Peinado, S. H. Leppla, I. Lindberg *Infect. Immunol.* **2004**, 72, 602-605.
- ¹³¹ M. Mourez, R. S. Kane, J. Mogridge, S. Metallo, P. Deschatelets, B. R. Sellman, G. M. Whitesides, R. J. Collier *Nature Biotechnol.* **2001**, 19, 958-961.
- ¹³² P. Zhao, X. Liang, J. Kalbfleisch, H.-M. Koo, B. Cao *Hum. Antibodies* **2003**, 12, 129-135.
- ¹³³ B. R. Sellman, M. Mourez, R. J. Collier *Science* **2001**, 292, 695-697.
- ¹³⁴ B. A. Krantz, R. A. Melnyk, S. Zhang, S. J. Juris, D. B. Lacy, Z. Wu, A. Finkelstein, R. J. Collier *Science* **2005**, 309, 777-781.
- ¹³⁵ J. C. Burnett, E. A. Henchal, A. L. Schmaljohn, S. Bavari *Nature Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 281-297.
- ¹³⁶ B. E. Turk, T. Y. Wong, R. Schwarzenbacher, E. T. Jarrell, S. H. Leppla, R. J. Collier, R. C. Liddington, L. C. Cantley *Nature Struct. Mol. Biol.* **2004**, 11, 60-66.
- ¹³⁷ R. G. Panchal, A. R. Hermone, T. L. Nguyen, T. Y. Wong, R. Schwarzenbacher, J. Schmidt, D. Lane, C. McGrath, B. E. Turk, J. Burnett, M. J. Aman, S. Little, E. A. Sausville, D. W. Zaharevitz, L. C. Cantley, R. C. Liddington, R. Gussio, S. Bavari *Nature Struct. Mol. Biol.* **2004**, 11, 67-72.
- ¹³⁸ D. H. Min, W.-J. Tang, M. Mrksich *Nature Biotechnol.* **2004**, 22, 717-723.
- ¹³⁹ I. Dell'Aica, M. Donà, F. Tonello, A. Piris, M. Mock, C. Montecucco, S. Garbisa *EMBO Rep.* **2004**, 5, 418-422.
- ¹⁴⁰ S. Soelaiman, B. Q. Wei, P. Bergson, Y.-S. Lee, Y. Shen, M. Mrksich, B. K. Shoichet, W.-J. Tang *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 25990-25997.
- ¹⁴¹ Y. Shen, N. L. Zhukovskaya, M. I. Zimmer, S. Soelaiman, P. Bergson, C.-R. Wang, C. S. Gibbs, W.-J. Tang *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 3242-3247.
- ¹⁴² W. L. Shoop, Y. Xiong, J. Wiltsie, A. Woods, J. Guo, J. V. Pivnichny, T. Felcetto, B. F. Michael, A. Bansal, R. T. Cummings, B. R. Cunningham, A. M. Friedlander, C. M. Douglas, S. B. Patel, D. Wisniewski, G. Scapin, S. P. Salowe, D. M. Zaller, K. T. Chapman, E. M. Scolnick, D. M. Schmatz, K. Bartizal, M. MacCoss, J. D. Hermes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 7958-7963.
- ¹⁴³ M. R. González, M. Bischofberger, L. Pernot, F. G. van der Goot, B. Frêche *Cell Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 493-507.

- ¹⁴⁴ Normalmente simetría de orden 5-8, aunque en algunos casos, como el de la pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*, puede llegar a 40.
- ¹⁴⁵ Z. I. Andreeva-Zovalevskaya, A. S. Solonin, E. V. Sineva, V. I. Ternovsky *Biochemistry (Moscow)* **2008**, *73*, 1473-1492.
- ¹⁴⁶ (a) J. J. Lundquist, E. J. Toone *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578. (b) L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2408-2429.
- ¹⁴⁷ (a) D. Vance, M. Shah, A. Joshi, R. S. Kane *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101*, 429-434. (b) A. Joshi, D. Vance, P. Rai, A. Thiagarajan, R. S. Kane *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7738-7747.
- ¹⁴⁸ S. Basha, P. Rai, V. Poon, A. Saraph, K. Gujraty, M. Y. Go, S. Sadacharan, M. Frost, J. Mogridge, R. S. Kane *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13509-13513. (b) K. V. Gujraty, A. Joshi, A. Saraph, V. Poon, J. Mogridge, R. S. Kane *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2082-2085. (c) A. Joshi, A. Saraph, V. Poon, J. Mogridge, R. S. Kane *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1265-1269.
- ¹⁴⁹ (a) P. Rai, C. Padala, V. Poon, A. Saraph, S. Basha, S. Kate, K. Tao, J. Mogridge, R. S. Kane *Nature Biotechnol.* **2006**, *24*, 582-586. (b) P. R. Rai, A. Saraph, R. Ashton, V. Poon, J. Mogridge, R. S. Kane *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2207-2209.
- ¹⁵⁰ (a) P. Neri, S.-I. Nagano, S.-i. Yokoyama, H. Dohi, K. Kobayashi, T. Miura, T. Inazu, T. Sugiyama, Y. Nishida, H. Mori *Microbiol. Immunol.* **2007**, *51*, 581-592. (b) B. D. Polizzotti, R. Maheshwari, J. Vinkenburg, K. L. Kiick *Macromolecules* **2007**, *40*, 7103-7110.
- ¹⁵¹ B. Helms, E. W. Meijer *Science* **2006**, *313*, 929-930.
- ¹⁵² D. J. Manayani, D. Thomas, K. A. Dryden, V. Reddy, M. E. Siladi, J. M. Marlett, G. J. A. Rainey, M. E. Pique, H. M. Scobie, M. Yeager, J. A. T. Young, M. Manchester, A. Schneemann *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, 1422-1431.
- ¹⁵³ (a) V. A. Karginov, E. M. Nesterovich, M. Moayery, S. H. Leppla, S. M. Bezrukov *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *102*, 15075-15080.
- ¹⁵⁴ V. A. Karginov, A. Yohannes, T. M. Robinson, N. E. Fahmi, K. Alibekc, S. M. Hecht *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *14*, 33-40.
- ¹⁵⁵ V. A. Karginov, T. M. Robinson, J. Riemenschenider, B. Golding, M. Kennedy, J. Shiloach, K. Alibekc *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2004**, *40*, 71-74.
- ¹⁵⁶ La reacción de formación de tioureas a partir de un isotiocianato y una amina cumple los requisitos más importantes para ser considerada con una de las estrategias más versátiles dentro de las denominadas metodologías de la “química click”. La reacción de formación de tioureas

transcurre con rendimientos altos. Puede llevarse a cabo a partir de reactivos fácilmente asequibles sin restricciones en cuanto al uso de disolventes en condiciones suaves sin originar productos secundarios. Además, la unión tiourea es bio-compatible y fisiológicamente estable.

- ¹⁵⁷ A. Gabelle, J. Defaye *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 78-80.
- ¹⁵⁸ S. Srinivasachari, K. M. Fichter, T. M. Reineke *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4618-4627.
- ¹⁵⁹ D. C. Turner, L. Brand *Biochemistry* **1968**, *7*, 3381-3390.
- ¹⁶⁰ M. V. Rekharsky, Y. Inoue *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875-1918.
- ¹⁶¹ The Development of Human Gene Therapy (Ed.: T. Friedman) Cold Spring Harbor Lab. Press, Nueva York, **1999**.
- ¹⁶² S. A. Rosenberg, P. Aebersold, K. Cornetta, A; Kasid, R. A. Morgan, R. Moen, E. M. Karson, M. T. Lotze, J. C. Yang, S. L. Topalian, M. J. Merino, K. Culver, A. D. Miller, R. M. Blaese, W. F. Anderson *N. Engl. J. Med.* **1990**, *323*, 570-578.
- ¹⁶³ C. Uherek, W. Wels *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *44*, 153-166.
- ¹⁶⁴ S. T. Crooke *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1489*, 31-43.
- ¹⁶⁵ R. A. Stull, F. C. Szoka, Jr. *Pharm Res.* **1995**, *12*, 465-483.
- ¹⁶⁶ S. Akhtar, M. D. Hughes, A. Khan, M. Bibby, M. Hussain, Q. Nawaz, J. Double, P. Sayyed *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *44*, 3-21.
- ¹⁶⁷ S. D. Jayasena *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628-1650.
- ¹⁶⁸ <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>
- ¹⁶⁹ S. D. Patil, D. J. Burgess *AAPS Newsmagazine* **2003**, *6*, 27.
- ¹⁷⁰ S. D. Patil, D. G. Rhodes, D. J. Burgess *AAPS J.* **2005**, *7*, E61-E77.
- ¹⁷¹ R. Niven, R. Pearlman, T. Wedeking, J. Mackeigan, P. Noker, L. Simpson-Herren, J. G. Smith *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 1292-1299.
- ¹⁷² R. M. Bennett *Antisense Res. Dev.* **1993**, *3*, 235-241.
- ¹⁷³ S. C. De Smedt, J. Demeester, W. E. Hennink *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 113-126.
- ¹⁷⁴ S. Mehier-Humbert, R. H. Guy *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 733-753.
- ¹⁷⁵ D. V. McAllister, M. G. Allen, M. R. Prausnitz *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2000**, *2*, 289-313.
- ¹⁷⁶ L. Huang, E. Viroonchatapan, en *Nonviral Vectors for Gene Therapy* (Eds.: L. Huang, M.-C. Hung, E. Wagner) Academic Press, San Diego, **1999**, pp 3-22.
- ¹⁷⁷ S. Agrawal, R. Zhang, en *Oligonucleotides as Therapeutic Agents*, (Ciba Foundation Symposium, Vol. 209) Wiley, Weinheim, **1997**, 209 60-78.

- ¹⁷⁸ (a) C. M. Newman, A. Lawrie, A. F. Briskin, D. C. Cumberland *Echocardiography* **2001**, *18*, 339-347. (b) P. G. Amabile, J. M. Waugh, T. N. Lewis, C. J. Elkins, W. Janas, M. D. Dake *J. Am. Coll. Cardiol.* **2001**, *37*, 1975-1980. (c) A. M. Bodles-Brakhop, R. Heller, R. Draghia-Akli *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 585-592.
- ¹⁷⁹ (a) T. Suda, X. Gao, D. B. Stolz, D. Liu *Gene Ther.* **2007**, *14*, 129-137. (b) T. Suda, D. Liu *Mol. Ther.* **2007**, *15*, 2063-2069.
- ¹⁸⁰ J. J. Drabick, J. Glasspool-Malone, S. Somiari, A. King, R. W. Malone *Mol. Ther.* **2001**, *3*, 249-255.
- ¹⁸¹ A. El-Aneed *J. Control. Rel.* **2004**, *94*, 1-14.
- ¹⁸² (a) H. Kamiya, H. Tsuchiya, J. Yamazaki, H. Harashima *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *52*, 153-164. (b) C. Mah, B. J. Byrne, T. R. Flotte *Clin. Pharmacokinet.* **2002**, *41*, 901-911.
- ¹⁸³ M. A. Kay, J. C. Glorioso, L. Naldini *Nature Med.* **2001**, *7*, 33-40.
- ¹⁸⁴ (a) I. M. Verma, M. D. Weitzman *Ann. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 711-738. (b) L. S. Young, P. F. Searle, D. Onion, V. Mautner *J. Pathol.* **2006**, *208*, 299-318. (c) D. V. Schaffer, J. T. Koerber, K. I. Lim *Ann. Rev. Biomed. Eng.* **2008**, *10*, 169-194.
- ¹⁸⁵ (a) S. McTaggart, M. Al-Rubeai *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 1-31. (b) C. K. Tai, N. Kasahara *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 3083-3095. (c) C. J. Buchholz, L. J. Duerner, S. Funke, I. C. Schneider *Comb. Chem. High T. Scr.* **2008**, *11*, 99-110.
- ¹⁸⁶ (a) F. Kreppel, S. Kochanek *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 16-29. (b) D. Descamps, K. Benihoud *Curr. Gene Ther.* **2009**, *9*, 115-127.
- ¹⁸⁷ (a) Z. J. Wu, A. Asokan, R. J. Samulski *Mol. Ther.* **2006**, *14*, 316-327. (b) H. Büning, L. Perabo, O. Coutelle, S. Quadt-Humme, M. Hallek *J. Gene Med.* **2008**, *10*, 717-733. (c) K. Stieger, E. Lheriteau, P. Moullier, F. Rolling *ILAR J.* **2009**, *50*, 206-240.
- ¹⁸⁸ (a) Z. S. Guo, S. H. Thorne, D. L. Bartlett *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1785*, 217-231. (b) C. E. Gómez, J. L. Nájera, M. Krupa, M. Esteban *Curr. Gene Ther.* **2008**, *8*, 97-120.
- ¹⁸⁹ (a) D. K. Kirn, S. H. Thorne *Nature Rev. Cancer* **2009**, *9*, 64-71. (b) A. Frentzen, Y. A. Yu, N. Chen, Q. Zhang, S. Weibel, V. Raab, A. A. Szalay *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12915-12920. (c) Z. S. Guo, D. L. Bartlett *Expert Opin. Biol. Ther.* **2004**, *4*, 901-917.
- ¹⁹⁰ A. L. Epstein *Gene Ther.* **2009**, *16*, 709-715.
- ¹⁹¹ Y.-H. H. Lien, L.-W. Lai *Drugs Aging* **2002**, *19*, 553-560.
- ¹⁹² J. K. Wolf, A. D. Jenkins *Int. J. Oncol.* **2002**, *21*, 461-468.

- ¹⁹³ K. R. G. Martin, R. L. Klein, H. A. Quigley *Methods* **2002**, *28*, 267-275.
- ¹⁹⁴ J. S. Chamberlain *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 2355-2362.
- ¹⁹⁵ M. L. Edelstein, M. R. Abedi, J. Wixon *J. Gene Med.* **2007**, *9*, 833-842. Para datos actualizados a Marzo de 2009, ver: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>
- ¹⁹⁶ D. R. Chadwick, A. M. L. Lever *Expert Opin. Ther. Pat.* **1998**, *8*, 983-990.
- ¹⁹⁷ W. Zhao, M. Kobayashi, M. Hosokawa, P. Seth *Curr. Genomics.* **2002**, *3*, 163-180.
- ¹⁹⁸ (a) D. Favre, N. Provost, V. Blouin, G. Blanco, Y. Chérel, A. Salvetti, P. Moullier *Mol. Ther.* **2001**, *4*, 559-566. (b) T. L. Timme, S. L. Hall, R. Barrios, S. L. C. Woo, E. Aguilar-Cordova, T. C. Thompson *Cancer Gene Ther.* **1998**, *5*, 74-82.
- ¹⁹⁹ (a) S. E. Raper, N. Chirmule, F. S. Lee, N. L. Wivel, A. Bagg, G.-p. Gao, J. M. Wilson, M. L. Batshaw *Mol. Genet. Metab.* **2003**, *80*, 148-158. (b) C. E. Thomas, A. Ehrhardt, M. A. Kay *Nature Rev. Genet.* **2003**, *4*, 346-358. (c) E. Check *Nature* **2002**, *420*, 116-118.
- ²⁰⁰ R. A. Owens *Curr. Gene Ther.* **2002**, *2*, 145-159.
- ²⁰¹ Z. Peng *Hum. Gene Ther.* **2005**, *16*, 1016-1027.
- ²⁰² N. Sanvicens, M. P. Marco *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 425-433.
- ²⁰³ C. E. Smull, E. H. Ludwig *J. Bacteriol.* **1962**, *84*, 1035-1040.
- ²⁰⁴ M. Johnson-Saliba, D. A. Jans *Curr. Drug Targets* **2001**, *2*, 371-399.
- ²⁰⁵ D. J. Glover, H. J. Lipps, D. A. Jans *Nature Rev. Genetics* **2005**, *6*, 299-311.
- ²⁰⁶ R. Kircheis, L. Wightman, A. Schreiber, B. Robitza, V. Rössler, M. Kursa, E. Wagner *Gene Ther.* **2001**, *8*, 28-40.
- ²⁰⁷ E. Mastrobattista, M. A. E. M. van der Aa, W. E. Hennink, D. J. A. Crommelin *Nature Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 115-121.
- ²⁰⁸ C.-K. Chan, D. A. Jans *Gene Ther.* **2001**, *8*, 166-171.
- ²⁰⁹ (a) M. Kursa, G. F. Walker, V. Roessler, M. Ogris, W. Roedl, R. Kircheis, E. Wagner *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 222-231. (b) R. M. Schiffelers, A. Ansari, J. Xu, Q. Zhou, Q. Tang, G. Storm, G. Molema, P. Y. Lu, P. V. Scaria, M. C. Woodle *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e149.
- ²¹⁰ T. Kakudo, S. Chaki, S. Futaki, I. Nakase, K. Akaji, T. Kawakami, K. Maruyama, H. Kamiya, H. Harashima *Biochemistry* **2004**, *43*, 5618-5628.
- ²¹¹ J.-P. Behr *Chimia* **1997**, *51*, 34-36.

- ²¹² (a) R. N. Cohen, M. J. Rashkin, X. Wen, F. C. Szoka Jr. *Drug Discov. Today: Technologies* **2005**, *2*, 111-118. (b) A. Mesika, V. Kiss, V. Brumfeld, G. Ghosh, Z. Reich *Hum. Gene Ther.* **2005**, *16*, 200-208.
- ²¹³ (a) J. J. Ludtke, G. Zhang, M. G. Sebestyen, J. A. Wolff *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 2033-2041. (b) K. H. Bremner, L. W. Seymour, A. Logan, M. L. Read *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 152-161. (c) V. Escriou, M. Carriere, D. Scherman, P. Wils *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 295-306.
- ²¹⁴ F. J. Verbaan, C. Oussoren, C. J. Snel, D. J. A. Crommelin, W. E. Hennink, G. Storm *J. Gene Med.* **2004**, *6*, 64-75.
- ²¹⁵ P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7413-7417.
- ²¹⁶ (a) S. Bhattacharya, A. Bajaj *Chem. Commun.* **2009**, 4632-4656. (b) W. Li, F. C. Szoka Jr. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 438-449.
- ²¹⁷ X. Gao, L. Huang *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *179*, 280-285.
- ²¹⁸ J.-P. Behr, B. Demeneix, J. P. Loeffler, J. Perez-Mutul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6982-6986.
- ²¹⁹ J.-S. Remy, C. Sirlin, P. Vierling, J.-P. Behr *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 647-654.
- ²²⁰ A. Gissot, M. Camplo, M. W. Grinstaff, P. Barthélémy *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1324-1333.
- ²²¹ K. Wang, X. Yan, Y. Cui, Q. He, J. Li *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1735-1738.
- ²²² (a) M. Sainlos, M. Hauchecorne, N. Oudrhiri, S. Zertal-Zidani, A. Aissaoui, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, P. Lehn *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1023-1033. (b) L. Desigaux, M. Sainlos, O. Lambert, R. Chevre, E. Letrou-Bonneval, J.-P. Vigneron, P. Lehn, J.-M. Lehn, B. Pitard *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16534-16539.
- ²²³ K. Shigeta, S. Kawakami, Y. Higuchi, T. Okuda, H. Yagi, F. Yamashita, M. Hashida *J. Control. Rel.* **2007**, *118*, 262-270.
- ²²⁴ C. Lainé, E. Mornet, L. Lemiègre, T. Montier, S. Cammas-Marion, C. Neveu, N. Carmoy, P. Lehn, T. Benvegna *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 8330-8340.
- ²²⁵ B. S. Reddy, R. Banerjee *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6723-6727.
- ²²⁶ A. Mukherjee, T. K. Prasad, N. M. Rao, R. Banerjee *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15619-15627.

- ²²⁷ (a) R. Banerjee, P. Tyagi, S. Li, L. Huang *Int. J. Cancer* **2004**, *112*, 693-700. (b) S.-D. Li, L. Huang *Mol. Pharm.* **2006**, *3*, 579-588. (c) S.-D. Li, S. Chono, L. Huang *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 942-946.
- ²²⁸ (a) J. Leblond, N. Mignet, L. Leseurre, C. Largeau, M. Bessodes, D. Scherman, J. Herscovici *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1200-1208. (b) J. Leblond, N. Mignet, C. Largeau, M.-V. Spanedda, J. Seguin, D. Scherman, J. Herscovici *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 484-493. (c) J. Leblond, N. Mignet, C. Largeau, J. Seguin, D. Scherman, J. Herscovici *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 306-314.
- ²²⁹ J. L. Jiménez Blanco, P. Bootello, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5136-5143.
- ²³⁰ G. Zuber, L. Zammuto-Italiano, E. Dauty, J.-P. Behr *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2666-2669.
- ²³¹ (a) L. Le Gourriérec, C. Di Giorgio, J. Greiner, P. Vierling *New J. Chem.* **2008**, *32*, 2027-2042. (b) N. Guilloteau, L. Le Gourriérec, K. Fabio, C. Di Giorgio, L. Greiner, P. Vierling *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 562-563.
- ²³² D. Papahadjopoulos, T. M. Allen, A. Gabizon, E. Mayhew, K. Matthey, S. K. Huang, K. D. Lee, M. C. Woodle, D. D. Lasic, C. Redemann, F. J. Martin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 11460-11464.
- ²³³ W. D. Henner, I. Kleber, R. Benzinger *J. Virol.* **1973**, *12*, 741-747.
- ²³⁴ O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J.-P. Behr *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7297-7301.
- ²³⁵ U. K. Laemmli *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 4288-4292.
- ²³⁶ A. Akinc, R. Langer *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 503-508.
- ²³⁷ Y. H. Choi, F. Liu, J.-S. Kim, Y. K. Choi, J.-S. Park, S. W. Kim *J. Control. Rel.* **1998**, *54*, 39-48.
- ²³⁸ D. Putnam, C. A. Gentry, D. W. Pack, R. Langer *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 1200-1205.
- ²³⁹ M. Ohsaki, T. Okuda, A. Wada, T. Hirayama, T. Niidome, H. Aoyagi *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 510-517.

- ²⁴⁰ P. Van de Wetering, J.-Y. Cherng, H. Talsma, W. E. Hennink *J. Control. Rel.* **1997**, *49*, 59-69.
- (b) P. Van de Wetering, E. E. Moret, N. M. E. Schuurmans-Nieuwenbroek, M. J. Van Steenberg, W. E. Hennink *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 589-597.
- ²⁴¹ P. Van de Wetering, N. M. E. Schuurmans-Nieuwenbroek, W. E. Hennink, G. Storm *J. Gene Med.* **1999**, *1*, 156-165.
- ²⁴² S. Ferrari, E. Moro, A. Pettenazzo, J.-P. Behr, F. Zacchello, M. Scarpa *Gene Ther.* **1997**, *4*, 1100-1106.
- ²⁴³ W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos *Biomaterials* **2001**, *22*, 471-480.
- ²⁴⁴ M. Neu, D. Fischer, T. Kissel *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 992-1009.
- ²⁴⁵ (a) D.-a. Wang, A. S. Narang, M. Kotb, A. O. Gaber, D. D. Miller, S. W. Kim, R. I. Mahato *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1197-1207. (b) S.-o. Han, R. I. Mahato, S. W. Kim *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 337-345.
- ²⁴⁶ (a) C.-H. Ahn, S. Y. Chae, Y. H. Bae, S. W. Kim *J. Control. Rel.* **2002**, *80*, 273-282. (b) M. A. Gosselin, W. Guo, R. J. Lee *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 989-994.
- ²⁴⁷ M. Thomas, A. M. Klibanov *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14640-14645.
- ²⁴⁸ T.-H. Kim, H.-L. Jiang, D. Jere, I.-K. Park, M.-H. Cho, J.-W. Nah, Y.-J. Choi, T. Akaike, C.-S. Cho *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 726-753.
- ²⁴⁹ M. Mizu, K. Koumoto, T. Anada, T. Matsumoto, M. Numata, S. Shinkai, T. Nagasaki, K. Sakurai *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8372-8373.
- ²⁵⁰ (a) T. Azzam, H. Eliyahu, L. Shapira, M. Linial, Y. Barenholz, A. J. Domb *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1817-1824. (b) H. Hosseinkhani, T. Azzam, H. Kobayashi, Y. Hiraoka, H. Shimokawa, A. J. Domb, Y. Tabata *Biomaterials* **2006**, *27*, 4269-4278.
- ²⁵¹ (a) Y. Liu, L. Wenning, M. Lynch, T. M. Reineke *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7422-7423. (b) Y. Liu, T. M. Reineke *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3004-3015. (c) S. Srinivasachari, Y. Liu, G. Zhang, L. Prevette, T. M. Reineke *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8176-8184.
- ²⁵² K. M. Kitchens, M. E. H. El-Sayed, H. Ghandehari *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 2163-2176.
- ²⁵³ V. Russ, M. Günther, A. Halama, M. Ogris, E. Wagner *J. Control. Rel.* **2008**, *132*, 131-140.
- ²⁵⁴ M. Yamagata, T. Kawano, K. Shiba, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 526-532
- ²⁵⁵ H. Gonzalez, S. J. Hwang, M. E. Davis *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1068-1074.

- ²⁵⁶ (a) T. M. Reineke, M. E. Davis *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 247-254. (b) M. E. Davis, S. H. Pun, N. C. Bellocq, T. M. Reineke, R. S. Popielarski, S. Mishra, J. D. Heidel *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 179-197.
- ²⁵⁷ S. H. Pun, N. C. Bellocq, J. Cheng, B. H. Grubbs, G. S. Jensen, M. E. Davis, F. Tack, M. Brewster, M. Janicot, B. Janssens, W. Floren, A. Bakker *Cancer Biol. Ther.* **2004**, *3*, 641-650.
- ²⁵⁸ S. H. Pun, M. E. Davis *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 630-639.
- ²⁵⁹ D. W. Bartlett, H. Su, I. J. Hildebrandt, W. A. Weber, M. E. Davis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15549-15554.
- ²⁶⁰ J. D. Heidel, Z. Yu, J. Y.-C. Liu, S. M. Rele, Y. Liang, R. K. Zeidan, D. J. Kornbrust, M. E. Davis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5715-5721.
- ²⁶¹ M. E. Davis *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 659-668. Para conocer datos actualizados del desarrollo de los ensayos clínicos, ver: <http://www.calandopharma.com/>
- ²⁶² (a) F. Kihara, H. Arima, T. Tsutsumi, F. Hirayama, H. Uekama *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 342-350. (b) K. Wada, H. Arima, T. Tsutsumi, Y. Chihara, K. Hattori, F. Hirayama, K. Uekama *J. Control. Rel.* **2005**, *104*, 397-413.
- ²⁶³ T. Tsutsumi, F. Hirayama, H. Uekama, H. Arima *J. Control. Rel.* **2007**, *119*, 349-359.
- ²⁶⁴ A. Yamashita, H. S. Choi, T. Ooya, N. Yui, H. Akita, K. Kogure, H. Harashima *ChemBioChem* **2006**, *7*, 297-302.
- ²⁶⁵ (a) T. Ooya, H. S. Choi, A. Yamashita, N. Yui, Y. Sugaya, A. Kano, A. Maruyama, H. Akita, R. Ito, H. Kogure, H. Harashima *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3852-3853. (b) A. Yamashita, D. Kanda, R. Katoono, N. Yui, T. Ooya, A. Maruyama, H. Akita, K. Kogure, H. Harashima *J. Control. Rel.* **2008**, *131*, 137-144.
- ²⁶⁶ J. Li, C. Yang, H. Li, X. Wang, S. H. Goh, J. L. Ding, D. Y. Wang, K. W. Leong *Adv. Matter.* **2006**, *18*, 2969-2974.
- ²⁶⁷ (a) N. Mourtzis, M. Paravatou, I. M. Mavridis, M. L. Roberts, K. Yannakopoulou *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4188-4200. (b) N. Mourtzis, K. Eliadou, C. Aggelidou, V. Sophianopoulou, I. M. Mavridis, K. Yannakopoulou *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 125-131
- ²⁶⁸ S. Menuel, S. Fontanay, I. Clarot, R. E. Duval, L. Diez, A. Marsura *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2357-2362.
- ²⁶⁹ B. J. Ravoo, R. Darcy *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4324-4326.

- ²⁷⁰ S.-A. Cryan, A. Holohan, R. A. Donohue, R. Darcy, C. M. O'Driscoll *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *21*, 625-633.
- ²⁷¹ A. McMahon, E. Gomez, R. Donohue, D. Forde, R. Darcy, C. M. O'Driscoll *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2008**, *18*, 303-307.
- ²⁷² F. Sansone, M. Dudic, G. Donofrio, C. Rivetti, L. Baldini, A. Casnati, S. Cellai, R. Ungaro *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14528-14536.
- ²⁷³ (a) K. Lienkamp, A. E. Madkour, A. Musante, C. F. Nelson, K. Nüsslein, G. N. Tew *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9836-9843. (b) K. L. Genson, J. Hoffman, J. Teng, E. R. Zubarev, D. Vaknin, V. V. Tsukruk *Langmuir* **2004**, *20*, 9044-9052.
- ²⁷⁴ S. Walker, M. J. Sofia, R. Kakarla, N. A. Kogan, L. Wierichs, C. B. Longley, K. Bruker, H. R. Axelrod, S. Midha, S. Babu, D. Kahne *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1585-1590.
- ²⁷⁵ F. Sallas, R. Darcy *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 957-969.
- ²⁷⁶ A. Méndez-Ardoy, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, M. D. Girón-González, N. Sevillano-Tripero, R. Salto-González, F. Santoyo-González, J. M. García Fernández *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2681-2684.
- ²⁷⁷ F. Ortega-Caballero, C. Ortiz Mellet, L. Le Gourriérec, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, J. M. García Fernández *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5143-5146.
- ²⁷⁸ S. Nimesh, A. Goyal, V. Pawar, S. Jayaraman, P. Kumar, R. Chandra, Y. Singh, K. C. Gupta *J. Control. Rel.* **2006**, *110*, 457-468.
- ²⁷⁹ M.-H. Louis, S. Dutoit, Y. Denoux, P. Erbacher, E. Deslandes, J.-P. Behr, P. Gauduchon, L. Poulain *Cancer Gene Ther.* **2006**, *13*, 367-374.
- ²⁸⁰ A. Mazzaglia, R. Donohue, B. J. Ravoo, R. Darcy *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1715-1721.
- ²⁸¹ (a) A. Dubes, D. Bouchu, R. Lamartine, H. Parrot-Lopez *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 9147-9151. (b) S. Lesieur, D. Charon, P. Lesieur, C. Ringard-Lefebvre, V. Muguet, D. Duchêne D. Wouessidjewe *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *106*, 127-144.
- ²⁸² K. Chmurski, J. Defaye *Supramol. Chem.* **2000**, *12*, 221-224.
- ²⁸³ (a) P. A. Gale, S. E. Garcia-Garrido, J. Garric *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 151-190. (b) R. Martínez-Mañez, F. Sancenón *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419-4476.
- ²⁸⁴ (a) A. K. H. Hirsh, F. R. Fischer, F. Diederich *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 338-352. (b) E. A. Katayev, Y. A. Ustynyuk, J. L. Sessler *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3004-3037.

- ²⁸⁵ J. L. Jiménez Blanco, P. Bootello, C. Ortiz Mellet, R. Gutiérrez Gallego, J. M. García Fernández *Chem. Commun.* **2004**, 92-93
- ²⁸⁶ J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2000**, *55*, 35-135.
- ²⁸⁷ D. M. Kneeland, K. Ariga, V. M. Lynch, C. Y. Huang, E. V. Anslyn *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10042-10055.
- ²⁸⁸ J. L. Jiménez Blanco, C. Sainz Barria, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. Fuentes, F. Santoyo-González, J. M. García Fernández *Synthesis* **1999**, 1907-1914.
- ²⁸⁹ C. Chittimilla, L. Zammuto-Italiano, G. Zuber, J.-P. Behr *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11436-11441.
- ²⁹⁰ G. Zuber, E. Dauty, M. Nolhisen, P. Belguise, J.-P. Behr *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *52*, 245-253.
- ²⁹¹ (a) S.-M. Zou, P. Erbacher, J.-S. Remy, J.-P. Behr *J. Gene Med.* **2000**, *2*, 128-134. (b) J. A. Reddy, P. S. Low *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1998**, *15*, 587-627.
- ²⁹² M. Mandelkern, J. G. Elias, D. Eden, D. M. Crothers *J. Mol. Biol.* **1981**, *152*, 153-161.
- ²⁹³ Y. Aoyama, T. Kanamori, T. Nakai, T. Sasaki, S. Horiuchi, S. Sando, T. Niidome *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3455-3457.
- ²⁹⁴ I. S. Zuhorn, J. B. F. N. Engberts, D. Hoekstra *Eur. Biophys. J.* **2007**, *36*, 349-362.
- ²⁹⁵ (a) A. Akinc, M. Thomas, A. M. Klivanov, R. Langer *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 657-663. (b) D. V. Schaffer, N. A. Fidelman, N. Dan, D. A. Lauffenburger *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67*, 598-606.
- ²⁹⁶ J. Rejman, A. Bragonzi, M. Conese *Mol. Ther.* **2005**, *12*, 468-474.
- ²⁹⁷ A. W. Tong, C. M. Jay, N. Senzer, P. B. Maples, J. Nemunaitis *Curr. Gene Ther.* **2009**, *9*, 45-60.
- ²⁹⁸ M. Ogris, S. Brunner, S. Schüller, R. Kircheis, E. Wagner *Gene Ther.* **1999**, *6*, 595-605.
- ²⁹⁹ P. R. Dash, M. L. Read, L. B. Barrett, M. A. Wolfert, L. W. Seymour *Gene Ther.* **1999**, *6*, 643-650.
- ³⁰⁰ (a) J. Šmisterová, A. Wagennar, M. C. A. Stuart, E. Polushkin, G. ten Brinke, R. Hulst, J. B. F. N. Engberts, D. Hoekstra *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47615-47622. (b) Y. Xu, F. C. Szoka *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616-5623.
- ³⁰¹ (a) C. Gonçalves, E. Mennesson, R. Fuchs, J.-P. Gorvel, P. Midoux, C. Pichon *Mol. Ther.* **2004**, *10*, 373-385. (b) K. von Gersdorff, N. N. Sanders, R. Vandenbroucke, S. C. De Smedt, E. Wagner, M. Ogris *Mol. Ther.* **2006**, *14*, 745-753.

- ³⁰² S. D. Conner, S. L. Schmid *Nature* **2003**, 422, 37-44.
- ³⁰³ R. C. May, L. M. Machesky *J. Cell Sci.* **2001**, 114, 1061-1077.
- ³⁰⁴ P. L. Tuma, A. L. Hubbard *Physiol. Rev.* **2003**, 83, 871-932.
- ³⁰⁵ M. C. Kerr, R. D. Teasdale *Traffic* **2009**, 10, 364-371.
- ³⁰⁶ F. R. Maxfield, T. E. McGraw *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **2004**, 5, 121-132.
- ³⁰⁷ (a) L. Pelkmans, J. Kartenbeck, A. Helenius *Nature Cell Biol.* **2001**, 3, 473-483. (b) D. K. Sharma, A. Choudhury, R. D. Singh, C. L. Wheatley, D. L. Marks, R. E. Pagano *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 7564-7572.
- ³⁰⁸ (a) J.-S. Shin, S. N. Abraham *Science*, **2001**, 293, 1447-1448. (b) L. Pelkmans, A. Helenius *Traffic* **2002**, 3, 311-320.
- ³⁰⁹ (a) O. O. Glebov, N. A. Bright, B. J. Nichols *Nature Cell Biol.* **2006**, 8, 46-54. (b) S. Mayor, R. E. Pagano *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **2007**, 8, 603-612. (c) R. Lundmark, G. J. Doherty, M. T. Howes, K. Cortese, Y. Vallis, R. G. Parton, H. T. McMahon *Curr. Biol.* **2008**, 18, 1802-1808.
- ³¹⁰ C. Puri, D. Tosoni, R. Comai, A. Rabellino, D. Segat, F. Caneva, P. Luzzi, P. P. Di Fiore, C. Tacchetti *Mol. Biol. Cell* **2005**, 16, 2704-2718.
- ³¹¹ G. J. Praefcke, H. T. McMahon *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **2004**, 5, 133-147.
- ³¹² J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, D. Hoekstra *Biochem. J.* **2004**, 377, 159-169.
- ³¹³ J. Rejman, M. Conese, D. Hoekstra *J. Lip. Res.* **2006**, 16, 237-247.
- ³¹⁴ S. C. De Smedt, K. Remaut, B. Lucas, K. Braeckmans, N. N. Sanders, J. Demeester *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57, 191-210.
- ³¹⁵ I. Khalil, K. Kogure, H. Akita, H. Arracima *Pharmacol. Rev.* **2006**, 58, 32-45.
- ³¹⁶ (a) H. Damke, T. Baba, D. E. Warnock, S. L. Schmid *J. Cell Biol.* **1994**, 127, 915-934. (b) S.-H. Liu, M. S. Marks, F. M. Brodsky *J. Cell Biol.* **1998**, 140, 1023-1037. (c) A. Benmerah, M. Bayrou, N. Cerf-Bensussan, A. Dautry-Varsat *J. Cell Sci.* **1999**, 112, 1303-1311.
- ³¹⁷ (a) B. J. Nichols *Nature Cell Biol.* **2002**, 4, 374-378. (b) L. Hinrichsen, J. Harborth, L. Andrees, K. Weber, E. J. Ungewickell *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 45160-45170. (c) F. Huang, A. Khvorova, W. Marshall, A. Sorkin *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 16657-16661. (d) D. Vanden Broeck, M. J. S. De Wolf *Biotechniques* **2006**, 41, 475-484.
- ³¹⁸ (a) A. I. Ivanov, en *Exocytosis and Endocytosis* (Ed.: A. I. Ivanov) Humana Press, Totowa, **2008**, pp 15-33. (b) D. Vercauteren, R. E. Vandenbroucke, A. T. Jones, J. Rejman, J. Demeester, S. C. De Smedt, N. N. Sanders, K. Braeckmans *Mol. Ther.* **2010**, en prensa.

- ³¹⁹ L. H. Wang, K. G. Rothberg, R. G. Anderson *J. Cell Biol.* **1993**, *123*, 1107-1117.
- ³²⁰ (a) R. G. Parton, B. Joggerst, K. Simons *J. Cell Biol.* **1994**, *127*, 1199-1215. (b) P. A. Orlandi, P. H. Fishman *J. Cell Biol.* **1998**, *141*, 905-915.
- ³²¹ E. Macia, M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner, T. Kirchhausen *Dev. Cell* **2006**, *10*, 839-850.
- ³²² S. K. Rodal, G. Skretting, O. Garred, F. Vilhardt, B. van Deurs, K. Sandvig *Mol. Biol. Cell* **1999**, *10*, 961-974.
- ³²³ C.-M. Lehr, F. Gabor *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 419-420.
- ³²⁴ (a) Y. Yang, F. E. Nunes, K. Berencsi, E. E. Furth, E. Gönczöl, J. M. Wilson *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4407-4411. (b) D. A. Muruve *Hum. Gene Ther.* **2004**, *15*, 1157-1166. (c) R. Tomanin, M. Scarpa *Curr. Gene Ther.* **2004**, *4*, 357-372.
- ³²⁵ L. K. Medina-Kauwe, J. Xie, S. Hamm-Alvarez *Gene Ther.* **2005**, *12*, 1734-1751.
- ³²⁶ M. Nishikawa *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 195-200.
- ³²⁷ (a) N. Yang, Z. Ye, F. Li, R. I. Mahato *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 213-221. (b) M. M. Issa, M. Köping-Höggård, K. Tømmeraas, K. M. Vårum, B. E. Christensen, S. P. Strand, P. Artursson *J. Control. Rel.* **2006**, *115*, 103-112.
- ³²⁸ M. Xian, Z. Fatima, W. Zhang, J. Fang, H. Li, D. Pei, J. Loo, T. Stevenson, P. G. Wang *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 126-134.
- ³²⁹ (a) S. S. Diebold, M. Kursa, E. Wagner, M. Cotten, M. Zenke *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 19087-19094. (b) A. Sato, S. Kawakami, M. Yamada, F. Yamashita, M. Hashida *J. Drug Target.* **2001**, *9*, 201-207.
- ³³⁰ (a) K. Morimoto, M. Nishikawa, S. Kawakami, T. Nakano, Y. Hattori, S. Fumoto, F. Yamashita, M. Hashida *Mol. Ther.* **2003**, *7*, 254-261. (b) S. R. Popielarski, S. H. Pun, M. E. Davis *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1063-1070. (c) S. R. Popielarski, S. Hu-Lieskovan, S. W. French, T. J. Triche, M. E. Davis *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1071-1080.
- ³³¹ (a) M. Monsigny, C. Rondanino, E. Duverger, I. Fajac, A.-C. Roche *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1673*, 94-103. (b) H. Yan, K. Tram *Glycoconjugate J.* **2007**, *24*, 107-123. (c) I. Fajac, G. Thévenot, L. Bédouet, C. Danel, M. Riquet, M. Merten, C. Figarella, J. Dall'Ava-Santucci, M. Monsigny, P. Briand *J. Gene Med.* **2003**, *5*, 38-48.
- ³³² T. Masuda, H. Akita, T. Nishio, K. Niikura, K. Kogure, K. Ijiro, H. Harashima *Biomaterials* **2008**, *29*, 709-723.

- ³³³ (a) S. Grosse, Y. Aron, I. Honore, G. Thévenot, C. Danel, A.-C. Roche, M. Monsigny, I. Fajac *J. Gene Med.* **2004**, *6*, 345-356. (b) E. Duvenger, C. Pellerin-Mendes, R. Mayer, A. C. Roche, M. Monsigny *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 1325-1332. (c) S. Grosse, G. Thévenot, M. Monsigny, I. Fajac *J. Gene Med.* **2006**, *8*, 845-851.
- ³³⁴ T. Nagasaki, M. Hojo, A. Uno, T. Satoh, K. Koumoto, M. Mizu, K. Sakurai, S. Shinkai *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 249-259.
- ³³⁵ A. C. Roche, I. Fajac, S. Grosse, N. Frison, C. Rondanino, R. Mayer, M. Monsigny *Cell Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 288-297.
- ³³⁶ Y. Aoyama *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2005**, *17*, 39-47.
- ³³⁷ M.-A. Zanta, O. Boussif, A. Adib, J.-P. Behr *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 839-844.
- ³³⁸ (a) C. M. Paulos, J. A. Reddy, C. P. Leamos, M. j. Turk, P. S. Low *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 1406-1414. (b) J. D. Bleil, M. S. Bretscher *EMBO J.* **1982**, *1*, 351-355. (c) M. S. Jhaveri, A. S. Rait, K. Chung, J. B. Trepel, E. H. Chang *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 1505-1512.
- ³³⁹ M. E. Davis, Z. Chen, D. M. Shin *Nature Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 771-782.
- ³⁴⁰ N. P. Gabrielson, D. W. Pack *J. Control. Rel.* **2009**, *136*, 54-61.
- ³⁴¹ M. Izumi, S. Okumura, H. Yuasa, H. Hashimoto *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, *22*, 317-330.
- ³⁴² C. Kieburg, T. K. Lindhorst *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3885-3888.
- ³⁴³ J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández *Carbohydr. Res.* **2000**, *323*, 218-225.
- ³⁴⁴ A. Titz, Z. Radica, O. Schwarbta, B. Ernst *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2383-2385.
- ³⁴⁵ G. Li, H. Tajima, T. Ohtani *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4539-4540.
- ³⁴⁶ G. Zemplén, E. Pacsu *Ber. Deut. Chem. Ges.* **1929**, *62*, 1613-1614.
- ³⁴⁷ E. Kaiser, R. L. Colecott, C. D. Bossinger, P. I. Cook *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- ³⁴⁸ P. L. Du Noüy *J. Gene Physiol.* **1925**, *7*, 625-633.
- ³⁴⁹ J. Gaucheron, C. Boulanger, C. Santaella, N. Sbirrazzouli, O. Boussif, P. Vierling *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 949-963.
- ³⁵⁰ B. Carboni, M. Vaultier, R. Carrié *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 1799-1810.
- ³⁵¹ B. Carboni, A. Benalil, M. Vaultier *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3736-3741.
- ³⁵² J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, J. Fuentes *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5192-5199.
- ³⁵³ J. Smith, J. L. Liras, S. E. Schneider, E. V. Anslyn *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8811-8818.
- ³⁵⁴ P. Balbuena. Tesis doctoral: *Nanoestructuras basadas en ciclodextrinas para el transporte de fármacos y material génico*, Universidad de Sevilla, Sevilla, **2008**.

- ³⁵⁵ (a) A. Y. Chernyak, V. M. G. Sharma, L. O. Kononov, P. R. Krishna, A. B. Levinsky, N. K. Kochetkov, A. V. Rama Rao *Carbohydr. Res.* **1992**, *223*, 303-309. (b) A. K. Pathak, V. Pathak, J. M. Riordan, S. S. Gurcha, G. S. Besra, R. C. Reynolds *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 683-691.
- ³⁵⁶ B. L. Iverson, K. Shreder, T. Morishima, M. Rosingana, J. L. Sessler *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6616-6620.