



**Departamento
de Química Orgánica**

**Preparación de nanosistemas por autoensamblaje de
ciclodextrinas y calixarenos. Aplicaciones al transporte y a la
liberación controlada de genes y fármacos.**

**Laura Gallego Yerga
Sevilla, 2014**



**Departamento
de Química Orgánica**

**Preparación de nanosistemas por autoensamblaje de
ciclodextrinas y calixarenos. Aplicaciones al transporte y a la
liberación controlada de genes y fármacos.**

Memoria presentada por la
Licenciada Laura Gallego Yerga
para optar al grado de Doctor en Química

Sevilla, 2014

El presente trabajo ha sido realizado por la Lda. Laura Gallego Yerga en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de la Dra. Carmen Ortiz Mellet, Catedrática de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla y del Dr. José Manuel García Fernández, Profesor de Investigación del Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC-Universidad de Sevilla).

Los directores del trabajo:

Fdo.: Dra. Carmen Ortiz Mellet

Fdo.: Dr. José Manuel García Fernández

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN/SUMMARY

1. Introducción general.....	3
1.1. Autoensamblaje y química biológica supramolecular.....	3
1.2. Sistemas autoensamblados basados en ciclodextrinas y calixarenos: aplicación al transporte de agentes anticancerosos.....	5
1.3. Transportadores de genes basados en derivados monodispersos de ciclodextrinas y calixarenos.....	13
1.4. Estrategias supramoleculares de incorporación de ligandos glucídicos biorreconocibles en sistemas de transporte basados en ciclodextrinas: interacciones carbohidrato-lectina.....	20
2. Objetivos.....	35
3. Estudio comparativo de las propiedades de dimerización y complejación de α-, β- y γ-ciclodextrinas (CDs) funcionalizadas en su cara secundaria con un puente de xilileno.....	51
3.1. Antecedentes bibliográficos.....	51
3.2. Resultados y discusión.....	58
3.2.1. Espectros de emisión de fluorescencia.....	58
3.2.2. Decaimiento de la intensidad de fluorescencia.....	63
3.2.3. Anisotropía de fluorescencia.....	68
3.2.4. Propiedades de la cavidad de las CDs.....	69
3.2.5. Constantes de equilibrio y estequiometría.....	74

3.2.6. Parámetros termodinámicos: variaciones de entalpía y de entropía.....	75
3.2.7. Mecánica molecular.....	78
3.2.8. Dinámica molecular.....	83
3.3. Conclusiones.....	86
4. Vectores de genes supramoleculares sensibles a pH mediante autoensamblado jerarquizado de ciclodextrinas policatiónicas y ADN.....	95
4.1. Antecedentes bibliográficos.....	95
4.2. Resultados y discusión.....	98
4.2.1. Síntesis de derivados de CDs policatiónicas xililenadas y permetiladas..	98
4.2.2. Estudio de las propiedades de asociación de las CDs policatiónicas xililenadas mediante RMN.....	101
4.2.3. Estudio de las propiedades de asociación de las CDs policatiónicas xililenadas y de sus interacciones con ADN mediante técnicas de fluorescencia y de dicroísmo circular.	104
4.2.4. Estudios teóricos de las propiedades de asociación de las CDs policatiónicas xililenadas y de sus interacciones con ADN mediante modelización molecular y dinámica molecular.....	108
4.2.5. Estudios de interacción de los dímeros de CD con ADN mediante electroforesis en gel de agarosa , dispersión dinámica de la luz (DLS) y microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	115
4.2.6. Eficiencia de transfección en células COS-7.....	118
4.3. Conclusiones.	120

5. Preparación de sistemas autoensamblados mediante prefuncionalización supramolecular y evaluación de su capacidad de transfección.	127
5.1. Antecedentes bibliográficos.....	127
5.2. Resultados y discusión.....	128
5.2.1. Síntesis de derivados de bis-adamantano.....	128
5.2.2. Estudio de los complejos de inclusión por RMN y fluorescencia.....	131
5.2.3. Estudio de la variación de pKa de los complejos CD:adamantano.....	137
5.2.4. Estudio de la termodinámica de complejación por ITC.....	138
5.2.5. Estudios teóricos de las propiedades de asociación de los sistemas ternarios CD:bis-adamantano y de sus interacciones con ADN mediante modelización molecular y dinámica molecular.....	143
5.2.6. Estudios de interacción de los sistemas ternarios CD:bis-adamantano con ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, dispersión dinámica de la luz (DLS) y microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	154
5.2.7. Eficiencia de transfección en células COS-7 y HepG2	155
5.3. Conclusiones.	167
6. Comparative evaluation of self-assembled polycationic systems based on cyclodextrins and calixarenes as non viral gene vectors.....	171
6.1. Introduction.	171
6.2. Results and discussion.....	175
6.2.1. Synthesis of polycationic calixarenes (CAs) and cyclodextrins (CDs).....	175
6.2.2. pDNA complexation abilities of paCDs and paCAs and characterization of the resulting nanocomplexes.....	187
6.2.3. Gene transfer capabilities towards COS-7 cell line.....	196

6.2.4. Gene transfer capabilities towards human Rhabdomyosarcoma (RD-4) cell line.	201
6.3. Conclusions.....	207
7. Síntesis de calixarenos policatiónicos anfifílicos diméricos.....	211
7.1. Antecedentes bibliográficos.....	211
7.2. Resultados y discusión.....	219
7.2.1. Síntesis de derivados de calixarenos anfifílicos diméricos.	219
7.3. Conclusiones.....	222
8. Nanotransportadores de medicamentos biorreconocibles mediante autoensamblaje de heterodímeros calixareno-ciclodextrina anfifílicos.....	229
8.1. Antecedentes bibliográficos.....	229
8.2. Resultados y discusión.....	232
8.2.1. Síntesis de heterodímeros CA ₄ -βCD.....	232
8.2.2. Caracterización de las nanopartículas formadas por autoensamblado de los heterodímeros de CA ₄ -βCDs mediante DLS y AFM.....	239
8.2.3. Estudios de encapsulación y cinética de liberación de diazepam y docetaxel.....	243
8.2.4. Incorporación supramolecular de ligandos manosilados. Estudios de reconocimiento por receptores de macrófagos (hMMR).....	252
8.3. Conclusiones.....	257
9. Estudio de la naturaleza del efecto clúster entre galactósidos multivalentes y la lectina de cacahuete Peanut Agglutinin Lectin (PNA).....	265
9.1. Antecedentes bibliográficos.....	265
9.2. Resultados y discusión.....	268

9.2.1. Síntesis de los glicoconjugados.....	268
9.2.2. Afinidad de los glicoconjugados frente a la lectina PNA.....	270
9.2.3. Capacidad de entrecruzamiento de los glicoconjugados.....	274
9.2.4. Determinación de la capacidad de los conjugados de formar agregados con la PNA.....	275
9.2.5. Estudio del efecto minicluster mediante espectroscopía de fuerza atómica.....	278
9.3. Conclusiones.....,	282
10. Conclusions.....	285
11. Experimental Part.	291
11.1. General Methods.....	291
11.2. Starting materials.	312
11.3. New Compounds.....	313

A

ABTS	Sal diamónica del ácido 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico).
Ac	Acetilo
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
Ad	Adamantano
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico

B

Bn	Bencilo
BNL-CL2	Línea celular derivada de hepatocitos de roedor
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
(Boc) ₂ O	Di- <i>tert</i> -butil dicarbonato
bp	Pares de bases (<i>base pairs</i>)
BPA	Bispiridilamina
bPEI	Polietilenimina ramificada
BSA	Albúmina de suero bovino
^t Bu	<i>tert</i> -butilo

C

°C	Grados Celsius
CA	Calixareno

CA ₄	Calix[4]areno
CD	Ciclodextrina
cmc	Concentración micelar crítica
conc.	Concentrado
ConA	Concanavalina A
COS-7	Línea celular derivada de células de fibroblastos de riñón de mono verde africano
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CuAAC	<i>Cu(I)-catalyzed Azide-Alkyne Coupling</i>
cuant.	Cuantitativo

D

δ	Desplazamiento químico
ΔG	Variación de la energía libre de Gibbs
ΔH	Variación de entalpía
ΔS	Variación de entropía
DCM	Diclorometano
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMAP	4-(Dimetilamino)piridina
DMAP	4-(Dimetilamino)piridina
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DXT	Docetaxel
DZ	Diazepam

E

EDTA Ácido etilendiamintetraacético

ELLA *Enzyme-Linked Lectin Assay*

ESI MS *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*

Et Etilo

Et₃N Trietilamina

F

FBS Suero fetal bovino

FDA *Food and Drug Administration*

G

GFP Proteína fluorescente verde

H

HEPES Ácido 2-[4-hidroximetil piperazina-1-il] etanosulfónico

HepG2 Línea celular derivada de células de hepatoblastoma humano

His Histamina

HMQC *Heteronuclear Multiple-Quantum Coherent experiment*

HBTU *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate, *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'* tetramethyluronium hexafluorophosphate

I

IC₅₀ Concentración inhibitoria del 50%
IR Espectroscopía infrarroja
ITC *Isothermal Titration Calorimetry*

K

K Kelvin
*K*_d Constante de disociación
*K*_a Constante de asociación

L

λ_{em} Longitud de onda de emisión
 λ_{exc} Longitud de onda de excitación
Luc Luciferasa

M

M3-PALS *Mixed Mode Measurement-Phase Analysis Light*
MALDI-TOF *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight*
Me Metilo

Ms	Mesilo
MW	Radiación microondas
MMR	Receptor de manosa de macrófagos
MTT	Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico

m/z Relación masa/carga

N

NC	Nanocápsulas
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
N/P	Relación Nitrógeno/Fosfato
NS	Nanoesferas

P

paCD	Ciclodextrina policatiónica anfifílica
paCA	
PBS	Tampón de fosfato salino
PBST	Tampón de fosfato salino con 0.05% v/v Tween 20
pDNA	Plásmido de ADN
PEI	Polietilenimina
PEG	Polietilenglicol
PI	Índice de polidispersidad
Pr	Propilo
py	Piridina

R

RMN	Resonancia magnética nuclear
rt	<i>Room temperature</i>

S

SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio

T

T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TAE	Tampón Tris-Acetato/EDTA
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TES	Triethylsilane
TIS	Trisisopropylsilane
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía de capa fina
TOCSY	<i>Totally Correlated Spectroscopy</i>
TPP	Trifenil fosfina
Ts	Tosilo

U

u. a.	Unidades arbitrarias
-------	----------------------

UV-vis

Ultravioleta-visible

RELACIÓN DE FIGURAS.**Capítulo 1.**

- Figura 1.1.** (A) Estructura general y dimensiones de las CDs nativas. (B) Representaciones de las cuatro conformaciones posibles de los calix[4]arenos. 7
- Figura 1.2.** Representación esquemática del sistema de transporte de docetaxel al receptor de manosa de macrófagos (MMR).
- Figura 1.3.** Representación esquemática de la β CD funcionalizada con galactósidos diseñado por Seeberger para transporte a hepatocitos. 9
- Figura 1.4.** Encapsulación de diazepam por nanoprecipitación con una CD anfifílica para obtener nanoesferas y nanocápsulas. 11
- Figura 1.5.** Estructuras de los derivados de CA₄ autoensamblables diseñados para el transporte de fármacos por los grupos de Lee (A), Meier (B) y Coleman (C). 12
- Figura 1.6.** (A) Estructura de las β CDs anfifílicas para el transporte de docetaxel. (B) Derivado de CA₄ para la preparación de nanotransportadores de paclitaxel. 13
- Figura 1.7.** Ejemplos de vectores no anfifílicos derivados de β CD (A), calix[4]areno (B) y pillar[5]areno (C).
- Figura 1.8.** Orientación relativa de los dominios hidrófilo y lipófilo en las ciclodextrinas policatiónicas anfifílicas tipo falda (A) y medusa (B). 14
- Figura 1.9.** Ejemplos de ciclodextrinas policatiónicas anfifílicas “reversas” (tipo medusa) desarrolladas por el grupo de O’Driscoll (A) y por nuestro grupo de investigación (B). 16
- Figura 1.10.** Ejemplos de ciclodextrinas policatiónicas anfifílicas monodispersas desarrolladas por el grupo de Darcy (A) y por nuestro grupo de investigación (B). 17
- Figura 1.11.** Ejemplos de calixarenos policatiónicos anfifílicos. 18
- Figura 1.12.** Ejemplos de calixarenos diméricos diseñados por Scharder como agentes de transfección génica. 19
- Figura 1.13.** Ejemplos de calixarenos multivalentes preparados por Matthews. 19

- Figura 1.14.** Estrategia de autoorganización de paCA en nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs). 20
- Figura 1.15.** Estructura de los conjugados α Man-paCD y β Gal-paCD y de los ligandos trivalentes galactosilados preparados en el grupo de investigación. 22
- Figura 1.16.** Estructuras de la CD anfífila y conjugados de tipo glicoadamantilo preparados por Ravoo (arriba) y representación esquemática de las glicovesículas multivalentes preparadas por complejación supramolecular 23
- Figura 1.17.** Estructura de la β CD policatiónica y del glicopolímero preparados por Reineke para la complejación de pDNA y la post-funcionalización de los nanocomplejos. 24

Capítulo 3

- Figura 3.1.** Complejación de ADN por dímeros de CDs policatiónicas funcionalizadas con grupos aromáticos en la cara secundaria. 55
- Figura 3.2.** Representación esquemática de los equilibrios conformacional y de agregación de las ciclodextrinas xililenadas. 56
- Figura 3.3.** Estructura de las CDs permetiladas (140-142) y 2- hidroxipropiladas (143-145). 58
- Figura 3.4.** Representación esquemática del equilibrio de complejación del 2-naftoato de metilo (2MN) por las CDs xililenadas 137-139. 58
- Figura 3.5.** Espectros de emisión de disoluciones acuosas de 2MN y 2MN con CDs xililenadas (137-139) y metiladas (140-142) a diferentes [CD] y a 25 °C, tras la excitación selectiva del huésped 2MN (292 nm). 60
- Figura 3.6.** Relación de intensidades de bandas de fluorescencia, R, frente a [CD], para disoluciones acuosas de 2MN/CDs xililenadas (137-139) y 2MN/CDs permetiladas 140-142 (25 °C, λ de excitación del 2MN, 292 nm). 61

- Figura 3.7.** Variación $\langle\tau\rangle$ relativo al **2MN** libre, $\langle\tau_0\rangle$, frente a [CD], para disoluciones acuosas de **2MN/CDs** xililenadas (**137-139**) y **2MN/CDs** permetiladas (**140-142**) (25 °C, λ de excitación de 292 nm, y emisión 385 nm, del **2MN**). 65
- Figura 3.8.** Variación $\langle\tau\rangle$ frente a [**138**] para disoluciones acuosas de **138** (símbolos huecos) y **2MN/138** (símbolos rellenos) a diferentes temperaturas (λ excitación, 260 nm y λ emisión , 288 nm, del grupo xilileno). 66
- Figura 3.9.** Anisotropías de fluorescencia para disoluciones acuosas de **2MN/137-139** a diferentes concentraciones de **137-139**, medidas como cocientes r/r_0 a 25 °C (r_0 es anisotropía de **2MN** en ausencia de CD). 68
- Figura 3.10.** A. Espectros de fluorescencia (normalizados a la intensidad máxima) para disoluciones diluidas de **2MN** en disolventes de diferentes viscosidades y polaridades a 25 °C. B y C. Representación de la variación de R (B) y τ (C) del **2MN** con ϵ (rojo) y η (azul). 70
- Figura 3.11.** Representaciones de van't Hoff para la formación de complejos 1:1 del **2MN** con CDs xililenadas (**140-142**) y permetiladas (**137-139**). 76
- Figura 3.12.** Modos de aproximación del huésped a la CD **138**: polar (P) y no polar (NP). 79
- Figura 3.13.** Energías de interacción en función de la distancia (Å) para aproximaciones del **2MN** por el lado polar (P, símbolos sólidos) y no polar (NP, símbolos huecos) para los derivados xililenados (**137-139**) y permetilados (**140-142**). 80
- Figura 3.14.** Estructuras de mínima energía de interacción para los complejos 1:1 **2MN/ 137-139** obtenidos por cálculos de MM (izquierda de la flecha) y de DM (derecha de la flecha), con orientación polar del **2MN**. 82
- Figura 3.15.** Izquierda: historias de la distancia **2MN-CD** para **137-139**. Derecha: energías de interacción durante la simulación por DM. 84

Capítulo 4

- Figura 4.1.** Estructura general de las ciclodextrinas policationicas anfifílicas (paCDs; $n = 6, 7$ u 8) e imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) de un CDplejo mostrando la típica ultraestructura en capas. 95
- Figura 4.2.** Estructura general del prototipo de β CD policationica funcionalizada con un grupo xilileno capaz de promover la autoasociación dependiente del pH. Representación esquemática de los procesos de ordenación jerárquica y de liberación de ADN. 97
- Figura 4.3.** Espectros de ^1H , 1D TOCSY (irradiación a H-1^{I} y H-3^{II}), y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, respectivamente, D_2O , 313 K) de **3**. 100
- Figura 4.4.** Espectros de ^1H RMN (500 MHz, D_2O) de **3** a temperatura variable. 102
- Figura 4.5.** Espectros de ^1H RMN (500 MHz, D_2O) de **3** a pH variable. 103
- Figura 4.6.** (A) Variación del promedio de vida media ponderada, $\langle\tau\rangle$, frente a la concentración de **3** para disoluciones acuosas a pH 5.5 (marcadores rellenos) y a pH 7.4 (marcadores huecos), a varias temperaturas. (B) Representación lineal de van't Hoff, a pH variable, en el rango 5-25 °C a intervalos de 5 °C. 106
- Figura 4.7.** Espectros de dicroísmo circular de ADN (*calf thymus*) en ausencia y en presencia del derivado **3** (0.05-3 mM) en medio tamponado (HEPES, 20 mM) a pH 7.4 y 25 °C. 107
- Figura 4.8.** Sistema de coordenadas empleado y procedimiento para simular la el proceso de dimerización de **3**, por MM, mediante una aproximación cabeza-cabeza. 109
- Figura 4.9.** Energías de interacción total y distintas contribuciones en función de la distancia CD-CD, a lo largo de la coordenada y , para el dímero de **3** cargado y neutro. 109
- Figura 4.10.** Simulaciones de DM para el dímero de **3** neutro. 111
- Figura 4.11.** Trayectoria de DM para el dímero de **3** cargado: A. Historias de las distancias CD- xilileno. B. Energía total de interacción. 111

- Figura 4.12.** Sistema de coordenadas usado para la aproximación simultánea de dos fragmentos de ADN al dímero de **3** a lo largo de la coordenada y , que interactúan por el surco mayor (arriba) o menor (abajo). 112
- Figura 4.13.** A. Energías de interacción en función de la distancia ADN-ADN para aproximación por el surco mayor o menor al dímero de **3**. B. Estructuras MBE obtenidas por MM, para una aproximación del ADN por el surco mayor o menor. 113
- Figura 4.14.** Historias de las distancias ADN-ADN para aproximación por el surco mayor (A) o menor (B) al dímero de **3**. Energías de interacción para la aproximación ADN-dímero (**3**) por el surco mayor (C) o menor (D). 114
- Figura 4.15.** Electroforesis en gel de agarosa de las formulaciones de pADN y **3** (A) ó **5** (C), y de sus correspondientes análogos no xililenados **6** (B) y **8** (D), respectivamente. 115
- Figura 4.16.** Imágenes de microscopía TEM de los complejos de pADN y **3** (A) y **5** (C), y de sus correspondientes análogos no xililenados **6** (B) y **8** (D), respectivamente, a N/P 20. 118
- Figura 4.17.** Eficacia de transfección (izquierda) y viabilidad celular (derecha) de CDplejos formulados con paCDs **3** y **5** a N/P 5 y 10 % de suero, en células COS-7. Como controles positivo y negativo se emplearon pDNA y poliplejos formulados con bPEI, respectivamente. 119

Capítulo 5

- Figura 5.1.** Representación esquemática de la interacción de un dímero supramolecular de ciclodextrina policatiónica con ADN. 127
- Figura 5.2.** Estructuras de la per(C-6)cisteaminil- β CD **148** y de la sonda TNS y representación esquemática del complejo **148**:TNS de estequiometría 2:1. 132
- Figura 5.3.** Espectros de fluorescencia (izquierda) e isoterma de asociación (derecha) para el complejo 2:1 **148**:TNS:**148** ([TNS] = 10 μ M) con indicación de la constante de asociación ($K_{as(2:1)}$) y de la estequiometría. 133

- Figura 5.4.** Comparación de los espectros de ^1H RMN del derivado de βCD **148** (A), el complejo 2:1 con el dímero de adamantano **11** (B), y una disolución saturada de **148** saturada en **11** (C). 134
- Figura 5.5.** Espectro ^1H RMN del derivado de CD **148** (abajo) y del complejo de inclusión **148:14** de estequiometría 2:1 (arriba). 135
- Figura 5.6.** Espectro NOESY del complejo **148:14**, en D_2O , con un tiempo de mezcla de 400 ms. 136
- Figura 5.7.** Desplazamiento de la resonancia de H-5 del derivado **148** (●) y del complejo **148:14**, estequiometría 2:1 (○) frente a pH en una disolución 19:1 H_2O - D_2O , 0.1 M NaCl, a 298 K. 137
- Figura 5.8.** Termograma (arriba) e isoterma de asociación (abajo) de los derivados de bis-adamantano (**9**, **11** y **12**) y **148** (25 °C). 140
- Figura 5.9.** Termograma (arriba) e isoterma de asociación (abajo) de los derivados de bis-adamantano (**14**, **16** y **19**) y **148** (25 °C). 141
- Figura 5.10.** Sistema de coordenadas empleado para estudiar la aproximación de las moléculas de βCD **148** al derivado de bis-adamantano **13**. 144
- Figura 5.11.** Energías de interacción de los complejos 2:1 CD:bis-adamantano **148:13**, en función de la distancia CD-CD para el complejo cargado (arriba) o neutro (abajo) y estructuras MBE correspondientes a los mínimos de energía (**1**) y (**2**) y (**1'**). 145
- Figura 5.12.** Historias de las distancias entre CDs y bis-adamantano para el complejo cargado (A) y neutro (C). Energías de interacción para los trímeros CD:bis-adamantano para el complejo neutro (B) y cargado (D). 148
- Figura 5.13.** Energías de interacción para la aproximación del ADN al complejo **148:13** en función de la distancia ADN1-ADN2. Las flechas indican los mínimos energéticos correspondientes a las estructuras MBE representadas en la parte inferior de la figura. 150
- Figura 5.14.** Izquierda: historias de diversas distancias obtenidas por DM para el sistema supramolecular de ADN con el complejo **148:13**. Derecha: Energías de

- interacción entre el complejo CD:bis-adamantano y el ADN, con aproximaciones por el surco mayor (A, C) o menor (C, D). 151
- Figura 5.15.** Imágenes instantáneas de la estructura del sistema ADN:148:13 inicial (izquierda), después de 0.5 ns (centro) y al final de la trayectoria de 1 ns (derecha) para una aproximación del ADN al trímero por el surco mayor. 152
- Figura 5.16.** Estructura de la paCD 149 seleccionada como referencia para el estudio de transfección *in vitro*. 155
- Figura 5.17.** Electroforesis en gel de agarosa del complejo pADN-148 y pADN-149 y de los sistemas supramoleculares de pADN con 148:14, 148: 13, 148: 16 y 148: 19, a valores de N/P 5 y 10 (abajo). Se empleó pADN libre como control negativo. 155
- Figura 5.18.** Electroforesis en gel de agarosa del complejo pADN -148 y de los sistemas supramoleculares de pADN con 148:9, 148:10, 148:11 y 148:12, a valores de N/P 1, 2 y 5. Se empleó pADN libre como control negativo. 156
- Figura 5.19.** Ensayos de protección frente a nucleasas de los complejos formulados con pADN y 148, 149 y con los sistemas supramoleculares 148:14, 148: 13, 148: 16 y 148: 19, a N/P 5 y 10. Se empleó pADN libre sin tratar y tratado con nucleasas como referencia. 157
- Figura 5.20.** Diámetros hidrodinámicos de los complejos de ADN formulados con 149 y con los sistemas supramoleculares 148:13, 148: 14, 148: 16 y 148: 19, con estequiometría 2:1. 159
- Figura 5.21.** Valores de potencial ζ de los complejos de ADN formulados con 149 y con los sistemas supramoleculares 148:14, 148: 13, 148: 16 y 148: 19, con estequiometría 2:1. 160
- Figura 5.22.** Viabilidad celular en células COS-7 de los complejos de ADN formulados con 149 y con los sistemas supramoleculares 148:13, 148: 14, 148: 16 y 148: 19, a N/P 5 y 10, en ausencia y en presencia de FBS. 162

- Figura 5.23.** Eficacia de transfección en células COS-7 de los complejos de ADN formulados con **149** y con los sistemas supramoleculares **148:13**, **148: 14**, **148: 16** y **148: 19**, a N/P 5 y N/P 10, en ausencia y en presencia de FBS. 163
- Figura 5.24.** Viabilidad celular en células HepG2 de los complejos de ADN formulados con **149** y con los sistemas supramoleculares **148:13**, **148: 14**, **148: 16** y **148: 19**, a N/P 5 y 10, en ausencia y en presencia de FBS. 165
- Figura 5.25.** Eficacia de transfección en células HepG2 de los complejos de ADN formulados con **149** y con los sistemas supramoleculares **148:13**, **148: 14**, **148: 16** y **148: 19**, a N/P 5 y N/P 10, en ausencia y en presencia de FBS. 166
- Chapter 6**
- Figure 6.1.** DNA synthetic vectors: aminothiourea β CD derivative (**149**) and arginino calix[4]arene derivative (**150**). 172
- Figure 6.2.** Polycationic functional groups for β CD and calix[4]arene polycationic amphiphilic derivatives. 173
- Figure 6.3.** Chemical structures of polyaminothioureido β CDs (**151**, **152** and **149**) and calix[4]arenes (**22**, **26** and **24**). 174
- Figure 6.4.** Structures of adjuvant DOPE and the synthetic vectors used as reference in transfection assays: the cationic lipid DOSPA and the cationic polymer bPEI. 175
- Figure 6.5.** ^1H and ^{13}C NMR spectra (300 MHz, 125.7 MHz, CD_3OD) of compound **26**. 178
- Figure 6.6.** Structures of polyguanidino, arginine and triazol-arginino β CDs and calix[4]arenes. 179
- Figure 6.7.** ^1H and ^{13}C NMR spectra (300 MHz, CD_3OD , 125.7 MHz, 323 K, DMSO-d_6) of **28**. 181

- Figure 6.8.** ^1H and ^{13}C NMR spectra (500 MHz, 125.7 MHz, 323 K DMSO- d_6) of **37**. 183
- Figure 6.9.** ^1H and ^{13}C NMR spectra (300 MHz, 75 MHz, CD_3OD) of **42**. 186
- Figure 6.10.** Protection of pDNA from ethidium bromide intercalation at different N/P ratios (1, 2, 5, 10 and 20) for complexes of polyaminothiourea derivatives. Naked pDNA is used for comparative purposes. 187
- Figure 6.11.** Protection of pDNA from ethidium bromide intercalation at different N/P ratios (1, 2, 5, 10 and 20) for complexes of polyguanidine derivatives. Naked pDNA is used for comparative purposes. 188
- Figure 6.12.** Hydrodynamic diameter (bars, nm) and ζ potential (lines, mV) of complexes pDNA – polycationic amphiphilic derivatives determined by DLS and M3-PALs analysis. 190
- Figure 6.13.** TEM images of: (A) **149**:pDNA, (B) **24**:pDNA and (C) **22**:pDNA complexes at N/P 10, 20 μM . 191
- Figure 6.14.** TEM images of: (A) **28**:pDNA, (B) **37**:pDNA and (C) **162**:pDNA complexes at N/P 10, 20 μM . 191
- Figure 6.15.** TEM images of: (A) **40**:pDNA, (B) **42**:pDNA. 192
- Figure 6.16.** AFM images of EGFP-C1 (4731 bp) pDNA, 0.25 nM, 2x2 μm . 193
- Figure 6.17.** AFM images in tapping mode on air showing the effects induced on EGFP-C1 plasmid DNA folding by incubation with aminothioureidos derivatives: (A) pDNA:**149** complexes N/P 10, 1.7 μM , 5x5 μm ; (B) pDNA:**24** complexes, N/P 2, 0.3 μM , 5x5 μm . (C) pDNA:**22** complexes, N/P 0.5, 0.6 μM , 5x5 μm . 193
- Figure 6.18.** AFM images images in tapping mode on air showing the effects induced on EGFP-C1 plasmid DNA folding by incubation with polyguanidino derivatives. pDNA:**28** complexes: (A) N/P 0.5, 0.17 μM , 5x5 μm ; (B) **28**, N/P 5, 1.69 μM , 5x5 μm . pDNA:**35** complexes: (C) N/P 0.5, 0.3 μM , 2x2 μm , (D) N/P 5, 2.96 μM , 5x5 μm . 194

- Figure 6.19.** AFM images of: (A) pDNA:**37** complexes N/P 0.5, 0.084 μ M, 2X2 μ m; (B) pDNA:**LGY56** complexes N/P 10, 1.69 μ M, 5x5 μ m; (C) pDNA:**150** complexes N/P 2, 2 μ M, 5x5 μ m. 195
- Figure 6.20.** *In vitro* transfection efficiency in COS-7 cells for complexes of polyaminothioureido derivatives bPEI, at N/P 5 and 10, with or without 10% serum. pDNA was tested in absence (light blue) and presence (dark blue) of 10% serum. 198
- Figure 6.21.** *In vitro* transfection efficiency in COS-7 cells for complexes of pDNA and polyguanidine derivatives and bPEI, at N/P 5 and 10, with or without 10% serum. pDNA was tested in absence (light blue) and presence (dark blue) of 10% serum. 198
- Figure 6.22.** Cytotoxicity in COS-7 cells for complexes of polyaminothioureido derivatives and branched polyethylenetriamine (bPEI) and pDNA at N/P 5 and 10, with or without 10% serum. Plasmid DNA was tested in absence (light blue) and presence (dark blue) of 10% serum. 200
- Figure 6.23.** Cytotoxicity in COS-7 cells for complexes of pDNA and polyguanidine derivatives and branched polyethylenetriamine (PEI), at N/P 5 and 10, with or without 10% serum. Plasmid DNA was tested in absence (light blue) and presence (dark blue) of 10% serum. 200
- Figure 6.24.** *In vitro* transfection efficiency and cell viability in RD-4 cells for complexes of polyaminothioureido derivatives with and without DOPE, Lipofectamine (LTX), branched polyethyleneimine (bPEI) and DOPE. 203
- Figure 6.25.** *In vitro* transfection efficiency and cell viability in RD-4 cells for complexes of polyguanidinium derivatives with and without DOPE, Lipofectamine (LTX), branched polyethyleneimine (bPEI) and DOPE. 203
- Figure 6.26.** *In vitro* transfection efficiency and cell viability in COS-7 cells for complexes of polycationic derivatives with and without DOPE, Lipofectamine (LTX), branched polyethyleneimine (bPEI) and DOPE. 204

- Figure 6.27.** *In vitro* transfection efficiency and cell viability in COS-7 cells for complexes of polyguanidinium derivatives with and without DOPE, Lipofectamine (LTX), branched polyethyleneimine (bPEI) and DOPE. 204
- Figure 6.28.** Images obtained by fluorescence microscopy of human RD-4 cells (top) and COS-7 cells (bottom) transfected (in green) upon treatment (at 48 h) with EGFP-C1 pDNA 1 nM formulated with guanidine derivatives (**28**, **35**). Images obtained by optical microscopy are also showed. 205
- Figure 6.29.** Images obtained by fluorescence microscopy of human RD-4 cells (top) and COS-7 cells (bottom) transfected (in green) upon treatment (at 48 h) with EGFP-C1 pDNA 1 nM formulated with amido-arginine CDs derivatives (**37**, **150**). Images obtained by optical microscopy are also showed. 205

Capítulo 7

- Figura 7.1.** Representación esquemática de la estructura de los surfactantes gemelos. 212
- Figura 7.2.** Surfactantes gemelos derivados de cisteína (A), espermina (B), ácidos dicarboxílicos (C), carbohidratos (D) y diaminas (E). 213
- Figura 7.3.** Surfactantes gemelos derivados de piridina. 213
- Figura 7.4.** Surfactantes gemelos derivados de hexadecil dimetil amonio. 214
- Figura 7.5.** Surfactantes gemelos con espaciadores de tipo imina. 216
- Figura 7.6.** Surfactantes gemelos derivados del colesterol. 215
- Figura 7.7.** NeoPhectin®, surfactante gemelo basado en cardiolipina. 215
- Figura 7.8.** Derivado de calixareno policatiónico anfifílico y sistema multicalixareno. 216
- Figura 7.9.** Representación esquemática de los derivados de paCD monoméricos y diméricos tipo “gémmini” y de su ordenamiento en bicapas en presencia de un ácido nucleico. 218
- Figura 7.10.** Espectro de masas en modo ESI del compuesto **44**. 222

Capítulo 8

- Figura 8.1.** Ejemplos de estructuras de conjugados CA₄-βCD: A. Sistemas preparados por Reinhoudt y col. y representación esquemática de la estructura de los agregados que forman. B. Sistemas de encapsulación de azul de metileno. 230
- Figura 8.2.** Representación de las estructuras de los heterodímeros CA₄-β-CD y de los procesos de auto-ensamblado en agua para formar nanopartículas y de modificación supramolecular para la vectorización a receptores biológicos. 231
- Figura 8.3.** Espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN (400 MHz, 100.6 MHz, CDCl₃) de **77**. 237
- Figura 8.4.** Espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN (400 MHz, 100.6 MHz, CDCl₃) de **69**. 238
- Figura 8.5.** Diámetros hidrodinámicos (nm) y potenciales ζ (mV) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) blancas preparadas a partir de los heterodímeros CA₄-βCD. 242
- Figura 8.6.** Imágenes de AFM de las nanoesferas preparadas por autoensamblado de **74** (izquierda, 5 x 5 μm; derecha, 1.5 x 1.5 μm). 243
- Figura 8.7.** Imágenes de AFM (5 x 5 μm) de las nanoesferas preparadas por autoensamblado de **71**, estructura fina (0.7 x 0.7 μm) y representación esquemática de los agregados, las nanoesferas y modelo molecular 3D del heterodímero. 243
- Figura 8.8.** Estructura del fármaco Diazepam . 244
- Figura 8.9.** Diámetros hidrodinámicos (nm) y potenciales ζ (mV) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) cargadas con DZ, preparadas a partir de los heterodímeros CA₄-βCD. 246
- Figura 8.10.** Perfiles de liberación de DZ a partir de nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) formuladas con los heterodímeros metilados **71**, **74**, **77** y **80**, en PBS (pH 7.4), a 37 °C. 247

- Figura 8.11.** Perfiles de liberación de DZ a partir de nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) formuladas con los heterodímeros hidroxilados **70** , **73**, **76** y **79**, en PBS (pH 7.4), a 37 °C. 248
- Figura 8.12.** Estructura del fármacodocetaxel (DXT). 248
- Figura 8.13.** Perfiles de liberación de DXT a partir de nanoesferas (NS) y nanocápsulas(NC) formuladas con los heterodímeros de espaciador corto **71** , **74** y **70**, en PBS (pH 7.4), a 37 °C. 250
- Figura 8.14.** Perfiles de liberación de DXT a partir de nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC), formuladas con los heterodímeros **71** y **74**, en PBS (pH 7.4), a 37 °C, y representación esquemática de los modos de encapsulación y liberación del DXT. 251
- Figura 8.15.** Representación esquemática del ensayo ELLA modificado para medir la afinidad de las nanopartículas unidas al glicoligando de manosa frente al receptor humano de manosa de macrófagos (hMMR). 255
- Figura 8.16.** Inhibición de la asociación del manano de levadura hacia la MMR humana de nanoesferas preparadas a partir de **71** y **74** en presencia de de concentraciones crecientes del ligando manosilado **84**. 256
- Figura 8.17.** Inhibición de la asociación de hMMR a manano por **84** y por nanoesferas de los heterodímeros **71** y **74** funcionalizadas **84**, en ausencia o en presencia de un exceso de adamantano-1-carboxilato sódico. 258

Capítulo 9

- Figura 9.1.** Representación esquemática de de los diferentes mecanismos implicados en el efecto minicluster para una estequiometría ligando-lectina 1:1. A) Enlace y recaptura. B) Interacción de un segundo ligando en un sitio secundario de la lectina; c) Interacciones adicionales no específicas. 266
- Figura 9.2.** Estructura de los galactósidos **89-88** y de las plataformas glucosiladas **88-89** utilizadas para el acoplamiento via “click chemistry”. 269

- Figura 9.3.** Gráficas ELLA para los conjugados galactosilados con espaciadores cortos (a), medios (b) y largos (c); (d) valores de IC_{50} (μM) para los conjugados galactosilados; (e) potencias relativas en base molar de galactosa. 271
- Figura 9.4.** a) Capacidad de entrecruzamiento entre la PNA y la HRP-PNA para conjugados de galactosa determinados por ensayo ELLA de tipo “sándwich”. b) Capacidad relativa de entrecruzamiento (%) a 1400 μM . 274
- Figura 9.5.** Experimentos DLS con la lectina marcada HRP-PNA y ligandos multivalentes con espaciadores medios- (a) o largos (b). 276
- Figura 9.6.** a) Variaciones de absorción de la PNA, a $\lambda = 490$ nm, tras la adición de los multigalactósidos, en función del tiempo. Los compuestos **95-97**, **101-103** y **107-108** no promueven la agregación con PNA en estas condiciones. b) Velocidades iniciales de agregación para los conjugados heptavalentes **113-115**. 277
- Figura 9.7.** Histogramas de distribución obtenidos mediante espectroscopía de fuerza usando puntas de AFM modificadas con el ligando **101** en ausencia (a) o en presencia (b) de galactosa libre. 279
- Figura 9.8.** Resultados DFS obtenidos con los ligandos.

RELACIÓN DE ESQUEMAS**Capítulo 3**

- Esquema 3.1.** Funcionalización regioselectiva de la α CD descrita por Sollogoub. 52
- Esquema 3.2.** Desililación regioselectiva de la cara primaria de CDs sililadas descrita por Ling. 52
- Esquema 3.3.** Funcionalización selectiva de dos posiciones en la cara primaria de la CD descrita por Toupet. 53
- Esquema 3.4.** Monotosilación en O-2 de la β CD descrita por Defaye. 54
- Esquema 3.5.** Funcionalización regioselectiva en la cara secundaria de la CD descrita por Estour. 5 4
- Esquema 3.6.** Síntesis regioselectiva de derivados de CDs xililenadas **137, 138 y 139.** 56

Capítulo 4

- Esquema 4.1.** Preparación de las paCDs **6 y 8** y de sus análogos dimerizables **3 y 5.** 99
- Esquema 4.2.** Oxidación de luciferina catalizada por luciferasa. 119

Capítulo 5

- Esquema 5.1.** Síntesis de los derivados de bis-adamantano **9, 10, 11 y 12.** 129
- Esquema 5.2.** Síntesis de los derivados de bis-adamantano **13 y 14.** 129
- Esquema 5.3.** Síntesis de los derivados de bis-adamantano **16 y 19.** 130

Chapter 6

- Scheme 6.1.** Schematic representation of preparation of polyaminothioureido β CD derivatives **151, 152 y 149.** 176
- Scheme 6.2.** Synthesis of polyaminothioureido calix[4]arenes **24, 26 and 22.** 177

Scheme 6.3. Synthesis of polyguanidino β CD derivatives 28 and 35 .	180
Scheme 6.4. Synthesis of polyamidoarginine β CD derivative 37 .	182
Scheme 6.5. Synthesis of polytriazolamidoargininecalix[4]arene 42 .	185
Scheme 6.5. Synthesis of polytriazolamidoargininecalix[4]arene 42 .	186

Capítulo 7

Esquema 7.1. Preparación de los homodímeros de CDs policatiónicas	217
Esquema 7.2. Monorreducción de una poliazida de calixareno. Reactivos y condiciones: a) 1,3-propanoditiol, NaBH ₄ , DMF, ta, 24 h, 17%.	219
Esquema 7.3. Preparación de los dímeros de calixarenos homodiméricos	220
Esquema 7.4. Preparación de los dímeros de calixarenos homodiméricos	221

Capítulo 8

Esquema 8.1. Preparación de los derivados de CA ₄ <i>O</i> -hexilados.	233
Esquema 8.2. Preparación de los derivados de CA ₄ <i>O</i> -dodecilados.	233
Esquema 8.3. Preparación de las β CD per-acetiladas 62 y 64 .	234
Esquema 8.4. Preparación de las β CD permetiladas 66 y 68 .	235
Esquema 8.5. Preparación de los heterodímeros CA ₄ - β CD anfifílicos neutros.	236
Esquema 8.6. Preparación del conjugado de adamantano-manosa 82 .	252

Capítulo 9

Esquema 9.1. Preparación de los gliconjugados 92-119 . Reactivos y condiciones: a) MeOH, 7 N NH ₃ , 24 h, t.a., 51-78%.	269
Esquema 9.2. Preparación de los gliconjugados 110-115 . Reactivos y condiciones: a) MeOH, 7 N NH ₃ , 24 h, t.a., 51-78%.	270

RELACIÓN DE TABLAS**Capítulo 3**

Tabla 3.1. Constantes de asociación (K) y parámetros R_{∞} y polaridad de la cavidad de la CD (ϵ) obtenidos por medidas de estado estacionario a 25 °C. 72

Tabla 3.2. Valores de ΔH° y de ΔS° durante los procesos de complejación para el 2MN con 140-142 y 137-139. 76

Tabla 3.3. Coordenada y del centro de masas del 2MN (d), distancia naftaleno-xilileno (d') y energías de interacción para las estructuras de mínima energía de de los complejos 1:1 de 2MN:140-142 y 2MN:137-139 (aproximaciones P y NP), obtenidas por MM. 81

Tabla 3.4. Coordenada y del centro de masas del 2MN (d), distancia naftaleno-xilileno (d') y valores promedio de energías de interacción para las estructuras de mínima energía de de los complejos 1:1 de 2MN:140-142 y 2MN:137-139 (aproximaciones P y NP), obtenidas por DM. 86

Capítulo 4

Tabla 4.1. ΔH° , ΔS° y constantes de equilibrio (K) asociados al proceso de dimerización del derivado 3 a pH 5.5 y pH 7.4, a 25 °C. 106

Tabla 4.2. Tamaños hidrodinámicos (nm), índices de polidispersidad (PI) y potenciales ζ (mV) para los CDplejos formulados con los derivados 3, 5, 6 y 8 y p ADN, a N/P 10. 117

Capítulo 5

Tabla 5.1. Parámetros termodinámicos de la interacción entre derivados de adamantano (9, 11-14, 16 y 19) y la CD 148 determinados por ITC a 25 °C. 142

Tabla 5.2. Distancias, energías de interacción y contribuciones energéticas para las MBE especies 148:13-ADN obtenidas por MM y para las estructuras obtenidas al

final de la trayectoria de DM, por aproximación del ADN por el surco mayor o menor. 153

Tabla 5.3. Diámetros hidrodinámicos, desviación estándar, índices de polidispersidad (PI) y potencial ζ , a N/P 5 y 10, de los complejos de ADN formulados con **149** y con los sistemas supramoleculares **148:13**, **148: 14**, **148: 16** y **148: 19**, con estequiometría 2:1. 158

Chapter 6

Table 6.1. Hydrodynamic sizes (nm) \pm SD and polydispersity index of complexes pDNA-polycationic amphiphilic derivatives. 189

Table 6.2. ζ Potential (mV) \pm SD of complexes pDNA-polycationic amphiphilic derivatives. 189

Capítulo 8

Tabla 8.1. Diámetros hidrodinámicos (nm) e índices de polidispersidad (PI) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) blancas preparadas a partir de los heterodímeros CA₄- β CD. 241

Tabla 8.2. Potencial ζ (mV) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) blancas preparadas a partir de los heterodímeros CA₄- β CD. 241

Tabla 8.3. Diámetros hidrodinámicos (nm) e índices de polidispersidad (PI) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) cargadas con DZ, preparadas a partir de los heterodímeros CA₄- β CD. 244

Tabla 8.4. Potencial ζ (mV) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) cargadas con DZ, preparadas a partir de los heterodímeros CA₄- β CD. 245

Tabla 8.5. Rendimiento de encapsulación de DZ (%) de las nanoesferas (NS) y las nanocápsulas (NC) preparadas a partir de los heterodímeros CA₄- β CD. 246

- Tabla 8.6.** Diámetros hidrodinámicos (nm) e índices de polidispersidad (PI) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) cargadas con DXT, preparadas a partir de los heterodímeros **71**, **74** y **70**. 249
- Tabla 8.7.** Potencial ζ (mV) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) cargadas con TXT, preparadas a partir de los heterodímeros CA₄- β CD **71**, **74** y **70**. 249
- Tabla 8.8.** Rendimiento de encapsulación de DXT (%) de las nanoesferas (NS) y las nanocápsulas (NC), preparadas a partir de los heterodímeros CA₄- β CD **71**, **74** y **70**. 249
- Tabla 8.9.** Diámetros hidrodinámicos (nm), índices de polidispersidad y potenciales ζ (mV) de nanoesferas (NS) blancas a partir de **71** y **74** con un 30 y 60% del glicoligando **84**. 254

Capítulo 9

- Tabla 9.1.** Parámetros de Bell determinados para diferentes glicoligandos. 281

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

Publicaciones.

1) *Glycoligand-targeted core-shell nanospheres with tunable drug release profiles from calixarene-cyclodextrin heterodimers.* Gallego-Yerga, L.; Lomazzi, M.; Sansone, F.; Ortiz Mellet, C.; Casnati, A.; García-Fernández, J. M. *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 7440-7443.

2) *Dynamic self-assembly of polycationic clusters based on cyclodextrins for ph-sensitive dna nanocondensation and delivery by component design.* Gallego-Yerga, L.; González-Álvarez, M. J.; Mayordomo, N.; Santoyo-González, F.; Benito, J. M.; Ortiz Mellet, C.; Mendicuti, F.; García-Fernández, J. M. *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 6622-6627.

3) *Probing the Nature of the Cluster Effect Observed with Synthetic Multivalent Galactosides and Peanut Agglutinin Lectin.* Almant, M.; Mastouri, A.; Gallego-Yerga, L.; García-Fernández, J. M.; Ortiz Mellet, C.; Kovensky, J.; Morandat, S.; El Kirat, K.; Gouin, S. G. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 729- 738.

4) *Competitive processes of a chromophore modified α -cyclodextrin in the presence of a fluorescence polarity sensitive probe.* Mayordomo, N.; González-Álvarez, M. J.; Gallego-Yerga, L.; Ortiz Mellet, C.; García-Fernández, J. M.; Mendicuti, F. *J. Photochem. Photobiol., A* **2013**, 256, 42-51.

5) *Improving inclusion capabilities of permethylated cyclodextrins by appending a cap-like aromatic moiety.* González-Álvarez, M. J.; Mayordomo, N.; Gallego-Yerga, L.; Ortiz Mellet, C.; Mendicuti, F. *Tetrahedron* **2012**, 68, 2961-2972.

Comunicaciones en congresos.

1) Póster.

Gallego Yerga, L.; Lomazzi, M.; Sansone, F.; Casnati, A.; Ortiz Mellet, C.; Casnati, A.; García Fernández, J. M.

Glycotargeted self-assembled nanocarriers from calixarene-cyclodextrin heterodimers for site-specific delivery of docetaxel.

9th ISMSC 2014: The International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, Shangai (China), **June-2014.**

2) Comunicación oral.

Gallego Yerga, L.; Sansone, F.; Ortiz Mellet, C.; Casnati, A.; García Fernández, J. M.

Glycotargeted self-assembled nanocarriers from calixarene-cyclodextrin heterodimers for site-specific delivery of docetaxel.

11th Carbohydrate Symposium – RSEQ, Logroño (Spain), **May-2014.**

3) Póster.

Gallego Yerga, L.; Lomazzi, M.; Franceschi, V.; Sansone, F.; Ortiz Mellet, C.; Gaetano, D.; Casnati, A; García Fernández, J. M.

Molecular gene delivery systems based on calixarenes and cyclodextrins: effect of structural modifications on pdna complex stability and gene expression.

2nd Meeting of the Chemical Biology Group - RSEQ, Bilbao (Spain), **February-2014.**

4) Comunicación oral.

Gallego Yerga, L.; Pflueger, I.; Tros de Ilarduya, C.; Benito Hernández, J. M.; Ortiz Mellet, C.; García-Fernández, J. M.; Mendicuti, F.

Cyclodextrin-based multicomponent gene vectors: optimizing nanoparticle self-assembling and site-specific gene delivery.

28th GTRV Scientific Meeting (GTRV: Group of research on vectorization, *Groupe Thématique de Recherche sur la Vectorisation*). Orleans (France), **December-2013**.

5) Comunicación oral.

Gallego Yerga, L., García Fernández, J. M., Ortiz Mellet, C.

Cyclodextrins-based synthetic vectors for gene therapy. Comunicación en congreso. MultiGlycoNano COST Action CM1102, Workshop “Structural glycosciences”. Grenoble (France), **November-2013**.

6) Póster.

Gallego Yerga, L.; Sansone, F.; Casnati, A.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; *Self-assembled cyclodextrin and calixarene-based multicavity systems for drug delivery*. 1st joint CSIC-CNRS workshop "Nanomaterials for Health". Madrid (Spain), **November-2013**.

7) Comunicación oral.

Gallego Yerga, L.; Sansone, F.; Casnati, A.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; *Polycationic amphiphilic cyclodextrin and calixarene-based gene vectors*. MultiGlycoNano COST Action CM1102, Parma (Italy), **October-2013**.

8) Póster.

Gallego Yerga, L.; Méndez Ardoy, A.; Benito Hernández, J. M., García Fernández, J. M., Ortiz Mellet, C.
Preorganized cyclodextrin dimerization drives pDNA complexation and transfection into COS-7 cells.

27th GTRV Scientific Meeting, Chilli-Mazarin (Paris, France), **December-2012**.

9) Comunicación oral.

Gallego Yerga, L.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Benito Hernández, J. M.; Méndez Ardoy, A.

Preorganizing cyclodextrins for DNA complexation through selective chemical functionalization.

24th Biennial Meeting of Organic Chemistry - RSEQ, San Sebastián (Spain), **July-2012.**

10) Comunicación flash.

Gallego Yerga, L.

Comparative study of calixarene and cyclodextrin-based vectors for gene delivery.

MultiGlycoNano COST Action CM1102, Birmingham (UK), **September-2012.**

11) Póster.

Ortega Caballero, F.; Gómez García, M.; Gallego Yerga, L.; Ortiz Mellet, C.; Nieto Mesa, P. M., García Fernández, J. M.

Phenylsulfonylethylidene acetals: selective protection of diol segments in carbohydrates.

10th Carbohydrate Symposium – RSEQ. Granada (Spain), **September-2010.**

In this Thesis we explore the properties of supramolecular entities based on β -cyclodextrins and calix[4]arenes to form self-assembling nanosystems and its application in targeted drug delivery and gene therapy. Several strategies have been developed to provide the systems different ways to self-organize in water and encapsulate a bio-active molecules (drug or gene material), target specific cell surface receptors and allow the gradual release of the payload. Selective and efficient functionalization methods have been used to synthesize well-defined macromolecules to perform structure-activity relationship studies. Physico-chemical studies have enabled to establish the mechanisms at play and biological assays have been used to select the best candidates for each application.

SELF-ASSEMBLED SYSTEMS FOR TARGETED DRUG DELIVERY

1. L. Gallego-Yerga, M. Lomazzi, F. Sansone, C. Ortiz Mellet, A. Casnati, J. M. García Fernández. Glycoligand-targeted core-shell nanospheres with tunable drug release profiles from calixarene-cyclodextrin heterodimers. *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 7440-7443.

2. M. Almant, A. Mastouri, L. Gallego-Yerga, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, J. Kovensky, S. Morandat, K. El Kirat, S. G. Gouin. Probing the nature of the cluster effect observed with synthetic multivalent galactosides and peanut agglutinin lectin. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 729-738.

Success in administration of therapeutic agents relies on the development of drug delivery systems able to improve bioavailability of insoluble or biodegradable drugs and avoid secondary effects through targeted transport. Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides having the property to complex hydrophobic molecules in their cavity and thus solubilize them in water media, which has been extensively exploited by the

pharmaceutical industry. The design based on the formation of inclusion complexes has two limitations : only molecules adapted to the size of the cavity can be encapsulated and the stoichiometry is restricted to 1 : 1 host-guest ratio. Moreover, they're not ideal carriers since they lack target capabilities towards biological receptors. The development of well-ordered functional nanostructures filled with the capacity to assemble under dilute conditions in water or buffer media represent an interesting alternative for the construction of more versatile drug delivery systems. The strategy involves the creation of new hydrophobic nanocavities with the possibility to encapsulate a larger amount of drug molecules without size limitations.

Monodisperse building blocks of the calix[4]arene (CA₄) and β-cyclodextrin (βCD) families are privileged platforms towards this end because of their capacity to form host-guest superstructures and the possibility to be tailored to achieve a predictable and controlled non-covalent organization. We have succeeded for the preparation of neutral amphiphilic CA₄—βCD heterodimers. They are able to self-assemble in water to afford nanoparticles having an inner core formed by hydrophobic CA₄ units and an external hydrophilic shell exposing βCD. The CA₄ scaffold is very well suited to promote tight packing of fatty chains installed at the narrower ring in its cone conformation, providing a lipid matrix where hydrophobic drugs can be entrapped, whereas the presence of hydrophilic βCD moieties at the nanosphere surface allows nanoparticle solubilization in water as well ligand incorporation by inclusion complex formation. The potential of the new systems in nanomedicine is illustrated by their capacity to encapsulate and provide sustained release of the anxiolytic drug Diazepam and the anticancer agent docetaxel, and undergo supramolecular surface post-modification with adamantane-armed glycoligands targeting the human macrophage mannose receptor.

In order to optimize the bio-recognition properties of glycoligands used in target drug delivery, the molecular basis of cluster effect observed in multivalent carbohydrate-lectin interactions has been studied. A set of multigalactosides with valencies ranging from one to seven and different spacer arm lengths have been prepared. The binding affinity of multimers, assessed by an enzyme-linked lectin assay (ELLA) toward the peanut agglutinin (PNA), was shown to be dependent on the spacer-arm length. The cluster effect observed for the galactosides bearing the longest linkers can be explained by their ability to cross-link PNA lectin as “sandwich” ELLA and Dynamic Light scattering (DLS) experiments also revealed. However, the multigalactosides having the shortest linkers are not able to cross-link the protein but exhibited highest cluster effect than their short-spacer counterparts. Atomic force microscopy and dynamic force microscopy demonstrated that a bind-and-recapture process favoured by the high ligand local concentration effect is the mechanism at play. It consists of a dynamic turnover of the tethered galactosides in the PNA binding sites.

SELF-ASSEMBLED SYSTEMS FOR GENE DELIVERY

3. L. Gallego-Yerga, M. J. González-Álvarez, N. Mayordomo, F. Santoyo-González, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández. Dynamic self-assembly of polycationic clusters based on cyclodextrins for pH-sensitive DNA nanocondensation and delivery by component design. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6622 – 6627.

4. Natalia Mayordomo, M. J. González-Álvarez, L. Gallego Yerga, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti. Competitive processes of a chromophore modified α -cyclodextrin in the presence of a fluorescence polarity sensitive probe. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **2013**, *256*, 42-51.

5. M. J. González-Álvarez, N. Mayordomo, L. Gallego-Yerga, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, Improving inclusion capabilities of permethylated cyclodextrins by appending a cap-like aromatic moiety. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2961-2972.

Gene therapy is a promising strategy for the treatment of a wide range of diseases. The therapeutic objective is to introduce DNA in a cell leading to expression or suppression of a desired protein. However, free DNA has low membrane permeability and metabolic instability, so the development of gene vectors able to compact and protect gene material is required. In spite the superior transfection properties of viral vectors, bio-security concerns have led to the development of nonviral vectors. Most of synthetic vectors reported in literature are based on polymeric systems whose disperse nature represent an important handicap for fundamental studies and applications. As an alternative, we have developed monodisperse molecules able to self-assemble to complex, condense and protect DNA from the environment and delivery it into cells. Selective functionalization methods have been used to prepared facial amphiphilic synthetic vectors bearing polycationic domains able to give multiple interactions with phosphate groups of nucleotides and hydrophobic functional groups that provided them tunable self-assembling properties for the condensation and controlled delivery of gene material. Both β -cyclodextrin (β CD) and calix[4]arene (CA_4) scaffolds have been exploited for these purposes.

A first generation of self-assembling non-viral gene-delivery systems was designed by the installation of a capping xylylene moiety at the secondary face of polycationic β CD derivative. Xylylene-cyclodextrin derivatives are able to self-assemble in water media to afford dimers where hydrophobic interactions are the driving forces. Steady-state and time-resolved fluorescence techniques as well as molecular mechanics and molecular dynamics calculations, have been employed in the study of the complexation of methyl 2-naphthalenecarboxylate (2MN), a fluorescent probe, by neutral xylylenated cyclodextrins, which have also the capability of dimerize. The influence of

the xylylene moiety was assessed by comparing the data of 2MN complexation by xylylenated derivatives with those obtained for their non-xylylenated counterparts. This preliminary study was accomplished to further understand the molecular basis of complexation processes of xylylene-CD derivatives with other interesting guests (gene material) when competitive association processes between the vectors are involved.

When incorporated in polycationic cyclodextrins, the xylylene moiety was found to promote pH-dependent supramolecular dimerization, as fluorescence, NMR and circular dichroism experiments demonstrated. The dimers undergo reversible DNA condensation to afford nanocomplexes observed by transmission electron microscopy (TEM). Such preorganization strategy facilitates DNA-templated self-assembly into bilayers at neutral pH. Conversely, acidification destabilizes the dimers and, consequently, the whole CD-DNA supramolecular edifice. The dynamic and reversible character of the interactions at play allows both condensation and delivery of gene material. Xylylenated derivatives showed higher transfection efficiency in COS-7 cells than their permethylated homologous suggest that DNA release might be environmentally favored upon cell internalization by the acidity increase in endosomes.

A second strategy to provide cyclodextrins self-assembling capabilities is based on the design of ternary systems consisting of 2:1 inclusion complexes of bis-adamantane derivatives and per-cisteaminyl- β CD. The high affinity of adamantane moiety for the CD cavity allowed to supramolecular attachment of two units of polycationic CD units thus preventing functionalization of secondary face with hydrophobic self-assembly-promoting motifs, which simplifies the number of synthetic steps. The thermodynamics of the complexes has been studied by NMR, Isothermal Titration Calorimetry (ITC) and computational calculations. The supramolecular systems complexed plasmid DNA (pDNA) into spherical and homogeneous nanoparticles that protected DNA from degradation by nucleases. Transfection of COS-7 and HepG2 cells confirmed the superiority of the ternary complexes respect the individual non-amphiphilic polycationic CD in achieving high transfection profiles. Their gene delivery capabilities were higher

even than the reference polycationic vector, polyethylenimine, and toxicity levels were negligible.

A third generation of self-assembled synthetic vectors was prepared by installing segregated cationic and lipophilic domains on β -CD and CA₄ scaffolds. This allowed the access to polycationic amphiphilic CDs and CAs (paCDs and paCAs) able to self-organize in the presence of nucleic acid into transfectious nanocondensates (calixplexes and CDplexes, respectively) in which the gene material is fully protected from the environment. The cationic clusters interact with nucleotides whereas the lipophilic chains help to compaction through hydrophobic interactions. Transmission electron microscopy (TEM) images of the better performing representatives revealed a snake-like structure that was consistent with alternating DNA and facial amphiphile bilayers. In both series the capacity to form nanocomplexes was confirmed by atom force microscopy (AFM). Homogeneity can be preserved at the molecular level in structurally related series of compounds by implementing selective chemical functionalization methodologies, offering unprecedented opportunities for structure-activity relationship studies. The incorporation of arginine motifs has been found particularly beneficial in the calix series, whereas a combination of amine and thiourea groups was privileged for CD-based amphiphiles. In view of identifying optimal candidates, contrasting the conclusions inferred from research on CA₄ versus β CD vectors in the same cell systems was highly sought. We have conducted a parallel evaluation of the ability of calix- and CD-based polycationic facial amphiphiles sharing equivalent cationic heads to behave as efficient gene delivery systems in the primate cell line COS-7 and human Rhabdomyosarcoma (RD-4) cells. Such three-dimensional arrangement is hold together by the interplay of electrostatic and hydrophobic interactions that act cooperatively in the confined space between DNA segments. A comparative analysis of the transfection and cell viability data has been accomplished.

Finally, a fourth generation of synthetic vectors based on gemini surfactant structure has been designed. Polycationic amphiphilic calix[4]arene dimers covalently

linked by a spacer has been synthesized. These compounds are expected to exhibit enhanced transfection capabilities respect to their corresponding monomer units as a result of a chelate effect and a decrease of bio-active concentration due to a smaller micelar critical concentration. The selective functionalization methodologies used in the preparation of these new dimers can be extended to prepare gemini surfactants in order to optimize the transfection properties of monomeric derivatives.

En esta Tesis exploramos las propiedades de entidades moleculares basadas en β -ciclodextrinas y calix[4]arenos para formar sistemas autoensamblados y sus aplicaciones en la liberación dirigida de fármacos y material génico. Se han puesto a punto diferentes estrategias para dotar a los sistemas de propiedades de auto-organización en agua y para encapsular moléculas bioactivas (fármacos o genes), vectorizarlos hacia receptores celulares específicos y permitir la liberación gradual de la carga. Se han empleado métodos de funcionalización selectivos y eficientes para sintetizar macromoléculas bien definidas y llevar a cabo estudios de relación estructura-actividad. Se han llevado a cabo estudios fisicoquímicos, para establecer los mecanismos de acción de los sistemas estudiados, y ensayos biológicos con el objetivo de seleccionar los mejores candidatos para cada aplicación.

SISTEMAS AUTO-ENSAMBLADOS PARA LA LIBERACIÓN DIRIGIDA DE GENES Y FÁRMACOS

1. L. Gallego-Yerga, M. Lomazzi, F. Sansone, C. Ortiz Mellet, A. Casnati, J. M. García Fernández. Glycoligand-targeted core-shell nanospheres with tunable drug release profiles from calixarene-cyclodextrin heterodimers. *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 7440-7443.
2. M. Almant, A. Mastouri, L. Gallego-Yerga, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, J. Kovensky, S. Morandat, K. El Kirat, S. G. Guin. Probing the nature of the cluster effect observed with synthetic multivalent galactosides and peanut agglutinin lectin. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 729-738.

El éxito en la administración de agentes terapéuticos se basa en el desarrollo de sistemas de liberación de principios activos capaces de mejorar la biodisponibilidad de fármacos insolubles o biodegradables y evitar efectos secundarios mediante transporte dirigido. Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos que tienen la propiedad de complejar moléculas hidrofóbicas en la cavidad y solubilizarlas en medio acuoso, lo que ha sido extensamente empleado en la industria farmacéutica. El diseño basado en la formación de complejos de inclusión presenta dos limitaciones: sólo las moléculas adaptadas al tamaño de la cavidad pueden ser encapsuladas, y la estequiometría está limitada a una relación huésped-anfitrión 1:1. Además, las CDs nativas no son transportadores ideales ya que carecen de propiedades de vectorización hacia receptores biológicos. El desarrollo de nanoestructuras funcionales con capacidad de auto-ensamblarse en condiciones diluídas en agua o medio acuoso tamponado representa una alternativa importante para la construcción de sistemas de liberación de fármacos más versátiles. La estrategia implica la creación de nuevas nanocavidades hidrofóbicas que tienen la posibilidad de encapsular una mayor cantidad de moléculas sin limitaciones de tamaño.

Los derivados de calix[4]arenes (CA_4) y de β -ciclodextrina (β CD) son plataformas privilegiadas para esta finalidad debido a su capacidad de formar superestructuras huésped-anfitrión. Así mismo, tienen la posibilidad de ser funcionalizadas para promover su pre-organización controlada a través de interacciones no covalentes. Por ello, hemos desarrollado una síntesis muy eficiente para preparar heterodímeros anfifílicos neutros de CA_4 - β CD que son capaces de auto-organizarse en agua para dar nanopartículas. Estas nanopartículas presentan un núcleo interno formado por unidades hidrofóbicas de CA_4 y una capa externa constituida por unidades hidrofílicas de CDs. Los fragmentos de CA_4 promueven el empaquetamiento compacto de cadenas grasas instaladas en la cara inferior del macrociclo en conformación de cono, proporcionando una matriz lipídica donde pueden ser encapsuladas las moléculas hidrofóbicas del

fármaco. Por otra parte, las unidades de β CD de la superficie de la nanopartícula permite la solubilización del sistema en agua así como la incorporación de ligandos mediante la formación de complejos de inclusión. La capacidad de estos sistemas para encapsular y dar lugar a una liberación controlada de diazepam y docetaxel, así como de ser post-modificados supramolecularmente con glicoligandos derivados de adamantano que reconocen al receptor de manosa de macrófagos humanos, ilustra el potencial que tienen estos nuevos sistemas en nanomedicina.

Para optimizar las propiedades de bio-reconocimiento de los glicoligandos empleados en la liberación dirigida de fármacos, se ha llevado a cabo un estudio sobre las bases moleculares del efecto multivalente observado en las interacciones carbohidrato-lectinas. Para ello, se han preparado una serie de multigalactósidos con valencias entre una y siete, y con diferentes longitudes de espaciador. La afinidad de unión a lectinas de los multímeros, evaluada mediante ensayos ELLA (*Enzyme-linked Lectin Assay*) usando la lectina de cacahuete PNA (*Peanut Agglutinin*), fue dependiente de la longitud del espaciador. El efecto multivalente observado en los galactósidos con los espaciadores más largos fue explicado por su capacidad para entrecruzar la lectina PNA, determinado mediante experimentos ELLA tipo “sándwich” y ensayos de dispersión dinámica de la luz (DLS). EL mayor efecto multivalente mostrado por los galactósidos de espaciadores más cortos fue estudiado por microscopía de fuerza atómica (AFM), que demostró que el responsable de este comportamiento es un mecanismo de unión y captura de los ligandos en los sitios activos de la lectina.

SISTEMAS AUTO-ENSAMBLADOS PARA LA LIBERACIÓN DE MATERIAL GÉNICO

3. L. Gallego-Yerga, M. J. González-Álvarez, N. Mayordomo, F. Santoyo-González, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández. Dynamic self-assembly of polycationic clusters based on cyclodextrins for ph-sensitive dna nanocondensation and delivery by component design. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6622 – 6627.

4. Natalia Mayordomo, M. J. González-Álvarez, L. Gallego Yerga, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti. Competitive processes of a chromophore modified α -cyclodextrin in the presence of a fluorescence polarity sensitive probe. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **2013**, *256*, 42-51.

5. M. J. González-Álvarez, N. Mayordomo, L. Gallego-Yerga, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, Improving inclusion capabilities of permethylated cyclodextrins by appending a cap-like aromatic moiety. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2961-2972.

La terapia génica es una estrategia prometedora para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades. El objetivo terapéutico es introducir ADN en una célula para expresar o suprimir la expresión de una proteína deseada. Sin embargo, el ADN libre tiene una baja permeabilidad de la membrana e inestabilidad metabólica, por lo que se requiere el desarrollo de vectores de genes capaces de compactar y proteger el material génico es imprescindible. A pesar de las propiedades superiores que presentan los sistemas transfección de vectores virales, los problemas de bioseguridad asociados han llevado al desarrollo de vectores no virales. La mayoría de los vectores sintéticos recogidos en la literatura se basan en sistemas poliméricos cuya naturaleza dispersa representa una desventaja importante para los estudios y aplicaciones fundamentales. Como alternativa, hemos desarrollado moléculas monodispersas capaces de auto-ensamblarse para complejar, condensar y proteger el ADN y la liberarlo en las células. Se

han desarrollado métodos de funcionalización selectiva para preparar vectores sintéticos con anfifilicidad facial, que tienen dominios policationicos capaces de dar múltiples interacciones con los grupos fosfato de los nucleótidos y grupos funcionales hidrófobos que les proporcionan propiedades de autoensamblado para la condensación y la liberación controlada de material génico. Con estos fines hemos utilizado las plataformas de ciclodextrinas y de calix[4]arenos.

Se ha diseñado una primera generación de sistemas de suministro de genes no virales auto-ensamblados mediante la instalación de un grupo xilileno en la cara secundaria de CDs policationicas. Los derivados CDs xililenados son capaces de auto-ensamblarse en agua para producir dímeros donde las interacciones hidrofóbicas son las fuerzas impulsoras. Se han empleado técnicas de fluorescencia, mecánica molecular y dinámica molecular para estudiar la formación de complejos de metil 2-naftalencarboxilato (2MN), una sonda fluorescente, con ciclodextrinas neutras xililenadas que tienen también la capacidad de dimerizar. La influencia del motivo de xilileno se evaluó mediante la comparación de los datos de 2MN complejación por derivados xililenados con los obtenidos por sus homólogos no xililenados. Este estudio preliminar se llevó a cabo para entender mejor las bases moleculares de los procesos de formación de complejos de derivados de CD xililenadas con otros huéspedes, como fármacos o material génico, cuando están implicados procesos de asociación que compiten con los equilibrios de complejación.

Cuando se incorporó el fragmento de xilileno en ciclodextrinas policationicas, el anillo aromático fue capaz de promover un proceso de dimerización supramolecular dependiente del pH, tal y como demostraron los experimentos de fluorescencia, RMN y dicroísmo circular. La capacidad de los dímeros de condensar ADN de manera reversible para formar nanocomplejos fue observada por microscopía de transmisión electrónica (TEM). Tal estrategia de preorganización facilita el auto-ensamblaje de los dímeros en presencia de ADN para formar complejos a un pH neutro. La acidificación desestabiliza los dímeros y, en consecuencia, el conjunto supramolecular de CD-ADN. El carácter

dinámico y reversible de las interacciones en juego permite tanto la condensación como la liberación del material génico en la célula. La mayor eficiencia de transfección en células COS-7 exhibida por los derivados xililenados en comparación con sus homólogos permitilados, sugieren que la liberación de ADN en el citoplasma podría ser favorecido por el aumento de la acidez en los endosomas.

Una segunda estrategia para proporcionar ciclodextrinas con capacidad de auto-ensamblaje se basa en el diseño de sistemas ternarios consistentes en complejos de inclusión, con estequiometría 2:1, de derivados de bis-adamantano y de cisteaminil- β CD. La alta afinidad del fragmento de adamantano por la cavidad de CD permite el anclaje supramolecular a dos unidades CD policatiónicas, con lo que no es necesaria la funcionalización de la cara secundaria de la CD con cadenas lipofílicas para promover la auto-asociación, lo que simplifica el número de etapas sintéticas. La termodinámica de los complejos se ha estudiado mediante RMN, valoración por calorimetría isotérmica (ITC) y cálculos computacionales. Los sistemas supramoleculares complejan el ADN del plásmido (pADN) para dar nanopartículas esféricas y homogéneas que protegen el ADN de la degradación por nucleasas. La transfección de células COS-7 y HepG2 confirmó la superioridad de los complejos ternarios respecto la CD policatiónica no anfifílica. Su capacidad de liberación de genes fue superior incluso que la del vector policatiónico polietilenimina (PEI), y los niveles de toxicidad fueron despreciables.

Se preparó una tercera generación de vectores sintéticos auto-ensamblados mediante la instalación, sobre plataformas de β CD y CA₄, de dominios catiónicos y lipófilos separados. Esto permitió el acceso a derivados anfifílicos policatiónicos capaces de auto-organizarse en presencia de ácidos nucleicos para dar nanocondensados en el que el material génico está completamente protegido del medio. Los grupos catiónicos interactúan con los nucleótidos mientras que las cadenas lipófilas ayudan a la compactación a través de interacciones hidrófobas. Imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) revelaron una estructura consistente con un ordenamiento en el que se alternan las cadenas de ADN y bicapas anfifílicas de β CD o CA₄. En ambas

series se confirmó la capacidad para formar nanocomplejos mediante microscopía AFM. La aplicación de metodologías de funcionalización química selectiva permite conservar la homogeneidad a nivel molecular, lo que ofrece oportunidades sin precedentes para los estudios de relación estructura-actividad. La incorporación de motivos de arginina se ha encontrado particularmente beneficioso en la serie de calix[4]arenos, mientras que una combinación de grupos amina y tiourea fue la mejor combinación para derivados de β CD. Los estudios de transfección *in vitro* en las líneas celulares de primate COS-7 y de rhabdomiosarcoma humano, RD-4, permitió la identificación de candidateo óptimos para terapia génica.

Por último, se ha diseñado una cuarta generación de vectores sintéticos basados en la estructura de surfactantes gemelos. Se han preparados dímeros policatiónicos anfifílicos de calix[4]areno covalentemente unidos por un espaciador. Se espera que estos compuestos presenten una mayor capacidad de transfección respecto a sus unidades de monómero correspondiente, como resultado de un efecto quelato y una disminución de la concentración bio-activa debido a una concentración crítica micelar más pequeña que los monómeros constituyentes. Las metodologías de funcionalización selectivas utilizadas en la preparación de estos nuevos dímeros pueden ser extendidas para preparar surfactantes gemelos con el fin de optimizar las propiedades de transfección de los derivados monoméricos.

Capítulo 1
Introducción general

1. Introducción general.

1.1. Autoensamblaje y química biológica supramolecular.

Los seres vivos están constituidos por un conjunto amplio de nanoestructuras funcionales basadas en el autoensamblaje y ordenamiento preciso de componentes biomoleculares. Las interacciones entre nucleótidos complementarios para dar la doble hélice de ADN, la auto-asociación jerarquizada de polipéptidos que conforman las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas, la formación de membranas a partir del ordenamiento de bicapas lipídicas y el funcionamiento de microtúbulos durante la división celular son algunos ejemplos significativos. La regulación de los fenómenos de reconocimiento molecular en la naturaleza también tiene lugar gracias al autoensamblaje dinámico y reversible de elementos de base (multi)complementarios. De hecho, la auto-organización de moléculas sencillas para dar sistemas cada vez más complejos puede haber sido el origen de la vida.¹ Las interacciones no covalentes, locales y específicas, tales como los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, son las responsables del auto-ordenamiento de las biomoléculas. Puesto que el autoensamblaje es un proceso de construcción jerarquizado, en el que se parte de múltiples unidades monoméricas para alcanzar estructuras con un alto grado de complejidad, el sistema final se encuentra estabilizado por muchas interacciones no covalentes que, aunque de manera individual son relativamente débiles, se refuerzan mutuamente al distribuirse por todo el conjunto supramolecular. La existencia de múltiples interacciones débiles que se dan de manera simultánea, normalmente resultan en afinidades mucho mayores que las que cabría esperar de la suma de las interacciones aisladas, lo que conduce a una alta estabilización sin la necesidad de desarrollar sistemas más complejos. Este fenómeno, denominado *multivalencia*, es esencial en multitud de procesos biológicos de reconocimiento.²

La constatación de la importancia de las interacciones no covalentes en la naturaleza ha inspirado el desarrollo de la *química supramolecular*, definida como el estudio de las interacciones no covalentes entre moléculas y de las superestructuras resultantes.³ A diferencia de lo que ocurre en el medio biológico, muchos de los materiales supramoleculares que los químicos han desarrollado se obtienen en estado sólido o gel, en disolventes orgánicos o a concentraciones elevadas de los elementos de base que lo constituyen. El desarrollo de arquitecturas supramoleculares, capaces de ensamblarse a bajas concentraciones en medio acuoso o tamponado, ha expandido el campo de la química supramolecular a la *química biológica supramolecular*, disciplina en la que la química supramolecular se aplica al estudio y la emulación de los procesos biológicos.⁴ Las aplicaciones de los sistemas supramoleculares sintéticos en medio acuoso presentan una gran relevancia en áreas de la medicina como la ingeniería de tejidos, las técnicas de imagen y diagnóstico y el transporte de medicamentos.^{5, 6, 7, 8}

Muchas de las aplicaciones mencionadas para los sistemas autoensamblados requieren que éstos sean capaces de encapsular una determinada carga (un principio activo, un agente de contraste, una sonda de visualización, una proteína, un gen, etc.), dirigirse a dianas específicas (tejidos, células, orgánulos o receptores) y permitir la liberación controlada de su contenido. Hasta el momento, la mayoría de los esfuerzos en desarrollar nanosistemas que cumplen estos requisitos se han centrado en el autoensamblaje de componentes poliméricos, una estrategia que ya ha conducido a numerosas aplicaciones.^{9,10,11} El diseño *de novo* de unidades moleculares monodispersas capaces de autoasociarse de manera programada requiere un mayor grado de control de sus propiedades, pero presenta ventajas evidentes a la hora de investigar en detalle las bases estructurales que gobiernan el proceso de ensamblado. La información que se obtiene permite a su vez preparar componentes “a medida”, susceptibles de organizarse en nanomateriales y nanodispositivos moleculares de manera predecible mediante mecanismos de organización no covalentes.^{12, 13} En este contexto, los derivados macrocíclicos de las familias de las ciclodextrinas (CDs)^{14,15} y los calixarenos (CAs)^{16,17}

han constituido y siguen constituyendo plataformas privilegiadas, gracias sobre todo a la facultad que tienen de formar superestructuras de tipo receptor-huésped. En esta Tesis nos hemos planteado explotar las propiedades únicas de estos dos tipos de moléculas para la elaboración de sistemas nanoparticulares autoensamblados y su aplicación a dos problemáticas concretas: el transporte dirigido de fármacos, con énfasis en el agente anticanceroso docetaxel (Taxotero®, DXT), y la terapia génica.

El docetaxel se utiliza ampliamente en quimioterapia para tratar cáncer de mama, próstata y cuello, así como el carcinoma pulmonar. Presenta, sin embargo, problemas de baja solubilidad en el medio biológico y de efectos secundarios para los que el uso de nanosistemas de transporte puede aportar soluciones válidas.¹⁸ Por su parte, la terapia génica, cuyo objetivo es suministrar o alterar un gen en las células del paciente para producir de manera endógena una proteína funcional, depende críticamente del desarrollo de transportadores adaptados capaces de complejar de manera reversible el material génico y facilitar su paso a través de membranas biológicas.¹⁹ Como estrategia de vectorización se ha explorado la incorporación de ligandos glucídicos reconocibles por lectinas de la superficie celular.²⁰ La implementación de metodologías de funcionalización selectivas de ciclodextrinas o calixarenos y de nuevas aproximaciones para programar la organización jerarquizada de sistemas multicomponentes ha sido crucial para alcanzar los objetivos propuestos. En los apartados que siguen se presenta de manera breve el estado del arte en los aspectos más directamente relacionados con la Tesis.

1.2. Sistemas autoensamblados basados en ciclodextrinas y calixarenos: aplicación al transporte de agentes anticancerosos.

Las ciclodextrinas y los calixarenos son dos tipos de compuestos paradigmáticos en la química de los complejos de inclusión que exhiben afinidades diferentes y complementarias frente a huéspedes potenciales. Las CDs son ciclooligosacáridos

constituidos por unidades de D-glucopiranososa enlazadas por uniones glicosídicas α - $(1\rightarrow4)$. Los miembros más comunes de la serie están formados por 6, 7 u 8 unidades de glucosa y se denominan α , β y γ CD, respectivamente (Figura 1.1, A). Son solubles en agua y presentan una estructura troncocónica, donde los hidroxilos primarios (OH-6) se encuentran en la base menor y los hidroxilos secundarios (OH-2 y OH-3) se sitúan sobre la base mayor. La cavidad que encierra dicha estructura es de dimensiones nanométricas y tiene carácter hidrófobo, pues los protones metínicos H-3 y H-5 se disponen hacia el interior, quedando los grupos hidroxilo hacia el exterior. Estas dos características permiten que la cavidad pueda alojar una variedad relativamente amplia de moléculas orgánicas de tamaño apropiado o incluso fragmentos de moléculas más grandes.²¹ Los CAs, por su parte, son también derivados macrocíclicos, en este caso formados por unidades de fenol *para*-sustituídos que se unen mediante puentes metilénicos que igualmente generan una cavidad central (Figura 1.1., B). Se han descrito derivados que presentan entre 4 y 9 unidades fenólicas con una amplia variedad conformacional, si bien los calix[4]arenos (CA₄), con cuatro posibles conformaciones, son los que han recibido más atención. Se trata, por lo tanto, de moléculas de naturaleza hidrofóbica, insolubles en agua a menos que se funcionalicen químicamente con la incorporación de fragmentos hidrófilos. Una vez en solución acuosa, son capaces de incluir en la cavidad diferentes especies, tales como cationes metálicos, sales, aminoácidos o péptidos.²² Tanto las CDs como los CAs son accesibles comercialmente en gran cantidad y son susceptibles de funcionalización selectiva mediante una amplia batería de metodologías.^{23,24} Además, ambos tipos de macrociclos han demostrado un alto grado de biocompatibilidad.^{25,26}

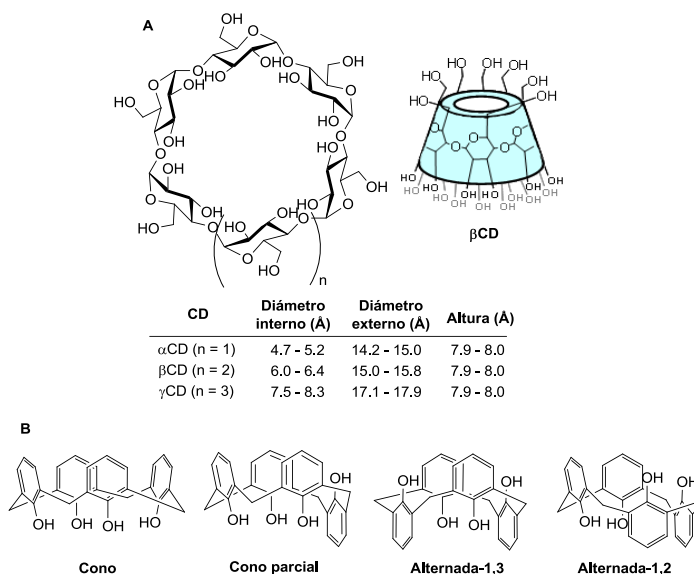


Figura 1.1. (A) Estructura general y dimensiones de las CDs nativas. (B) Representaciones de las cuatro conformaciones posibles de los calix[4]arenos.

El potencial de las CDs para actuar como transportadores moleculares se puso de manifiesto poco tiempo después de que se descubriesen sus propiedades de inclusión.²⁷ Hoy en día se comercializan varias formulaciones farmacéuticas que contienen ciclodextrinas nativas o funcionalizadas.²⁸ La implementación de prototipos moleculares con capacidad de vectorización es, no obstante, mucho más reciente. El transporte dirigido presenta ventajas inherentes comparado con el transporte inespecífico en términos de limitación de efectos secundarios, reducción de dosis efectiva y aumento de la eficacia, lo que es especialmente atractivo en el caso de tratamientos agresivos como la quimioterapia contra el cáncer. Para ello es imprescindible incorporar antenas de biorreconocimiento sobre la estructura de las CDs. En una contribución pionera en el campo, nuestro grupo diseñó un receptor multitópico capaz de solubilizar el agente antimetabólico docetaxel y conducirlo activamente a macrófagos.²⁹ El elemento de encapsulación del fármaco está constituido por dos unidades de β -ciclodextrina unidas por un espaciador cuya longitud se

adapta a la distancia que separa los dos anillos aromáticos presentes en la molécula del fármaco, con lo que se facilita la formación de un complejo quelato. Este espaciador permitió además la incorporación de un ligando hexavalente de α -D-manopiranosilo con alta afinidad por el receptor específico de manosa expresado en la superficie de los macrófagos (MMR, *Mannose Macrophage Receptor*). Experimentos de adhesión celular confirmaron que el complejo de inclusión entre el receptor dimérico y el DXT era capaz de unirse al MMR para formar un sistema ternario que provocó la internalización celular, validando así el concepto (Figura 1.2.).

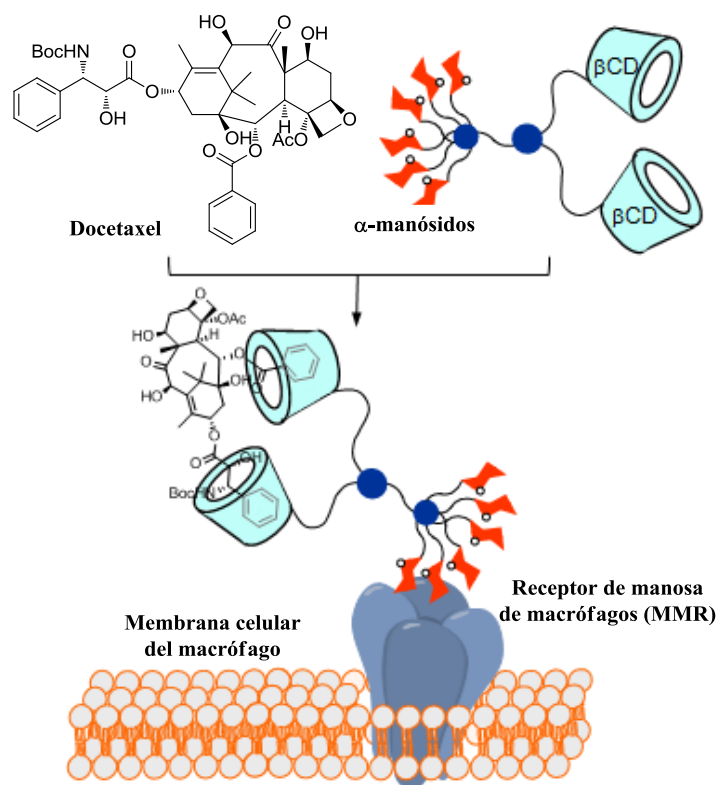


Figura 1.2. Representación esquemática del sistema de transporte de docetaxel al receptor de manosa de macrófagos (MMR).

La estrategia basada en el reconocimiento de antenas sacarídicas por receptores específicos de membrana (lectinas) para el transporte dirigido de fármacos anticancerosos ha sido examinada también por otros grupos. El sistema más estudiado es el transporte de doxorubicina (DX) a hepatocitos, utilizando como diana el receptor de la asialoglicoproteína (ASGPr). En una contribución reciente, Seeberger y colaboradores demostraron que la incorporación de dendrímeros galactosilados sobre la β CD permite el transporte de DX y la internalización específica del complejo de inclusión correspondiente en células de carcinoma hepatocelular humano, HepG2 (Figura 1.3).³⁰

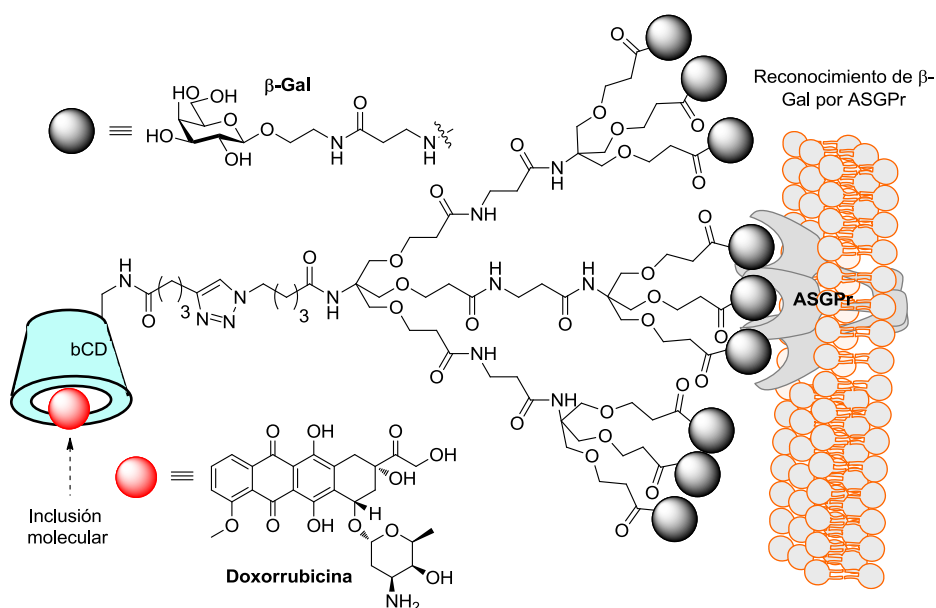


Figura 1.3. Representación esquemática de la β CD funcionalizada con galactósidos diseñado por Seeberger para transporte a hepatocitos.

El diseño de transportadores basados exclusivamente en la formación de complejos de inclusión presenta dos limitaciones importantes, a saber, las que imponen el tamaño de la cavidad, por un lado, y la estequiometría del complejo, por otro. Los sistemas nanoparticulares autoensamblados suponen una alternativa interesante para la construcción de transportadores más versátiles. La posibilidad de manipular los

componentes discretos a nivel molecular permite adaptar el sistema a estándares predefinidos (tamaño, capacidad de carga, estabilidad, respuesta a estímulos, etc.). Tanto las CDs como los CAs se han utilizado profusamente en este campo.^{29,31} De hecho, en la mayoría de los ejemplos de utilización de calixarenos como transportadores moleculares en agua, la especie transportada no penetra en la cavidad del macrociclo, sino que es encapsulada en sistemas micelares o vesiculares.

En el caso de las CDs, las estructuras autoensambladas más estudiadas en el campo del transporte de fármacos son las nanoesferas y las nanocápsulas obtenidas por nanoprecipitación a partir de derivados anfifílicos.³² En el primer, caso la matriz está formada por las propias moléculas de CDs anfifílicas en un ordenamiento compacto, mientras que en caso de las nanocápsulas el núcleo central está constituido por un aceite, con las unidades de CDs dispuestas en la periferia. El poder acceder a uno u otro tipo de nanosistema resulta útil para adaptar el perfil de liberación de un determinado principio activo. Por ejemplo, en un trabajo reciente de nuestro grupo se pone de manifiesto que la cinética de liberación del ansiolítico diazepam (DZ) es drásticamente diferente dependiendo de que se encapsule en nanoesferas, preparadas a partir de per-(C-6)-azido-per-(O-2,O-3)-hexanoilo- β CD, o en nanocápsulas, formuladas con el mismo derivado en presencia de un aceite aprobado para uso farmacéutico (Figura 1.4).³³

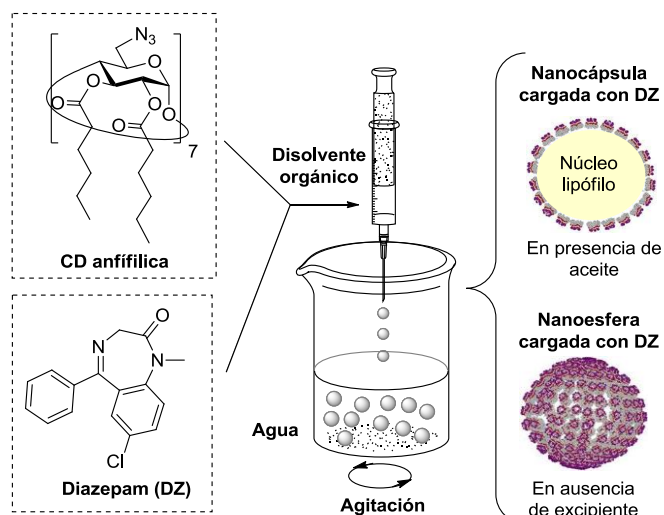


Figura 1.4. Encapsulación de diazepam por nanoprecipitación con una CD anfífilica para obtener nanoesferas y nanocápsulas.

Si bien se ha descrito la formación de vesículas a partir de calixarenos sin modificar,³⁴ las nanoestructuras más estudiadas para el transporte de fármacos se han obtenido a partir de derivados de calix[4]areno en la conformación de cono y funcionalizados con cadenas grasas en una de las caras.^{15c,30} Algunos ejemplos de este tipo de compuestos son los descritos por Lee y colaboradores, que portan funciones de tipo amino(terciario)alcohol en la cara superior y cadenas de decilo en las oxígenos fenólicos (Figura 1.5, A).³⁵ Meier ha descrito derivados anfífilicos con grupos cargados negativamente (carboxilato) que también originan vesículas unilamelares (Figura 1.5, B).³⁶ Por otra parte, los trabajos de Coleman y colaboradores indican que los derivados de CA_4 neutros o cargados con cadenas grasas de tipo acilo en la cara superior se autoensamblan generalmente en forma de nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs, *Solid Lipid Nanoparticles*, Figura 1.5, C).^{15a} El mismo grupo ha publicado la obtención de nanoesferas, en lugar de vesículas, a partir de derivados de CA_4 , tanto neutros como cargados, con cadenas grasas largas en la cara inferior, lo que parece indicar que la

formación de vesículas o de nanoesferas depende en gran medida del balance hidrófilo-hidrófobo.

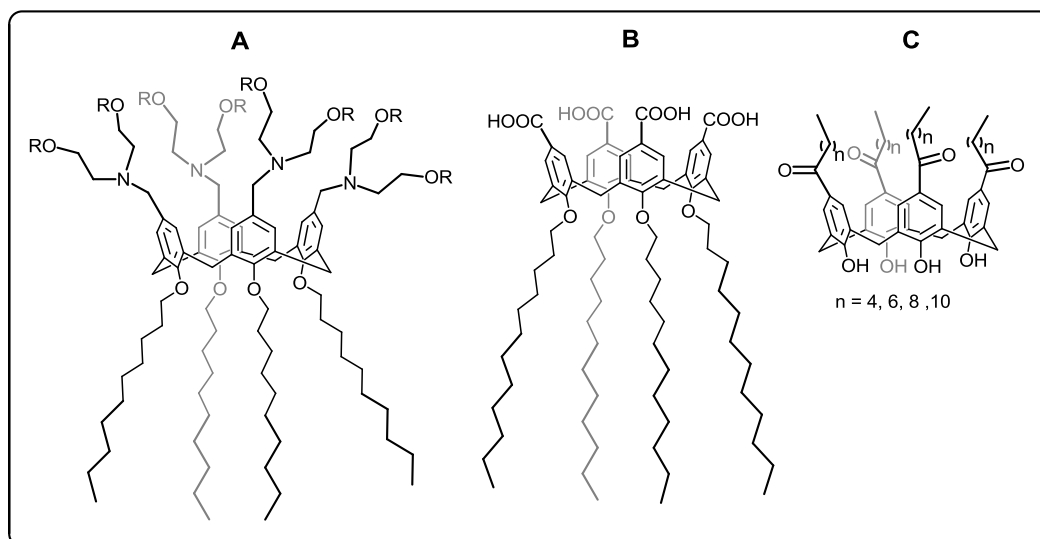


Figura 1.5. Estructuras de los derivados de CA₄ autoensamblables diseñados para el transporte de fármacos por los grupos de Lee (A), Meier (B) y Coleman (C).

Tanto los nanosistemas autoensamblados derivados de ciclodextrinas como los derivados de calixarenos han encontrado aplicación en el transporte y liberación controlada de agentes anticancerosos.³⁷ En 2008 Bilensoy y colaboradores describieron la preparación de nanoesferas y nanocápsulas cargadas con paclitaxel (Taxol®) a partir de per-(*O*-6)-capriloil- β CD y determinaron que, en el primer caso, la liberación del fármaco se produce a lo largo de 12 horas, en tanto que en el segundo se prolonga hasta 24 horas.³⁸ Resulta interesante el hecho de que la capacidad de encapsulación aumente si se preforma un complejo de inclusión entre el fármaco y el derivado de ciclodextrina antes de generar las nanopartículas cargadas, lo que apoya fuertemente que el derivado taxánico pueda localizarse tanto en las cavidades de las unidades de CDs como en la matriz de las nanopartículas. Posteriormente, Quaglia, Mazzaglia y colaboradores publicaron la preparación de heptakis(2-*O*-oligo(etilenoxi)-6-hexadeciltio)- β CD para preparar

nanopartículas cargadas con docetaxel.^{15a} Los sistemas resultantes proporcionaron una liberación sostenida del fármaco por un período de hasta dos meses. Además, el DXT encapsulado mostró mayor capacidad, en comparación con el DXT libre, de provocar la muerte celular en células HepG2. Hay que señalar, sin embargo, que en este caso el derivado de empleado no es un compuesto monodisperso. Más recientemente, Lim y colaboradores han desarrollado un nanotransportador para el paclitaxel a partir de tetrahexiloxi-tetra-*p*-aminocalix[4]areno (Figura 1.6).³⁹

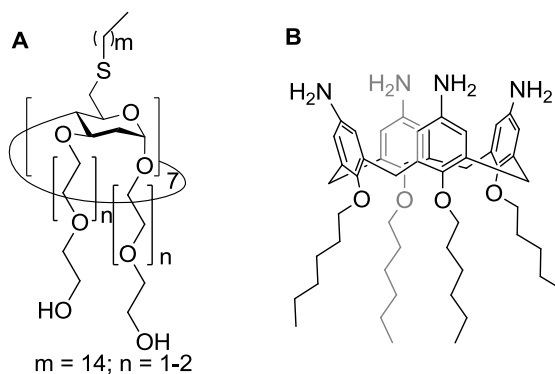


Figura 1.6. (A) Estructura de las β CDs anfífilas para el transporte de docetaxel. (B) Derivado de CA₄ para la preparación de nanotransportadores de paclitaxel.

1.3. Transportadores de genes basados en derivados monodispersos de ciclodextrinas y calixarenos.

El transporte y la liberación controlada de genes tienen implicaciones en numerosas áreas de investigación que abarcan desde la ciencia básica hasta la medicina clínica. Aunque el material génico puede llegar a internalizarse y expresarse en células por sí solo, un proceso llamado *transfección*, se degrada fácilmente en los fluidos biológicos por las nucleasas, por lo que su eficacia es muy limitada. En general, la introducción de un ácido nucleico exógeno en una célula diana requiere un vehículo especializado, un vector. Estos vectores pueden clasificarse en dos grandes grupos: los que derivan de virus y los de origen sintético. La investigación en “virus artificiales” se

ha intensificado en los últimos años⁴⁰ gracias los avances realizados en terapia génica como una estrategia general capaz de proporcionar tratamientos eficaces para un rango amplio de enfermedades tanto de origen genético como adquirido,⁴¹ y como consecuencia de las reservas que persisten sobre la seguridad de utilización de vectores virales.⁴²

La mayoría de las formulaciones que utilizan vectores no virales para la transfección se basan en polímeros o lípidos catiónicos. El hecho de que estas formulaciones sean polidispersas y presenten propiedades conformacionales aleatorias dificulta considerablemente el estudio de correlaciones entre características estructurales y eficacia de complejación y transporte del material génico.⁴³ El autoensamblaje de nanocomplejos entre el ácido nucleico correspondiente y componentes moleculares monodispersos se ha propuesto como una alternativa viable.⁴⁴ Tanto las ciclodextrinas⁴⁵ como los calixarenos⁴⁶ juegan un papel protagonista en este campo.

Varios derivados policatiónicos de ciclodextrinas,⁴⁷ de calixarenos⁴⁸ y de otros macrociclos basados en unidades aromáticas, como los pillar[5]arenos,⁴⁹ se han estudiado como vectores de genes. Se han descrito numerosos derivados que, a semejanza de los polímeros catiónicos como la polietilenimina (PEI), no tienen un carácter anfifílico marcado (Figura 1.7). Sin embargo, los ejemplos más eficaces de vectores de genes no virales descritos derivados de estas plataformas presentan anfifilicidad facial, esto es, constan de dos dominios diferenciados, uno consistente en un clúster policatiónico y otro formado por múltiples cadenas lipófilas. Dada la anisotropía de las moléculas de ciclodextrina y calix[4]areno, caben dos orientaciones relativas posibles para estos dominios, según que el cluster policatiónico se disponga en la base mayor o menor de la estructura troncocónica. En la Figura 1.8. se representan de manera esquemática estos dos tipos de arquitecturas moleculares.

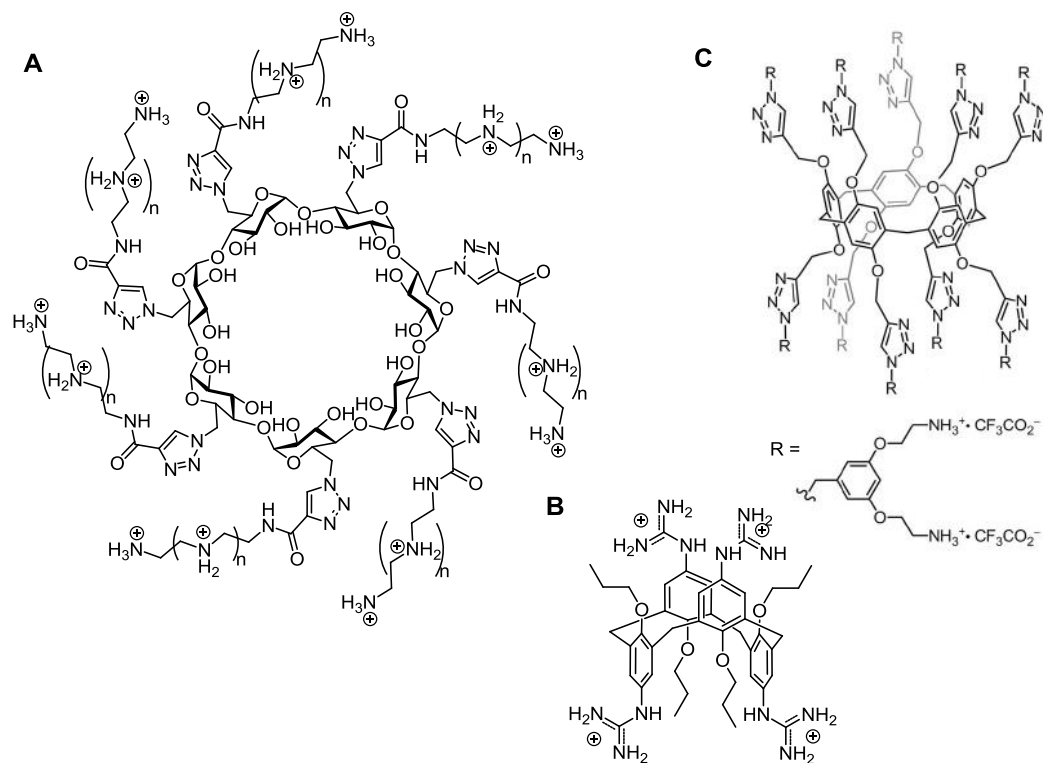


Figura 1.7. Ejemplos de vectores no anfílicos derivados de β CD (A), calix[4]areno (B) y pillar[5]areno (C).

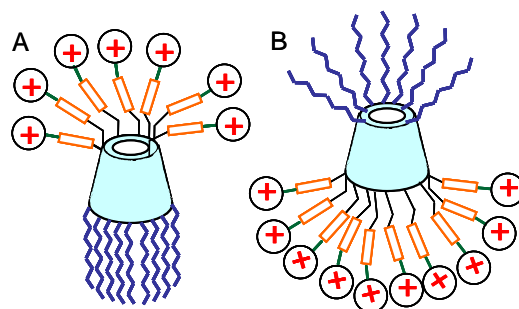


Figura 1.8. Orientación relativa de los dominios hidrófilo y lipófilo en las ciclodextrinas policatónicas anfílicas tipo falda (A) y medusa (B).

En la serie de las ciclodextrinas, la incorporación de los grupos catiónicos en el anillo mayor (hidroxilos secundarios) y las cadenas lipófilas en el anillo menor (hidroxilos primarios) es sintéticamente más costosa en comparación con la distribución opuesta. Aunque se han obtenido algunos resultados de transfección interesantes con estos vectores de tipo “medusa”⁵⁰ (Figura 1.9) no todos se refieren al uso de compuestos homogéneos.⁵¹

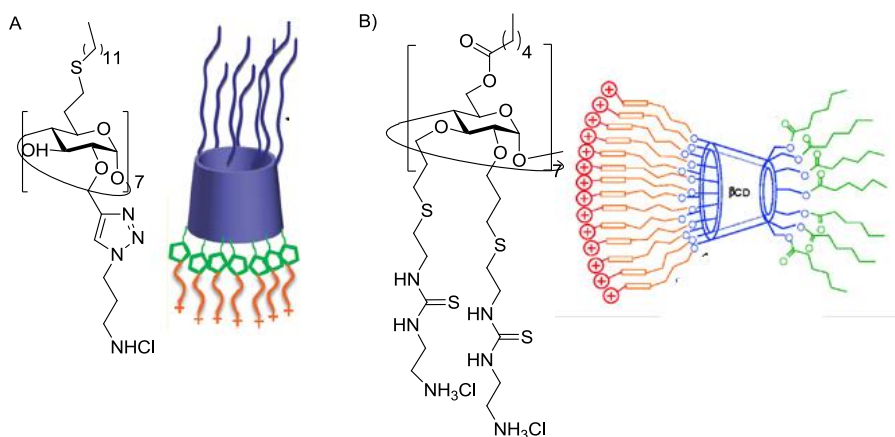


Figura 1.9. Ejemplos de ciclodextrinas policatiónicas anfifílicas “reversas” (tipo medusa) desarrolladas por el grupo de O’Driscoll (A) y por nuestro grupo de investigación (B).

La mayoría de los ejemplos de ciclodextrinas anfifílicas policatiónicas (paCDs) monodispersas descritas para transporte de genes corresponden a la arquitectura tipo “falda” (Figura 1.8, A). Los grupos de Darcy y O’Driscoll⁵² y nuestro propio grupo,⁵³ de manera independiente, han llevado a cabo un estudio extenso encaminado a establecer relaciones entre la estructura de los vectores y sus propiedades de condensación de ácidos nucleicos, la formación de los correspondientes complejos nanoparticulares autoensamblados (CDplejos) y la transfección. Se han realizado variaciones sistemáticas en la naturaleza de las cabezas catiónicas, las cadenas lipófilas, los espaciadores y grupos funcionales conectando los diferente dominios de la molécula y el tamaño de la plataforma ciclooligosacáridica (α , β y γ CD). En nuestro caso, los datos obtenidos en

diferentes líneas celulares han permitido identificar el derivado de β CD dendrítico (Figura 1.10, B), con catorce grupos amino y catorce cadenas de hexanoílo, como uno de los mejores candidatos, con eficacias de transfección que superan al vector de referencia PEI, sobre todo a valores de relación entre número de nitrógenos protonables en el vector y grupos fosfato en el ADN (N/P) menores de 10, y con un perfil de toxicidad mucho más favorable (Figura 1.10).

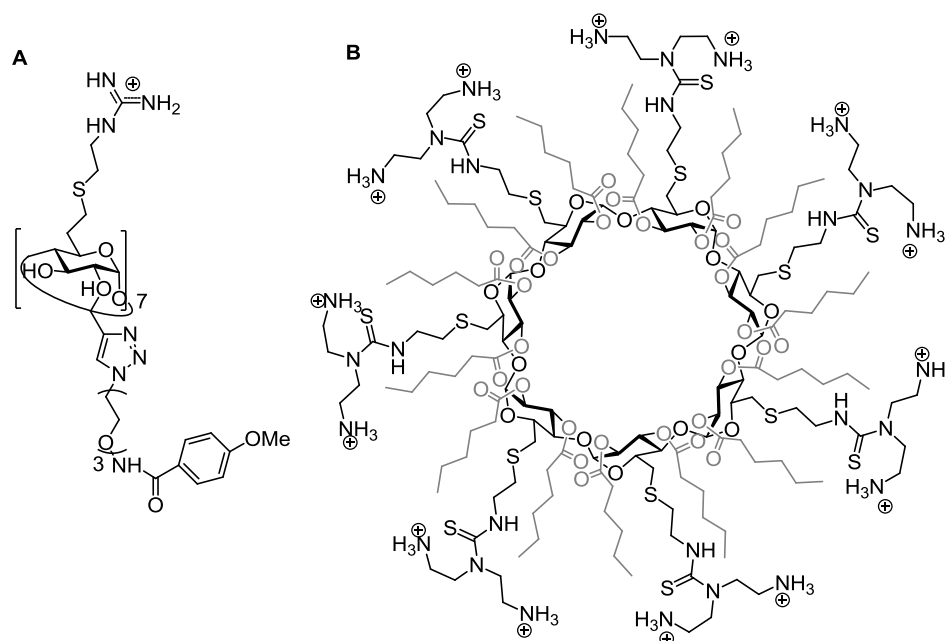


Figura 1.10. Ejemplos de ciclodextrinas policationicas anfífilicas monodispersas desarrolladas por el grupo de Darcy (A) y por nuestro grupo de investigación (B).

Aunque los primeros estudios de la interacción entre derivados policationicos de calix[4]arenos y ADN se publicaron por Schneider y colaboradores en 1999 (Figura 1.11, A),⁵⁴ el potencial de los nanocomplejos autoensamblados con eficacia en transfección génica no se puso de manifiesto hasta los trabajos pioneros de Sansone, Casnati, Ungaro y Donofrio.⁵⁵ Las metodologías de funcionalización facial selectiva de los calixarenos permitieron, como en el caso de las ciclodextrinas, introducir una amplia gama de

modificaciones estructurales en las dos orientaciones posibles (Figura 1.11, C y D), lo que condujo a estos autores a identificar el derivado de CA₄ que incorpora grupos funcionales arginino en la cara superior y cadenas de hexilo en la cara inferior como un vector muy eficaz para promover la transfección en células de rhabdomiocoma humano (RD-4).

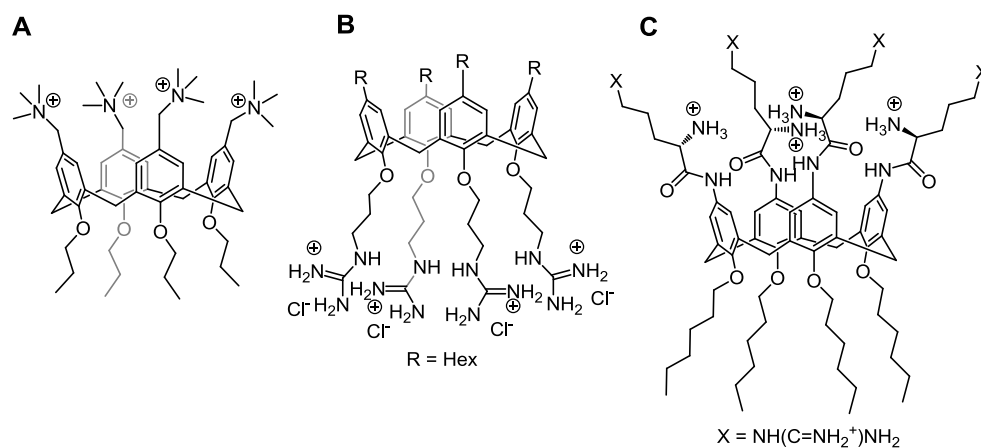


Figura 1.11. Ejemplos de calixarenos policatiónicos anfifílicos.

Las prometedoras propiedades de los calixarenos anfifílicos policatiónicos (paCAs) como agentes de transfección génica, condujeron a Scharder y colaboradores a desarrollar sistemas preorganizados que pudiesen favorecer las interacciones con el ADN. Sus estudios sugieren que estos compuestos interactúan con el surco mayor de la doble hélice y que la formación de dímeros con espaciadores suficientemente flexibles, permiten la adaptación a la curvatura de la hélice y favorecen la complejación (Figura 1.12).⁵⁶ Matthews y colaboradores han estudiado igualmente el efecto de la preorganización de unidades de paCAs y su presentación multivalente para potenciar sus propiedades de transfección (Figura 1.13).

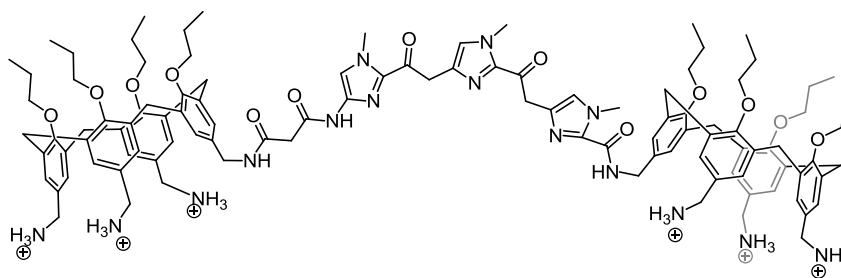


Figura 1.12. Ejemplos de calixarenos diméricos diseñados por Scharder como agentes de transfección génica.

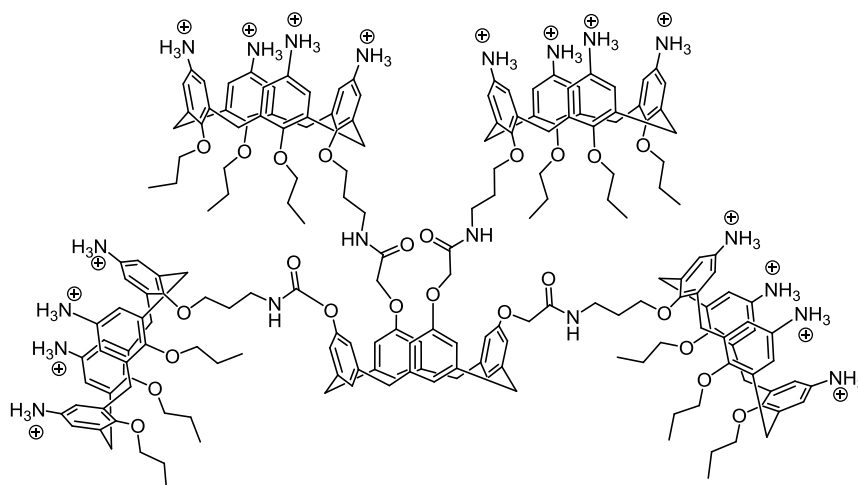


Figura 1.13. Ejemplos de calixarenos multivalentes preparados por Matthews.

Mientras que los trabajos de Ungaro y colaboradores parecen indicar que la formación de los complejos entre paCAs y ADN implica el autoensamblaje directo entre ambas especies, en otros casos se han favorecido aproximaciones que implican primero la autoorganización de las unidades de paCA en nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs)⁵⁷ o en micelas, y que son éstas entidades las que interaccionarían luego con el ADN en un proceso jerarquizado⁵⁸ (Figura 1.14.).

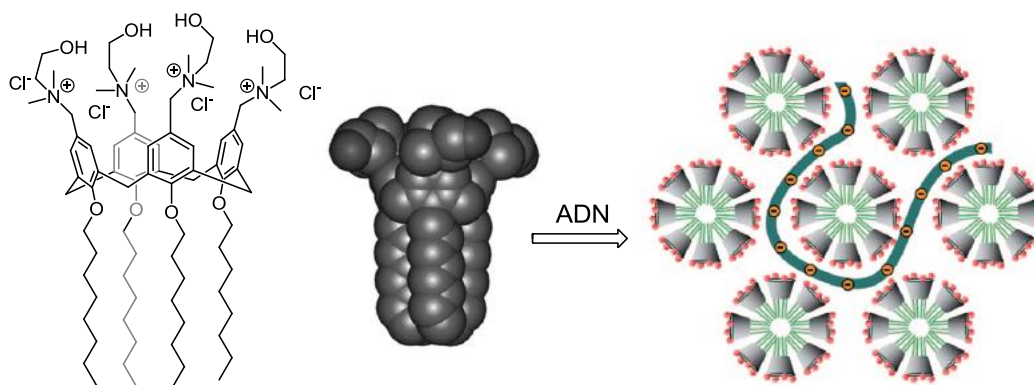


Figura 1.14. Estrategia de autoorganización de pCA en nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs).

1.4. Estrategias supramoleculares de incorporación de ligandos glucídicos biorreconocibles en sistemas de transporte basados en ciclodextrinas: interacciones carbohidrato-lectina.

El transporte dirigido de un fármaco o un gen a su sitio de acción presenta ventajas evidentes en lo que se refiere a eficacia terapéutica y a la minimización de la toxicidad sistémica. En general, la vectorización de un principio activo implica su introducción en un nanotransportador que incorpora ligandos complementarios de receptores específicos del tejido o células diana.⁵⁹ Entre éstos, los carbohidratos reconocibles por lectinas de membrana presentan el atractivo de conferir, simultáneamente, biocompatibilidad y selectividad.⁶⁰ En el caso de nanosistemas autoensamblados, la propia naturaleza intrínseca de los mismos favorece además la presentación multivalente de los motivos de reconocimiento, un aspecto fundamental para que el proceso de interacción carbohidrato-lectina sea eficaz. Los glicoligandos pueden formar parte de las propias unidades que van a autoensamblarse (estrategia de prefuncionalización) o introducirse con posterioridad al autoensamblado (estrategia de postfuncionalización). En este último caso, el objetivo puede lograrse por modificación

covalente de la superficie de la nanoestructura o por medio de interacciones receptor-huésped no covalentes.

La combinación de los glicoligandos (glicotopos) y el elemento de autoensamblado en un único bloque mediante pre-funcionalización presentan la ventaja de permitir un mejor control de la densidad del motivo de reconocimiento. Nuestro grupo ha utilizado esta aproximación previamente con éxito en la construcción de paCDs mannosiladas y galactosiladas para la vectorización de genes a macrófagos y hepatocitos, respectivamente (Figura 1.15).⁶¹ No obstante, la síntesis de este tipo de macromoléculas se puede complicar considerablemente y se corre el riesgo de perturbar las propiedades de autoasociación. La adición de los glicoligandos, convenientemente dotados de un elemento que permita su unión mediante interacciones no covalentes, a los sistemas ya ensamblados, permite la funcionalización de la superficie de las nanopartículas sin necesidad de rediseñar los componentes y, consecuentemente, la síntesis. Aunque el control sobre la densidad de los ligandos es menor, esta estrategia permite, por ejemplo, la incorporación de diferentes elementos funcionales por simple adición. En el caso de los sistemas autoensamblados basados en ciclodextrinas, las propiedades de inclusión de las mismas favorece esta estrategia, a condición de que la cavidad permanezca accesible. De hecho, la formación de múltiples complejos de inclusión en nanopartículas que contienen ciclodextrinas es una metodología comúnmente utilizada para conectar biomoléculas y para modificar nanopartículas multifuncionales, especialmente para incorporar ligandos biorreconocibles en los campos de la terapia contra el cáncer⁶² y la terapia génica.⁶³

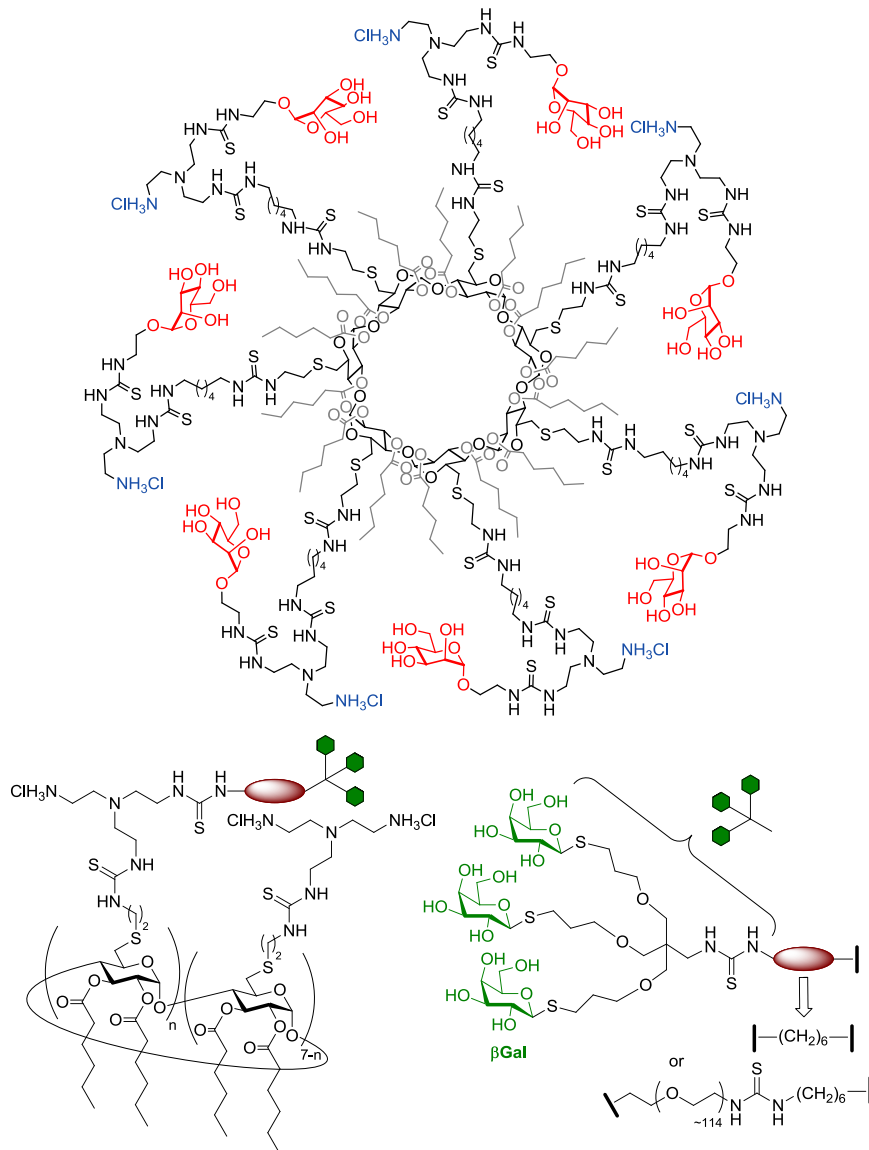


Figura 1.15. Estructura de los conjugados $\alpha\text{Man-paCD}$ y $\beta\text{Gal-paCD}$ y de los ligandos trivalentes galactosilados preparados en el grupo de investigación.

Dada la alta afinidad de la molécula de adamantano por la cavidad de la β -ciclodextrina, en la mayoría de los trabajos publicados sobre modificación de

nanosistemas que contienen CDs, éste es el tipo de funcionalización empleado.⁶⁴ Sin embargo, los ejemplos de glicoconjugados funcionalizados con adamantano para la modificación supramolecular de sistemas autoensamblados basados en ciclodextrinas son sorprendentemente limitados. Ravoo y colaboradores han utilizado vesículas formadas a partir de ciclodextrinas anfifílicas neutras para posteriormente incorporar conjugados de maltosa y lactosa armados con un grupo adamantano.⁶⁵ Este sistema de anclaje “fluido”, que imita el glicocalix celular mejor que los sistemas con anclaje fijo, les ha permitido realizar estudios sobre la influencia de la densidad o la presencia de diferentes glicotopos en las propiedades de interacción con lectinas (Figura 1.16).

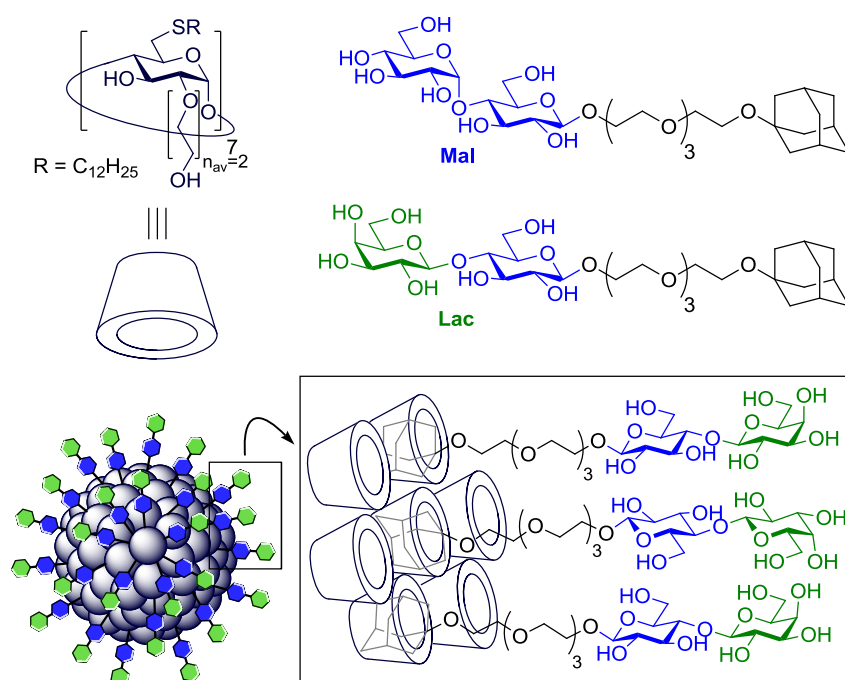


Figura 1.16. Estructuras de la CD anfifílica y conjugados de tipo glicoadamantilo preparados por Ravoo (arriba) y representación esquemática de las glicovesículas multivalentes preparadas por complejación supramolecular.

Recientemente, Reineke y colaboradores han descrito la preparación del glicopolímero poli(2-metacrilamido-2-desoxi-D-glucopiranosas), p(MAG), terminado con un grupo adamantano, y su utilización para decorar nanocomplejos formados por un derivado de β CD policatiónica y un plásmido de ADN (pADN, Figura 1.17, A). Además de proporcionar estabilidad coloidal, los resultados de transfección indicaron diferencias en eficacias entre distintas líneas celulares que los autores atribuyen a un cierto grado de especificidad debido a las unidades de glucosamina (Figura 1.17).⁶⁶

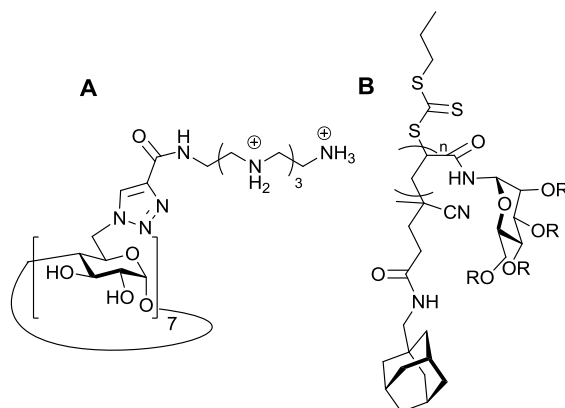


Figura 1.17. Estructura de la β CD policatiónica y del glicopolímero preparados por Reineke para la complejación de pDNA y la post-funcionalización de los nanocomplejos.

Los resultados comentados ponen de manifiesto el creciente interés en el diseño de sistemas homogéneos autoensamblables para el transporte y liberación controlada de fármacos y material génico así como el potencial que dentro de este campo tienen las ciclodextrinas y los calixarenos. La posibilidad de modificación de las nanoestructuras correspondientes, por interacciones de tipo receptor-huésped, mediante ligandos glucídicos biorreconocibles complementarios de lectinas de membrana, supone una ventaja añadida. El desarrollo de estos conceptos requiere, no obstante, la implementación de métodos de funcionalización de ambas plataformas que permitan la incorporación de los elementos funcionales adecuados, los cuales a su vez deben escogerse de manera que proporcionen la máxima eficacia. Por ejemplo, si se pretende

vectorizar un nanosistema a una célula concreta, hay que optimizar el glicoligando correspondiente para que la interacción con la lectina diana sea óptima. En esta Tesis hemos abordado diferentes facetas de esta problemática, con la filosofía general de hacer compatibles las estrategias de síntesis con el carácter monodisperso de los componentes incluso para arquitecturas con un grado de sofisticación relativamente elevado.

Referencias

- ¹ H. Kuhn, J. Waser, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1981**, *20*, 500-520.
- ² a) M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908-2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794; b) C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Kokschi, J. Dornedde, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472-10498.
- ³ a) J.-M. Lehn, *Science* **1993**, *260*, 1762-1763; b) J.-M. Lehn, *Science* **2002**, *295*, 2400-2403.
- ⁴ a) K. Petkau-Milroy, L. Brunsveld, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 219-232; b) A. Uhlenheuer, K. Petkau, L. Brunsveld, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 2817-2826.
- ⁵ S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991-1003.
- ⁶ M. C. Branco, J. P. Schneider, *Acta Biomaterialia*, **2009**, *5*, 817-831.
- ⁷ N. Sakai, S. Matile, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 599-600
- ⁸ J. H. Collier, *Soft Matter*, **2008**, *4*, 2310-2315.
- ⁹ Y. Zhao, Y. Zhao, F. Sakai, L. Su, Y. Liu, K. Wei, G. Chen, M. Jiang, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5215-5256.
- ¹⁰ A. Najer, D. Wu, D. Vazquez, C. G. Palavan, W. Meier, *Nanomedicine*, **2013**, *8*, 425-447.
- ¹¹ M. A. C. Stuart, W. T. S. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G. B. Sukhorukov, I. Szleifer, V. V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov, S. Minko, *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 101-113.
- ¹² K. Liu, Y. Kang, Z. Wang, Xi Zhang, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5530-5548.

-
- ¹³ A. Barnard, D. K. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6572-6581.
- ¹⁴ Revisiones recientes: a) J. M. García Fernández, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 1825-1845; b) A. Martínez, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4746-4773; c) Y. Chen, Y.-M. Zhang, Y. Liu, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5622-5633; d) F. Sallas, R. Darcy, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 957-969.
- ¹⁵ Referencias seleccionadas: a) F. Quaglia, L. Ostacolo, A. Mazzaglia, V. Villari, D. Zaccaria, M. T. Sciortino, *Biomaterials* **2009**, *30*, 374-382; b) C.-Y. Quan, J.-X. Chen, H.-Y. Wang, C. Li, C. Chang, X.-Z. Zhang, R.-X. Zhuo, *ACS Nano*, **2010**, *4*, 4211-4219; c) R. V. Vico, J. Voskuhl; B. J. Ravoo, *Langmuir* **2011**, *27*, 1391-1397; d) F. Perret, M. Duffour, Y. Chevalier, H. Parrot-Lopez, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *83*, 25-32.
- ¹⁶ Revisiones recientes: a) I. Montasser, P. Shahgaldian, F. Perret, A. W. Coleman, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 21899-21942; b) F. Sansone, A. Casnati, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4623-4639; c) K. Helttunen, P. Shahgaldian, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2704-2714.
- ¹⁷ Referencias seleccionadas: a) Y. Tanaka, M. Miyachi, Y. Kobuke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 504-506; b) P. Shahgaldian, M. Cesario, P. Goreloff, A. W. Coleman, *Chem. Commun.* **2002**, 326-327; c) A. Dubes, I. L. Moudrakovski, P. Shahgaldian, A. W. Coleman, C. I. Ratcliffe, J. A. Ripmeester, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6236-6237; d) A. W. Coleman, S. Jebors, P. Shahgaldian, G. S. Ananchenko, J. A. Ripmeester, *Chem. Commun.* **2008**, 2291-2303; e) C. Bize, J.-C. Garrigues, M. Blanzat, I. Rico-Lattes, O. Bistri, B. Colasson, O. Reinaud, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 586-588; f) V. Francisco, N. Basilio, L. García-Río, J. R. Leis, E. F. Maques, C. Vázquez-Vázquez, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6551-6553.
- ¹⁸ L. Feng, R. J. Mumper, *Cancer Lett.* **2013**, *334*, 157-175.
- ¹⁹ a) M. A. Kay, *Nature Reviews Genetics* **2011**, *12*, 316-328; b) J. Kaiser, *Science*, **2011**, *334*, 29-30; c) C. Y. M. Hsu, H. Uludag, *J. Drug Target* **2012**, *20*, 301-328

-
- ²⁰ a) C. Bies, C.-M. Lehr, J. F. Woodley, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *56*, 425; b) H. Zhang, Y. Ma, X.-L. Sun, *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 270.
- ²¹ a) S. V. Kurkov, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 167-180; b) M. E. Davis, M. E. Brewster *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 1023-1035.
- ²² L. Baldini, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, *Calixarenes in molecular recognition*, in *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, ed. J. W. Steed and P. A. Gale, John Wiley & Sons, Chichester, **2012**, vol. 3, pp. 863-894.
- ²³ W. Sliwa, M. Deska, *Arkivoc* **2011**, 496-551.
- ²⁴ a) A. R. Khan, P. Forgo, K. J. Stine, V. T. D'Souza, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977-1996; b) P. Balbuena, R. Gonçalves-Pereira, J. L. Jiménez Blanco, M. I. García-Moreno, D. Lesur, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1390-1403.
- ²⁵ a) K. Wang, D. -S. Guo, X. Wang, Y. Liu, *ACS Nano* **2011**, *5*, 2880-2894; b) K. Wang, D. -S. Guo, H. -Q. Zhang, D. Li, X. -L. Zheng, Y. Liu, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6402-6412; c) A. W. Coleman, S. Jebors, S. Cecillon, P. Perret, D. Garin, D. Marti-Battle, M. Moulin, *New J. Chem.* **2008**, *32*, 780-782.
- ²⁶ E. Memisoglu-Bilensoy, A. L. Dogan, A. A. Hincal, *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58*, 585-589.
- ²⁷ K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045-2076.
- ²⁸ C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. M. Benito. *Cyclodextrin for Pharmacological and Biomedical Applications*. In *Supramolecular Systems in Biomedical Fields*, ed. H.-J. Schneider, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2013**, vol. 13, pp. 94-139.
- ²⁹ 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.
- ³⁰ G. J. L. Bernardes, R. Kikkeri, M. Maglinao, P. Laurino, M. Collot, S. Y. Hong, B. Lepenies, P. H. Seeberger, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4987-4996.

-
- ³¹ E. V. Ukhatskaya, S. V. Kurkov, S. E. Matthews, T. Loftsson, *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 3485-3512.
- ³² E. Bilensoy, A. A. Hincal, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2009**, *6*, 1161-1173.
- ³³ A. Méndez-Ardoy, M. Gómez-García, A. Gèze, J.-L. Putaux, D. Wouessidjewe, C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández, J. M. Benito *Med. Chem.* **2012**, *8*, 524-532.
- ³⁴ M. A. Markowitz, R. Bielski, S. L. Regen, *Langmuir*, **1989**, *5*, 276-278.
- ³⁵ M. Lee, S.-J. Lee, L.-H. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12724-12725.
- ³⁶ M. Strobel, K. Kita-Tokarczyk, A. Taubert, C. Vebert, P. A. Heiney, M. Chami, W. Meier, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 252-259.
- ³⁷ L. Wang, L.-I. Li, Y.-S. Fan, H. Wang, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 3888-3898.
- ³⁸ E. Bilensoy, O. Gürkaynak, M. Ertan, M. Sen, A. A. Hincal *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 1519-1529.
- ³⁹ C. Weeden, K. J. Hartieb, L. Y. Lim, *J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *64*, 1403-1411.
- ⁴⁰ K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2562-2574
- ⁴¹ Gene Therapy Clinical Trials Worldwide provided by the *J. Gene Med.* (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>)
- ⁴² a) J. Grisham, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 254-255; b) S. Nayak, R. W. Herzog, *Gene Ther.* **2010**, *17*, 295-304.
- ⁴³ M. A. Mintzer, E. E. Simanek, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259-302
- ⁴⁴ C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6728-6742
- ⁴⁵ C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. M. Benito, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1586-1608.
- ⁴⁶ M- Li, M. S. Peters, T. Schrader, *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 409-417.
- ⁴⁷ a) S.-A. Cryan, A. Holohan, R. Donohue, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *21*, 625-633; b) N. Mourtzis, M. Paravatou, I. M. Mavridis, M. L. Roberts, K.

Yannakopoulou, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4188-4200; c) S. Srinivasachari, K. M. Fichter, T. M. Reineke, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4618-4627; d) V. Bennevault-Celton, A. Urbach, O. Martin, C. Pichon, P. Guégan, P. Midoux, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2404-2414.

⁴⁸ F. Sansone, L. Baldini, A. Casnati, R. Ungaro, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2715-2728.

⁴⁹ I. Nierengarten, M. Nothisen, D. Sigwalt, T. Biellmann, M. Holler, J.-S Remy, J.-F. Nierengarten, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17552-17558.

⁵⁰ a) F. Ortega-Caballero, C. Ortiz Mellet, L. Le Gourrière, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, J. M. García Fernández, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5143-5146; b) A. M. O'Mahony, J. Ogier, S. Desgranges, J. F. Cryan, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4954-4960; c) B. M. D. C. Godinho, J. R. Ogier, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, J. F. Cryan, *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 640-649; d) A. M. O'Mahony, B. M. D. C. Godinho, J. Ogier, M. Devocelle, R. Darcy, J. F. Cryan, C. M. O'Driscoll, *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 744-752; e) A. M. O'Mahony, S. Desgranges, J. Ogier, A. Quinlan, M. Devocelle, R. Darcy, J. F. Cryan, C. M. O'Driscoll, *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 1086-1098; f) J. McCarthy, M.J. O'Neill, L. Bourre, D. Walsh, A. Quinlan, G. Hurley, J. Ogier, F. Shanahan, S. Melgar, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, *J. Control. Release* **2013**, *168*, 28-34; g) A. M. O'Mahony, J. Ogier, R. Darcy, J. F. Cryan, C. M. O'Driscoll, *Plos One* **2013**, *8*, e66413; h) B. M. D. C. Godinho, D. J. McCarthy, C. Torres-Fuentes, C. J. Beltrán, J. McCarthy, A. Quinlan, J. R. Ogier, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, J. F. Cryan, *Biomaterials* **2014**, *35*, 489-499.

⁵¹ a) R. Donohue, A. Mazzaglia, B. J. Ravoo, R. Darcy, *Chem. Commun.* **2002**, 2864-2865; b) S. A. Cryan, R. Donohue, B. J. Ravoo, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **2004**, *14*, 57-62; c) A. McMahon, E. Gomez, R. Donohue, D. Forde, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **2008**, *18*, 303-307; d) A. McMahon, M. J. O'Neill, E. Gomez, R. Donohue, D. Forde, R. Darcy, C. M.

O'Driscoll, *J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *64*, 1063-1073; e) V. Villari, A. Mazzaglia, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, N. Micali, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 811-817.

⁵² a) C. Byrne, F. Sallas, D. K. Rai, J. Ogier, R. Darcy, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3763-3771; b) M. J. O' Neill, J Guo, C Byrne, R Darcy, C. M. O' Driscoll, *Int. J. Pharm.* **2011**, *413*, 174-183; c) J. Guo, J. R. Ogier, S. Desgranges, R. Darcy, C. O'Driscoll, *Biomaterials* **2012**, *33*, 7775-7784; d) M. J. O'Neill, A. M. O'Mahonya, C. Byrne, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, *Int. J. Pharm.* **2013**, *456*, 390-399.

⁵³ a) 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. Micalli, J. Defaye, J. M. García Fernández, *Chem. Commun.* **2008**, 2001-2003; b) 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, *Human Gene Ther.* **2008**, 1157; c) A. Méndez-Ardoy, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, N. Sevillano, M. D. Girón, R. Salto, F. Santoyo-González, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2681-2684; d) 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, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12871-12888; e) A. Díaz-Moscoso, D. Vercauteren, J. Rejman, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, S. C. De Smedt, J. M. García Fernández, *J. Control. Release* **2010**, *143*, 318-325; f) A. Méndez-Ardoy, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, F. Santoyo-González, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5882-5894; g) A. Méndez-Ardoy, K. Urbiola, C. Aranda, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, C. Tros de Ilarduya, *Nanomedicine* **2011**, *6*, 1697-1707; h) C. Bienvenu, A. Martínez, J. L. Jiménez Blanco, C. Di Giorgio, P. Vierling, C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5570-5581; i) C. Aranda, K. Urbiola, A. Mendez-Ardoy, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, C. Tros de Ilarduya, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 390-397; j) A. Martínez, C. Bienvenu, J. L. Jiménez Blanco,

P. Vierling, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, C. Di Giorgio, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8143-8148.

⁵⁴ Y. Shi, H. J. Schneider, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2*, **1999**, 1797-1803.

⁵⁵ a) M. Dudic, A. Colombo, F. Sansone, A. Casnati, G. Donofrio, R. Ungaro, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 11613-11618; b) F. Sansone, M. Dudic, G. Donofrio, C. Rivetti, L. Baldini, A. Casnati, S. Cellai, R. Ungaro, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14528-14536; c) L. Baldini, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 254-266; d) V. Bagnacani, F. Sansone, G. Donofrio, L. Baldini, A. Casnati, R. Ungaro *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3953-3956.

⁵⁶ a) R. Zadmand, T. Schrader, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2769 -2772; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2703-2706; b) C. J. Breitkreuz, R. Zadmand, T. Schrader, *Supramol. Chem.* **2008**, *20*, 109-115; c) C. J. Blecking, W. Hu, R. Zadmand, A. Dasgupta, T. Schrader, *Synthesis* **2011**, *8*, 1193-1204

⁵⁷ a) P. Shahgaldian, M. A. Sciotti, U. Pieleles, *Langmuir* **2008**, *24*, 8522-8526; b) L. Nault, A. Cumbo, R. F. Pretot, M. A. Sciotti, P. Shahgaldian, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5581-5583.

⁵⁸ R. V. Rodik, A. S. Klymchenko, N. Jain, S. I. Miroshnichenko, L. Richert, V. I. Kalchenko, Y. Mely, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 5526-5538

⁵⁹ a) A. Swami, J. Shi, S. Gadde, A. R. Votruba, N. Kolishetti, O. C. Farokhzad. Nanoparticles for Targeted and Temporally Controlled Drug Delivery. In *Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery: Imaging, Targeting and Delivery*, Eds.: S. Svenson, T. K. Prud'homme, Springer, **2012**, pp. 9-21; b) N. M. Zaki, N. Tirelli, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7*, 895-91; c) R. A. Sperling, W. J. Parak, *Phil. Trans. R. Soc. A* **2010**, *368*, 1333-1383.

⁶⁰ W. Yu, N Zhang, C. Li, *Curr. Pharm. Design.* **2009**, *15*, 3826-3836.

⁶¹ a) A. Díaz-Moscoso, N. Guilloteau, C. Bienvenu, A. Méndez-Ardoy, J. L. Jiménez Blanco, J. M. Benito, L. Le Gourrière, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, C. Ortiz

Mellet, J. M. García Fernández, *Biomaterials* **2011**, *32*, 7263-7273; b) N. Symens, A. Méndez-Ardoy, A. Díaz-Moscoso, E. Sánchez-Fernández, K. Remaut, J. Demeester, J. M. García Fernández, S. C. De Smedt, J. Rejman, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1276-1289.

⁶² M. K. Yu, J. Park, S. Jon, *Theranostics*, **2012**, *2*, 3-44.

⁶³ C. Fortier, Y. Durocher, G. De Crescenzo, *Nanomedicine* **2014**, *9*, 135-151.

⁶⁴ G. Chen, M. Jiang, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2254-2266.

⁶⁵ J. Voskuhl, M. C. A. Stuart, B. J. Ravoo, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2790-2796.

⁶⁶ D. J. Buckwalter, A. Sizovs, N. Ingle, P. Nilesh T. M. Reineke, *ACS Macro Letters* **2012**, *1*, 609-613.

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos.

El objetivo central de esta Tesis es el diseño y preparación de macromoléculas basadas en ciclodextrinas y calixarenos, con estructuras homogéneas y bien definidas, capaces de auto-ensamblarse para generar nanosistemas que funcionen como transportadores de fármacos y ácidos nucleicos. En concreto, esta Tesis se ha centrado en el desarrollo de los siguientes objetivos:

- Estudio de las propiedades de dimerización y complejación de derivados de ciclodextrinas funcionalizados en su cara secundaria con sustituyentes aromáticos y su potencial en el diseño de vectores de genes sensibles a pH.

- Evaluación de la estrategia de preorganización supramolecular de ciclodextrinas policatiónicas para la complejación de ácidos nucleicos.

- Estudio comparativo de las propiedades como transportadores de genes de ciclodextrinas y calixarenos policatiónicos anfifílicos.

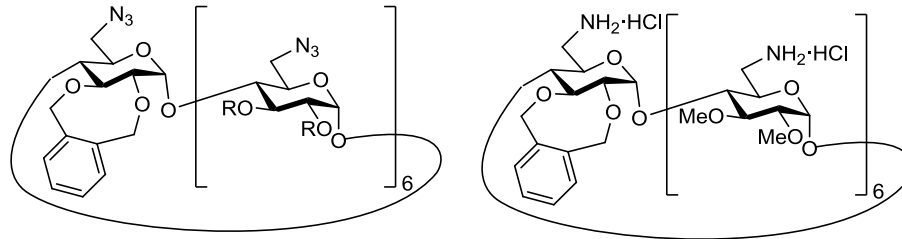
- Síntesis de calixarenos policatiónicos anfifílicos tipo *gemini*.

- Preparación de nanoesferas y nanocápsulas autoensambladas a partir de heterodímeros ciclodextrina—calixareno monodispersos. Análisis de la estrategia de post-funcionalización supramolecular para la incorporación de ligandos biorreconocibles y evaluación de su capacidad como transportadores de fármacos.

- Estudios de interacción multivalente carbohidrato-lectina.

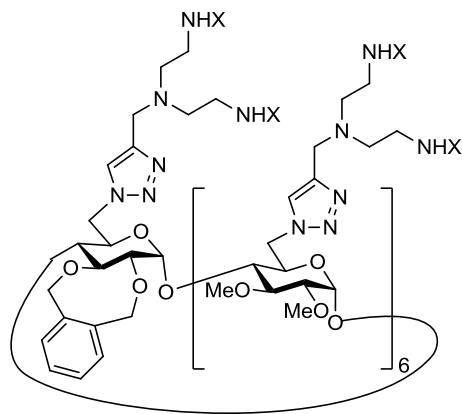
El desarrollo de esta Tesis ha dado lugar a la preparación de una serie de nuevos compuestos y precursores cuyas estructuras se presentan a continuación:

Ciclodextrinas policationicas dimerizables: incorporación del grupo *o*-xilileno en la cara secundaria de la β CD.

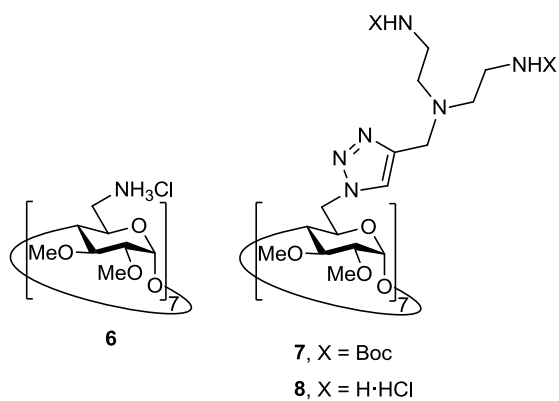


1, R = H
2, R = Me

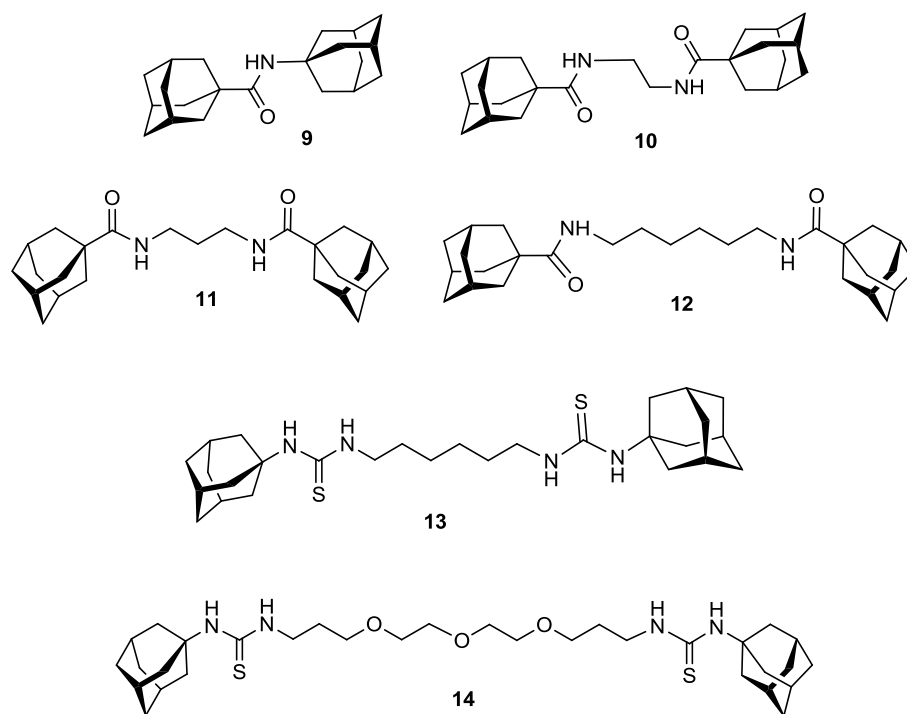
3

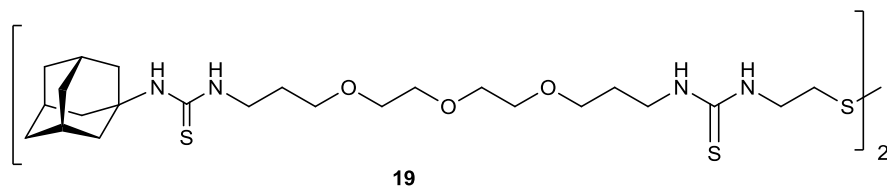
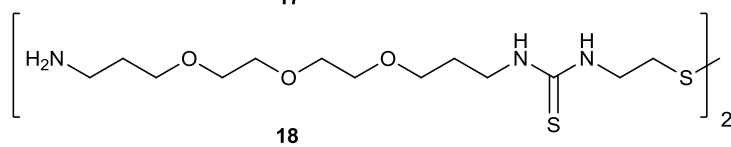
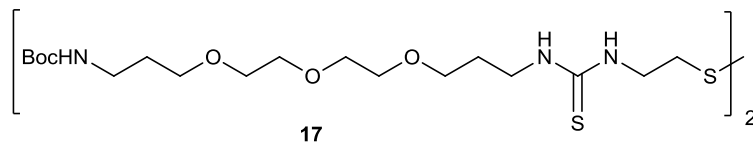
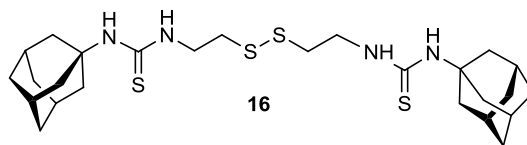
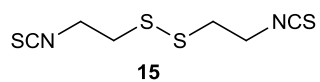


4, X = Boc
5, X = H·HCl

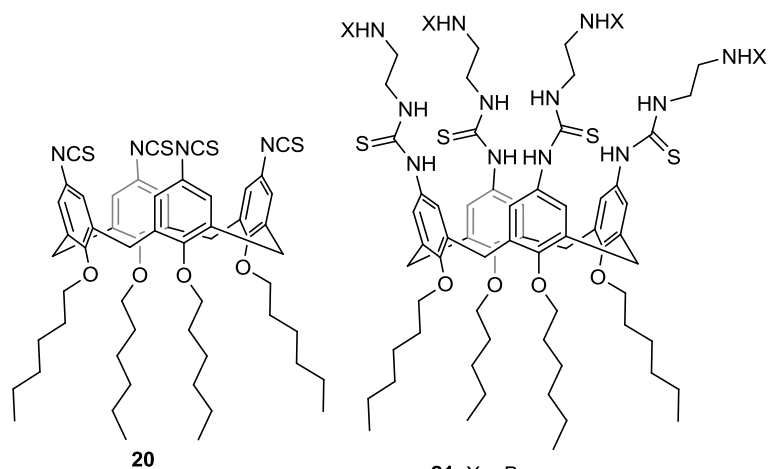


**Sistemas multicomponentes supramoleculares para el transporte de genes:
conectores de tipo bis-adamantano.**





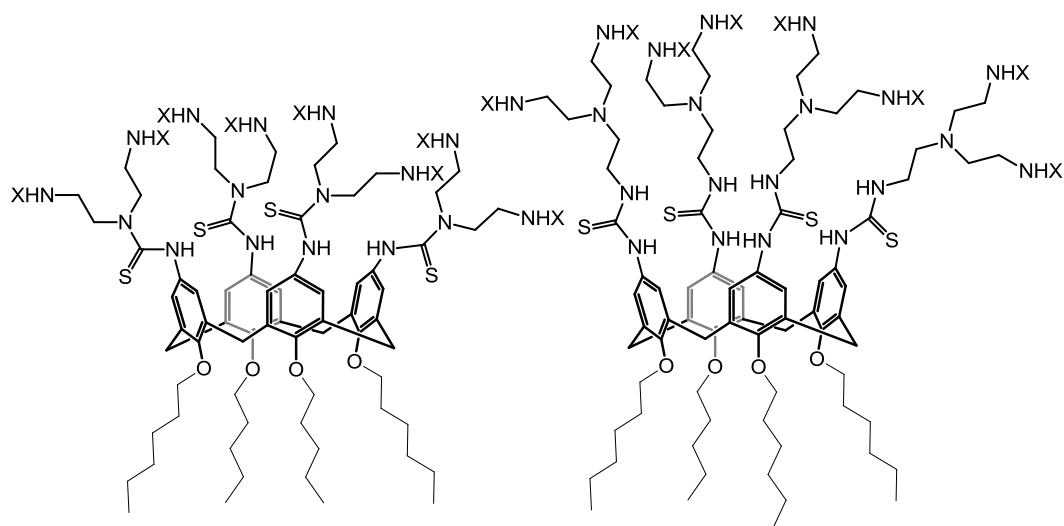
Sistemas policationicos anfifilicos basados en ciclodextrinas y calixarenos para transfección génica.



20

21, X = Boc

22, X = H·HCl

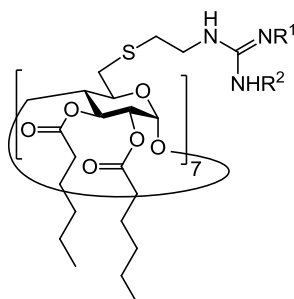


23, X = Boc

24, X = H·HCl

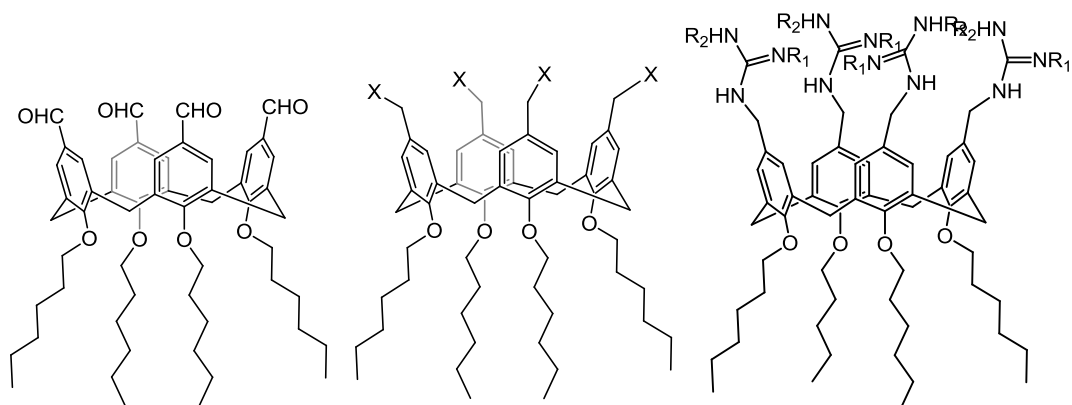
25, X = Boc

26, X = H·HCl



27, $R^1 = R^2 = \text{Boc}$

28, $R^1 = R^2 = \text{H} \cdot \text{HCl}$



29

30, $X = \text{OH}$

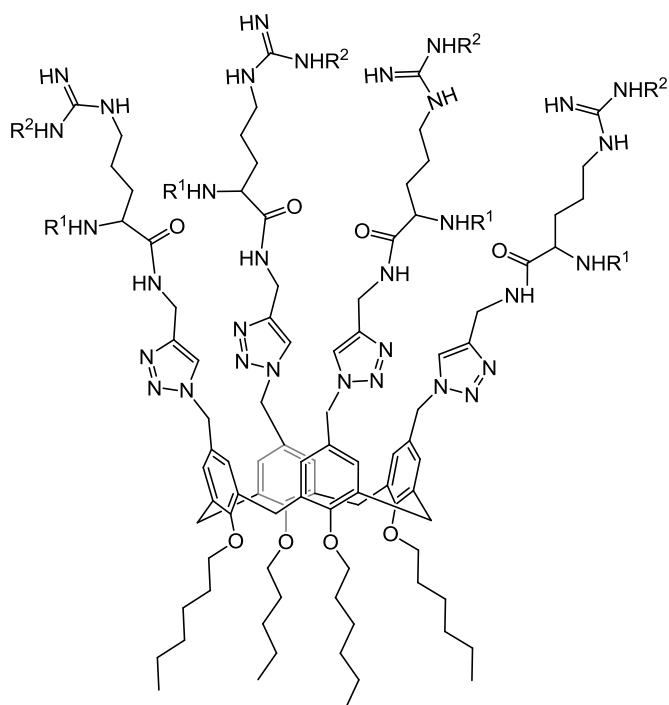
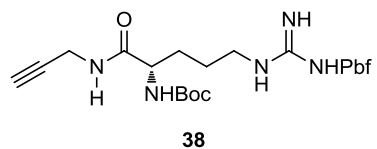
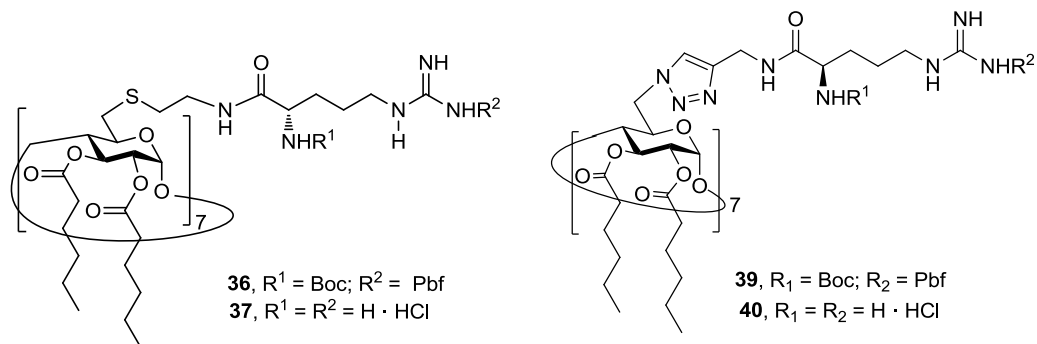
31, $X = \text{Cl}$

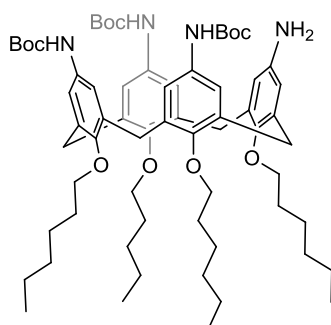
32, $X = \text{N}_3$

33, $X = \text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$

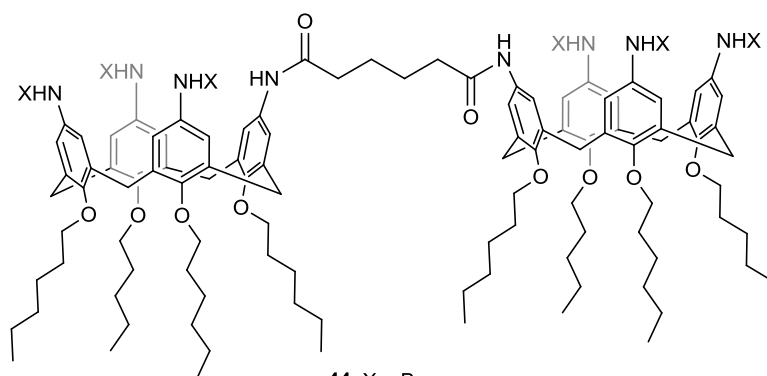
34, $R_1 = R_2 = \text{Boc}$

35, $R_1 = R_2 = \text{H} \cdot \text{HCl}$



Calixarenos policatiónicos anfífilicos diméricos.

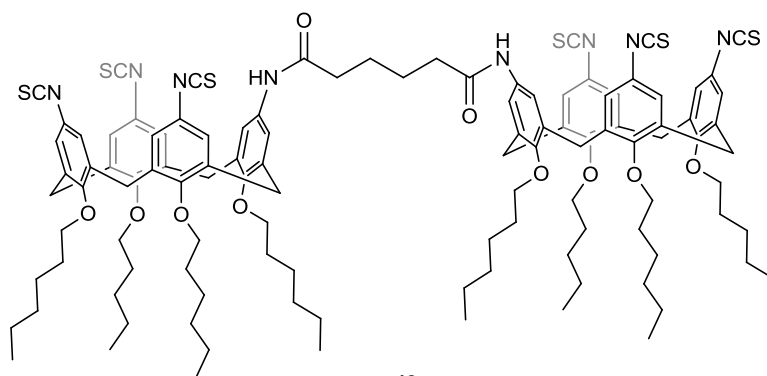
43



44, X = Boc

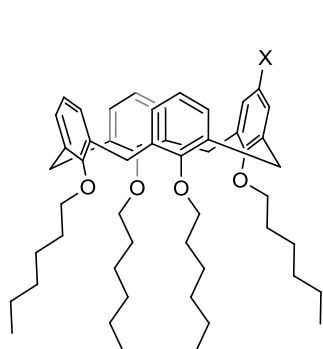
45, X = H·HCl

46, X = C(=O)Cl

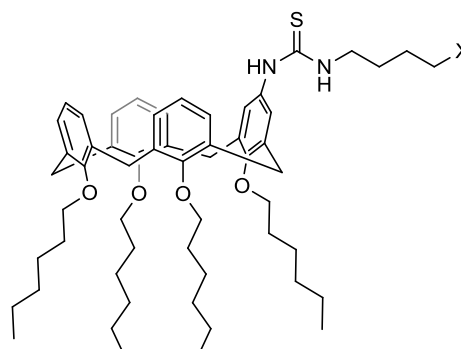
47, X = C(=O)N₃

48

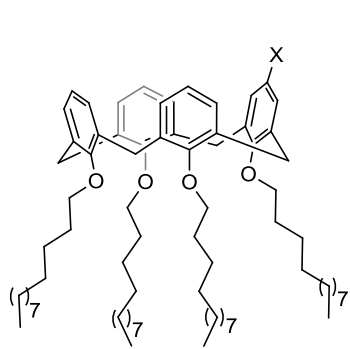
Sistemas híbridos autoensamblables ciclodextrina-calixareno para la preparación de nanoesferas y nanocápsulas.



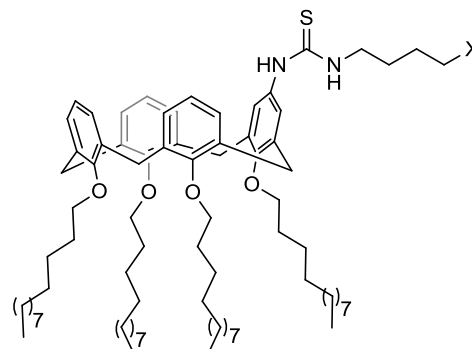
49, X = NO₂
50, X = NH₂
51, X = NCS



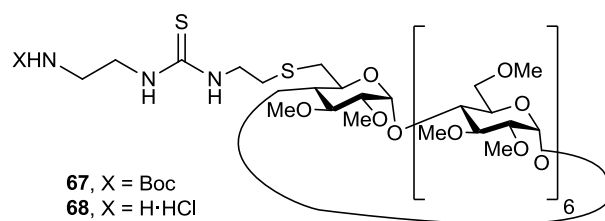
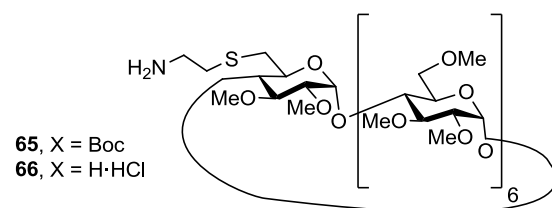
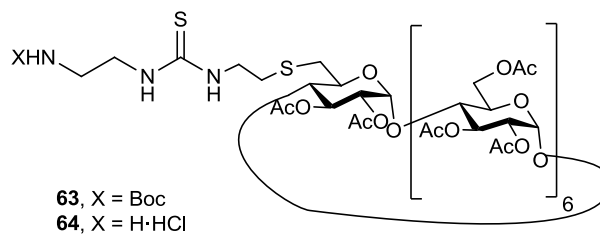
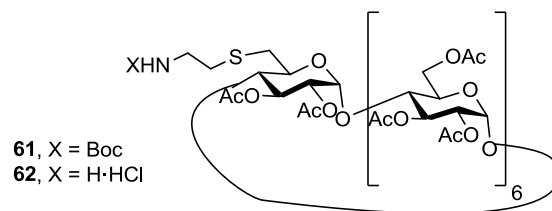
52, X = NHBoc
53, X = NH₂
54, X = NCS

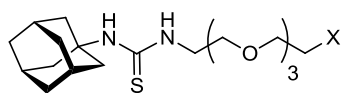
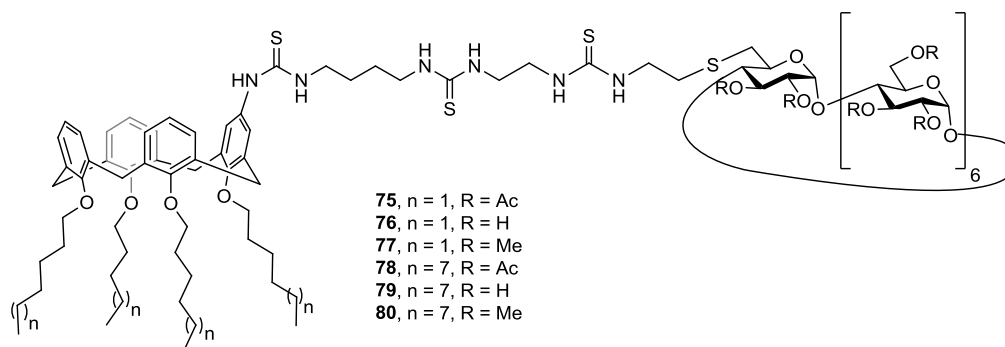
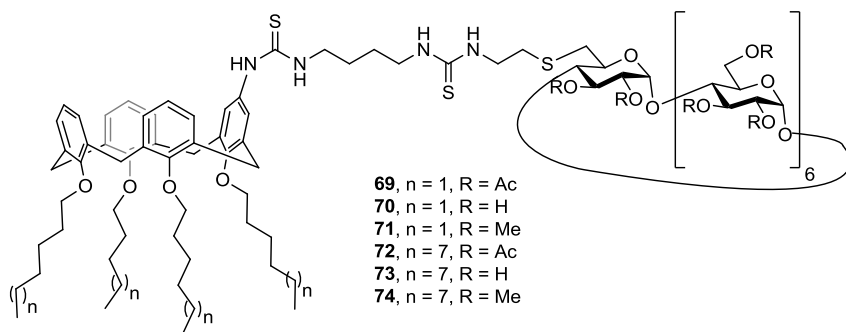


55, X = NO₂
56, X = NH₂
57, X = NCS

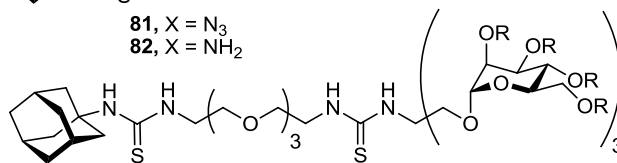


58, X = NHBoc
59, X = NH₂
60, X = NCS





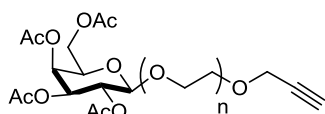
- 81**, $X = \text{N}_3$
82, $X = \text{NH}_2$



- 83**, $R = \text{Ac}$
84, $R = \text{H}$

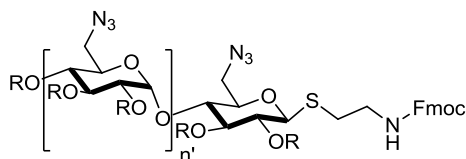
Sistemas multivalentes sobre plataformas oligosacáridicas.

Galactósidos protegidos

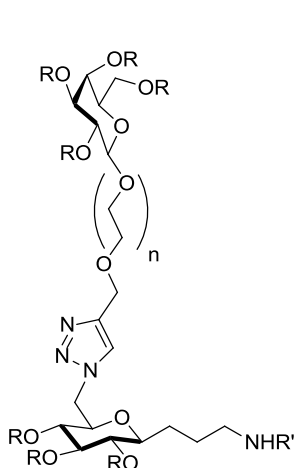


85, $n = 0$
86, $n = 3$
87, $n = 8$

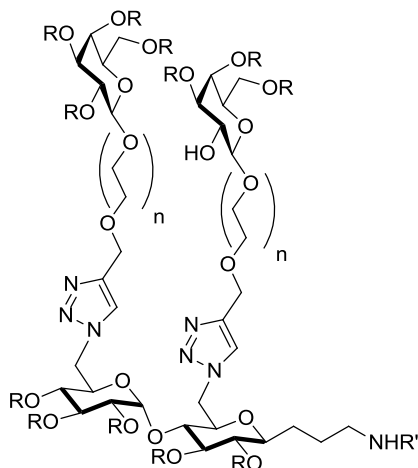
Glucósidos protegidos



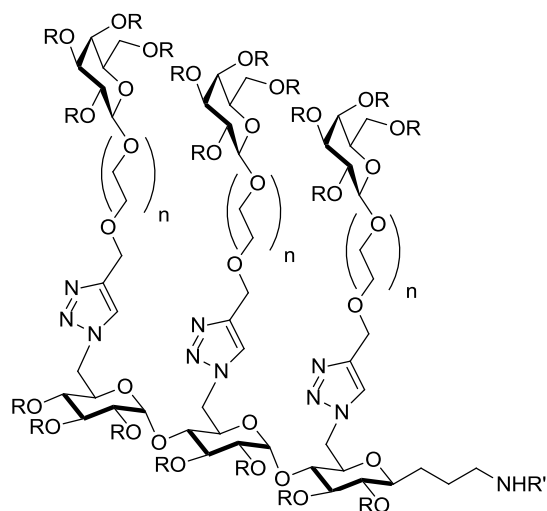
88, $n' = 0$, $R = \text{Ac}$
89, $n' = 1$, $R = \text{Ac}$
90, $n' = 2$, $R = \text{Ac}$
91, $n' = 6$, $R = \text{Bz}$



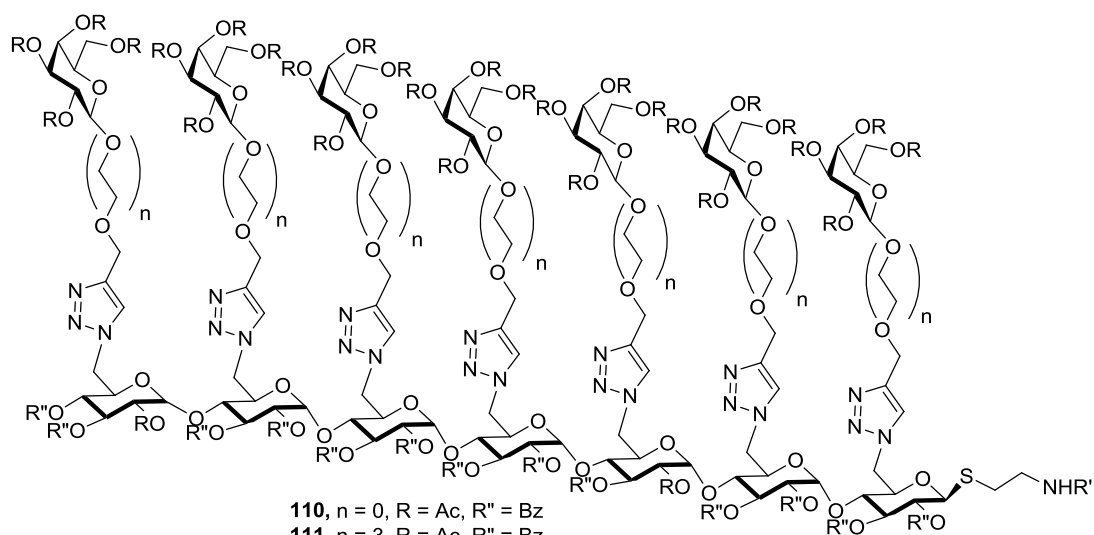
92, $n = 0$, $R = \text{OAc}$, $R' = \text{Fmoc}$
93, $n = 3$, $R = \text{OAc}$, $R' = \text{Fmoc}$
94, $n = 8$, $R = \text{OAc}$, $R' = \text{Fmoc}$
95, $n = 0$, $R = R' = \text{H}$
96, $n = 3$, $R = R' = \text{H}$
97, $n = 8$, $R = R' = \text{H}$



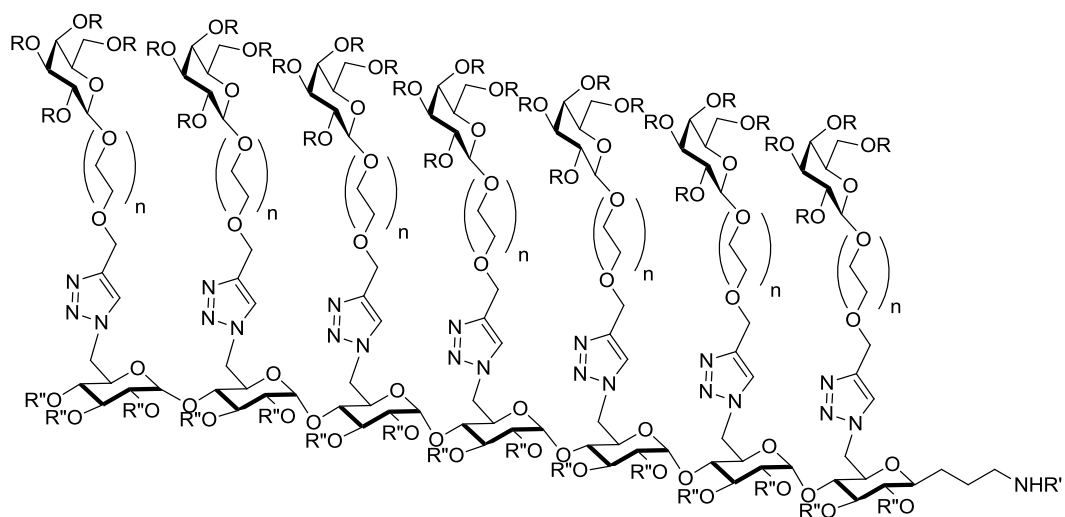
98, $n = 0$, $R = \text{OAc}$, $R' = \text{Fmoc}$
99, $n = 3$, $R = \text{OAc}$, $R' = \text{Fmoc}$
100, $n = 8$, $R = \text{OAc}$, $R' = \text{Fmoc}$
101, $n = 0$, $R = R' = \text{H}$
102, $n = 3$, $R = R' = \text{H}$
103, $n = 8$, $R = R' = \text{H}$



- 104**, $n = 0$, $R = \text{OAc}$, $R' = \text{Fmoc}$
105, $n = 3$, $R = \text{OAc}$, $R' = \text{Fmoc}$
106, $n = 8$, $R = \text{OAc}$, $R' = \text{Fmoc}$
107, $n = 0$, $R = R' = \text{H}$
108, $n = 3$, $R = R' = \text{H}$
109, $n = 8$, $R = R' = \text{H}$



- 110**, $n = 0$, $R = \text{Ac}$, $R'' = \text{Bz}$
111, $n = 3$, $R = \text{Ac}$, $R'' = \text{Bz}$
112, $n = 8$, $R = \text{Ac}$, $R'' = \text{Bz}$
113, $n = 0$, $R = \text{H}$, $R'' = \text{H}$
114, $n = 3$, $R = \text{H}$, $R'' = \text{H}$
115, $n = 8$, $R = \text{H}$, $R'' = \text{H}$

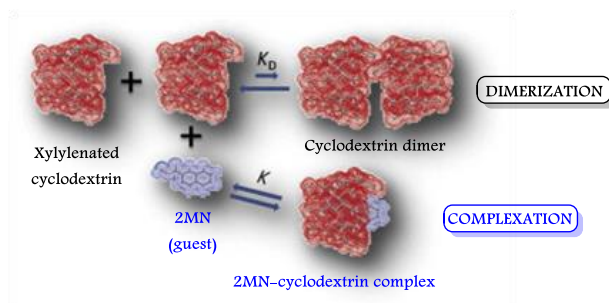


- 110** $n = 0$, $R = \text{OAc}$, $R = \text{Fmoc}$, $R'' = \text{Bz}$,
111 $n = 3$, $R = \text{OAc}$, $R = \text{Fmoc}$, $R'' = \text{Bz}$
112 $n = 8$, $R = \text{OAc}$, $R = \text{Fmoc}$, $R'' = \text{Bz}$
113 $n = 0$, $R = R'' = \text{H}$
114 $n = 3$, $R = R'' = \text{H}$
115 $n = 8$, $R = R'' = \text{H}$

Capítulo 3

Estudio de las propiedades de dimerización y complejación de α -, β - y γ -ciclodextrinas (CDs) funcionalizadas en su cara secundaria con sustituyentes aromáticos

Abstract. 2^{1,3}-O-(o-xylene)-cyclodextrin derivatives self-aggregate in water to afford stable dimers. In presence of a hydrophobic fluorescent polarity sensitive probe like methyl 2-naphthalenecarboxylate (2MN), which exhibits high affinity towards the macrocycle cavity, an additional complexation equilibrium will take place together with the dimerization process. Steady-state and time-resolved fluorescence techniques, as well as molecular mechanics and molecular dynamics calculations, have been employed for the study of thermodynamics and kinetics of dimerization and inclusion processes. It will be particularly useful for designing modified cyclodextrins with characteristics that are better suited for promoting interactions with drugs and gene material.



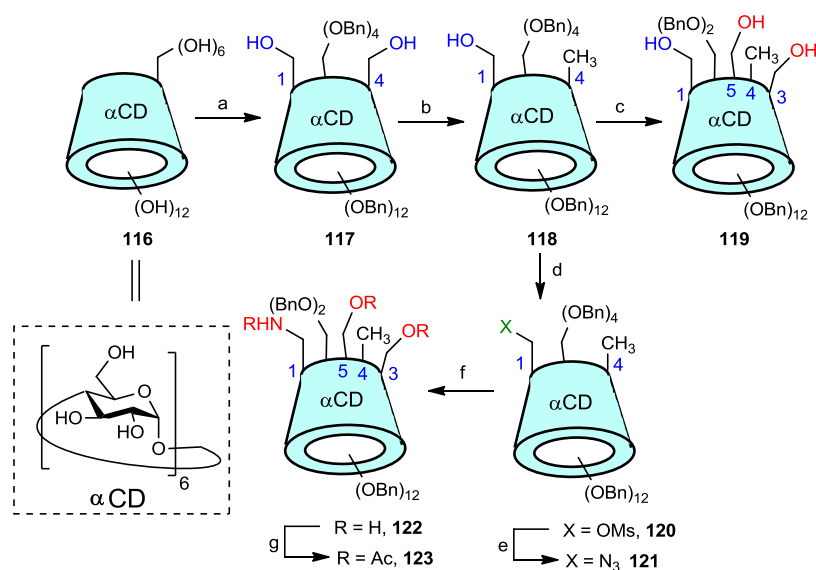
3. Estudio comparativo de las propiedades de dimerización y complejación de α -, β - y γ -ciclodextrinas (CDs) metiladas funcionalizadas en su cara secundaria con un puente de xilileno.

3.1. Antecedentes bibliográficos.

La posibilidad de modular las propiedades de inclusión y de autoasociación de las ciclodextrinas mediante modificación química selectiva¹ ha contribuido de manera decisiva a establecer su posición de privilegio en el campo de la química supramolecular, con aplicaciones que abarcan la preparación de catalizadores,² miméticos de enzimas,³ unidades para construir dispositivos funcionales^{4,5} o sistemas de liberación de fármacos,^{6,7} entre otras. Así, existen métodos muy eficaces para la funcionalización diferenciada de los hidroxilos primarios y secundarios, situados en caras opuestas de la estructura ciclooligosacáridica, entre los que destaca la sustitución completa de los hidroxilos primarios por halógeno descrita por Defaye.⁸ El posterior desplazamiento nucleofílico de los halógenos demuestra la versatilidad de este método para el acceso a derivados de CDs selectivamente funcionalizados en la cara primaria. La mayor nucleofilia junto con el menor impedimento estérico de los grupos hidroxilos primarios hacen posible la funcionalización de la cara primaria de las CDs sin necesidad de emplear grupos protectores en la cara secundaria. El mismo grupo ha desarrollado una metodología que permite la tosilación de una única de las posiciones primarias con rendimiento del 50%,⁹ lo que ha permitido acceder a un gran número de conjugados monosustituídos.

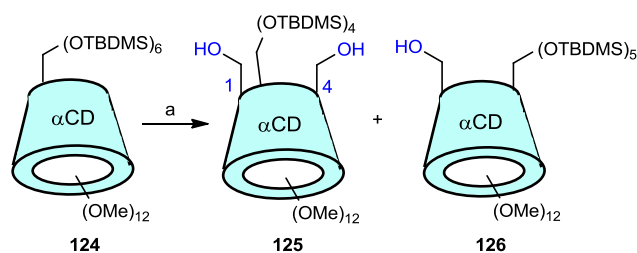
La modificación regioselectiva de las ciclodextrinas en varias posiciones definidas representa un problema más complicado. Sinay y colaboradores han descrito la preparación de CDs con uno o dos grupos hidroxilos diferenciados en la cara primaria mediante des-*O*-bencilación de CDs perbenciladas con hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H).¹⁰ Esta aproximación ha sido posteriormente extendida por Sollogoub para la

preparación de una serie de derivados de la α CD, **117-123**, con grado creciente de complejidad (Esquema 3.1).¹¹



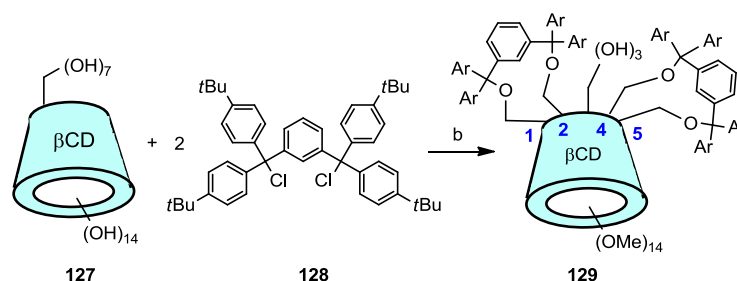
Esquema 3.1. Funcionalización regioselectiva de la α CD descrita por Sollogoub. Reactivos y condiciones: a) i. BnCl , ii. DIBAL-H, tolueno, 50°C , 2 h, 82%; b) i. SO_2 , DCM, t.a., 2 h, 99%, ii. LiAlH_4 , THA, t.a. $\rightarrow 50^\circ\text{C}$, 15 min., 51%; c) DIBAL-H, tolueno, $50^\circ\text{C} \rightarrow$ t.a., 2.5 h, 61%; d) MsCl , DMC, Et_3N , $0^\circ\text{C} \rightarrow$ t.a., 15 min, 51%; e) NaN_3 , DMF, 80°C , 14 h, 99%; f) DIBAL-H, t.a. $\rightarrow 55^\circ\text{C}$, 1 h, 71%; g) Ac_2O /piridina, DMAP, t.a., 15 h, 99%.

Ling y col. también han empleado DIBAL-H para la mono- y la di-desililación de CDs sililadas en las posiciones primarias y metiladas en las posiciones secundarias (**124** \rightarrow **125** y **126**, Esquema 3.2).¹²



Esquema 3.2. Desililación regioselectiva de la cara primaria de CDs sililadas descrita por Ling. Reactivos y condiciones: a) DIBAL-H, tolueno, 0°C , 3-4 h, 68% (**125**), 10% (**126**).

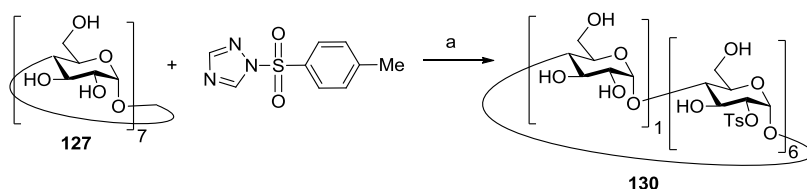
Otra estrategia para la funcionalización selectiva de grupos hidroxilos primarios de CDs consiste en el empleo de agentes difuncionales sulfonantes, trilitantes o alquilantes que reaccionan selectivamente con dos grupos hidroxilo en distintas posiciones según la longitud y la geometría del espaciador. Recientemente, Sollogoub ha publicado una revisión sobre la funcionalización selectiva de dos posiciones en la cara primaria de las CDs mediante el empleo de reactivos capaces de formar derivados de tipo puente que puedan sustituirse posteriormente por desplazamiento nucleofílico.¹³ Un ejemplo representativo descrito por Toupet y col. es la preparación de β CDs tetrasustituidas en la cara primaria (**129**) mediante el empleo de cloruro de bistrilito (**128**) (Esquema 3.3).¹⁴



Esquema 3.3. Funcionalización selectiva de dos posiciones en la cara primaria de la CD descrita por Toupet. Reactivos y condiciones: a) i. DMAP, piridina, 70 °C. ii. NaH, MeI, imidazol, DMF, t.a., 50%.

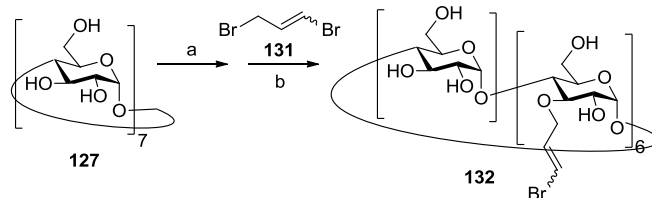
La funcionalización selectiva de la cara secundaria de las ciclodextrinas presenta mayores dificultades debido principalmente a un mayor impedimento estérico en comparación con la cara primaria. Además, los puentes de hidrógeno intramoleculares limitan su flexibilidad, y el hecho de que existan grupos hidroxilo en las posiciones 2 y 3 implican un mayor número de isómeros de posición posibles. No obstante, se han desarrollado algunos métodos de preparación de derivados de ciclodextrinas selectivamente funcionalizados sobre uno o todos los grupos OH-2 aprovechando la mayor acidez de estos hidroxilos en comparación con los OH-6 y OH-3. Así, Defaye y

col. han descrito la preparación de derivados selectivamente monosilados en la posición *O*-2 de la β CD (**127**) empleando 1-(*p*-tolilsulfonyl)-(1*H*)-1,2,4-triazol (Esquema 3.4).¹⁵ El derivado obtenido, **130**, se puede emplear para la obtención de otros compuestos monosustituídos mediante reacciones de sustitución nucleofílica con inversión de la configuración de la posición reactiva (Esquema 3.4).



Esquema 3.4. Monosilación en *O*-2 de la β CD descrita por Defaye. Reactivos y condiciones. a. NaH, DMF, 4 h, 0°C \rightarrow t.a.

También se han descrito derivados selectivamente sustituidos en una o varias posiciones de la cara secundaria de las CDs previa protección de los grupos hidroxilo de la cara primaria. Por ejemplo, Zhang y col. han preparado derivados per- y mono-(*O*-2) alquilados con sustituyentes de tipo bencílico en CDs per(*O*-6)-sililadas.¹⁶ Estour y col. han descrito un método de preparación de derivados de CDs regioselectivamente alilados en la posición *O*-3 (**132**), a partir de la β CD **127** con el dihaluro **131** (Esquema 3.5).¹⁷



Esquema 3.5. Funcionalización regioselectiva en la cara secundaria de la CD descrita por Estour. Reactivos y condiciones: a) CuSO₄, NaOH, H₂O; b) i. MeCN, ii. 10% aq. HCl., 38%.

Zhang y col. han llevado a cabo desmetilaciones regioselectivas en la cara secundaria de CDs permetiladas empleando DIBAL-H, lo que permite diferenciar uno o dos hidroxilos secundarios de la CD.¹⁸

En el marco de esta Tesis, uno de los objetivos planteados ha sido el diseño de derivados de ciclodextrinas funcionalizadas con grupos policatiónicos en la cara primaria y con grupos funcionales hidrófobos en la cara secundaria los cuales, en medio acuoso, promuevan la formación de especies diméricas. Estos derivados quedarían enfrentados por la cara secundaria originando dímeros cabeza-cabeza y podrían complejar el ADN mediante interacciones electrostáticas (Figura 3.1). Consideraciones estructurales permiten predecir una compactación de ácidos nucleicos más eficaz para estos dímeros en comparación con los correspondientes monómeros (ver Capítulo 4).

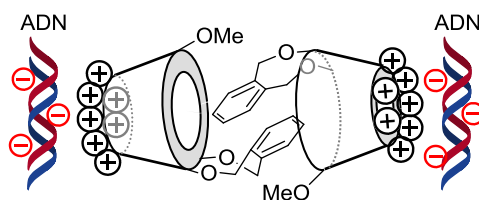
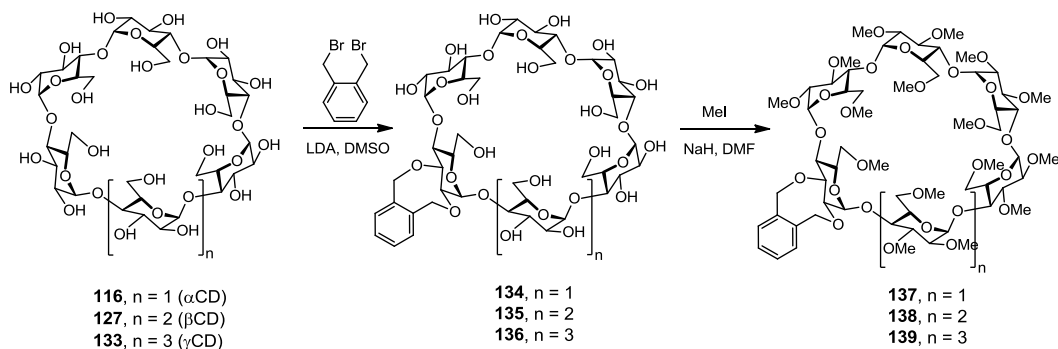


Figura 3.1. Complejación de ADN por dímeros de CDs policatiónicas funcionalizadas con grupos aromáticos en la cara secundaria.

Con este objetivo, nos propusimos la introducción de un fragmento aromático en una única unidad de glucopiranososa de la CD. La aproximación escogida requiere la funcionalización simultánea de dos hidroxilos secundarios vecinales de un fragmento de glucosa, lo que supone un reto sintético importante. No obstante, nuestro grupo de investigación ha demostrado que las posiciones *O*-2 y *O*-3 de una misma unidad de glucosa en α -, β - y γ -ciclodextrina (**116**, **127** y **133**) pueden alquilarse en un solo paso utilizando α,α' -dibromo-*o*-xileno como reactivo (\rightarrow **134-136**; Esquema 3.6). La posterior metilación del resto de grupos hidroxilo conduce a derivados más solubles agua (**137-139**). Los compuestos obtenidos representan un ejemplo único de CDs selectivamente funcionalizadas. La presencia del anillo aromático doblemente enlazado no sólo

promueve la formación de dímeros sino que, además, permite la realización de estudios termodinámicos mediante técnicas de fluorescencia.¹⁹



Esquema 3.6. Síntesis regioselectiva de derivados de CDs xililenadas **137**, **138** y **139**.

Resultados experimentales y cálculos teóricos, obtenidos en colaboración con el grupo del Prof. F. Mendicuti de la Universidad de Alcalá de Henares, pusieron de manifiesto la presencia de un equilibrio conformacional en el que el grupo xilileno se presenta en dos disposiciones: una conformación *tapadera*, en la que el anillo aromático bloquea la cara secundaria de la ciclodextrina, y una conformación *abierta*, en la que el grupo xilileno no se encuentra plegado sobre la cavidad. Este equilibrio está desplazado hacia la forma *abierta* y se da a bajas concentraciones de CD, mientras que a altas concentraciones se confirma la formación de dímeros relativamente estables en agua (Figura 3.2).

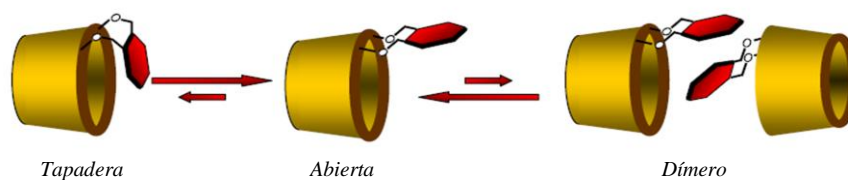


Figura 3.2. Representación esquemática de los equilibrios conformacional y de agregación de las ciclodextrinas xililenadas.

Los estudios teóricos demostraron que la geometría preferida para los dímeros es la que resulta a partir de dos monómeros de CDs xililenadas en conformación *abierta* en los que quedan enfrentadas sus caras secundarias (estructura tipo *cabeza-cabeza*) a distancias que permiten que ambos anillos aromáticos interaccionen sin penetrar en la cavidad de la otra molécula de CD (Figura 3.2).^{20,21} Resultados análogos se obtuvieron cuando el grupo xilileno se reemplazó por un grupo 1,8-dimetilnaftalen- α,α' -diilo, aunque la ruta de síntesis resultó ser más costosa.^{22,23}

Dado que la arquitectura de los dímeros obtenidos a partir de los derivados xililenados de ciclodextrinas es la adecuada para el propósito de esta Tesis, antes de proceder a la preparación de análogos policatiónicos capaces de complejar ácidos nucleicos, nos propusimos, en colaboración con el Prof. F. Mendicuti, el estudio de la termodinámica de complejación de los derivados neutros **137-139**, mediante técnicas de fluorescencia^{24,25,26} y cálculos computacionales. Se empleó como huésped el 2-naftoato de metilo, (**2MN**), una molécula pequeña e hidrófoba, capaz de incluirse en la cavidad de la CD, que funciona como sonda fluorescente sensible a la polaridad del medio. En este estudio previo con dímeros neutros que no interaccionan con nucleótidos, el principal objetivo ha sido la evaluación de la competencia del proceso de complejación del **2MN** con el de dimerización de las CDs xililenadas, cuyo estudio servirá de base para entender otros procesos similares en los que se den simultáneamente fenómenos de autoasociación entre las moléculas de CDs y de complejación supramolecular de biomoléculas, tal y como cabe esperar que ocurra entre ciclodextrinas policatiónicas xililenadas y el ADN. Con objeto de evaluar la influencia del grupo xilileno en los equilibrios implicados, se compararon los resultados obtenidos para los derivados **137-139** con los de ciclodextrinas permetiladas (**140-142**), que carecen del anillo aromático (Figura 3.3) En la Figura 3.3 también se muestra la estructura de las CDs 2-hidroxipropilciclodextrinas (HPCDs, **143-145**), a las que se hará referencia a efectos comparativos.

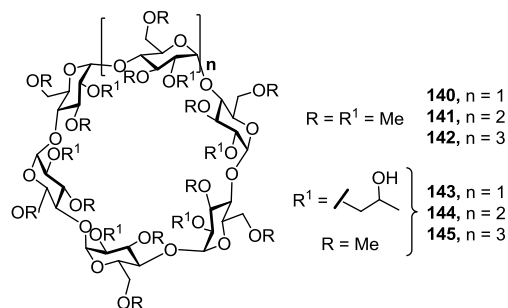


Figura 3.3. Estructura de las CDs permetiladas (**140-142**) y 2- hidroxipropiladas (**143-145**).

Se trata del primer ejemplo de estudio de la termodinámica de complejación de una sonda fluorescente por CDs modificadas que pueden estar implicadas en otros procesos competitivos.

3.2. Resultados y discusión.

3.2.1. Espectros de emisión de fluorescencia.

El proceso de complejación del **2MN** por CDs en disolución acuosa supone un cambio considerable en la polaridad del entorno del huésped, que pasa del medio acuoso a la cavidad hidrófoba de la CD (Figura 3.4). Estos cambios implican variaciones en el espectro de emisión de fluorescencia, lo que permite estudiar los equilibrios de complejación y determinar las constantes de equilibrio y estequiometrías de los complejos.

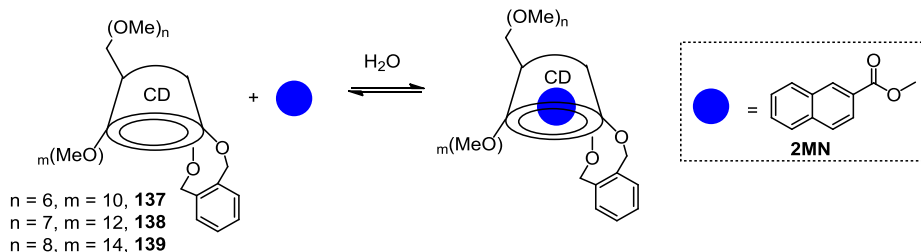


Figura 3.4. Representación esquemática del equilibrio de complejación del 2-naftoato de metilo (**2MN**) por las CDs xililenadas **137-139**.

Con este objetivo se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de **2MN** en presencia de las CDs xililenadas (**137-139**) y sus homólogos permetilados (**140-142**), empleando las longitudes de onda de excitación del huésped ($\lambda = 292$ nm) y del grupo xilileno ($\lambda = 260$ nm).

En primer lugar se registraron los espectros de emisión de fluorescencia tras la excitación selectiva del huésped ($\lambda = 292$ nm), para disoluciones acuosas de 2-naftoato de metilo libre, **2MN/CDs** xililenadas y **2MN/CDs** permetiladas a diferentes concentraciones de CDs y a 25 °C (Figura 3.5). En todos los casos se observaron bandas similares a las del espectro de emisión del **2MN** libre o de sus disoluciones acuosas con las CDs nativas (**116**, **127**, **133**)^{24,26} o las HPCDs (**143-145**),²⁷ esto es, dos bandas centradas a 360 y 385 nm, cuyos máximos experimentan un ligero desplazamiento hacia longitudes de onda menores cuando aumenta la concentración de CD. La excepción es el sistema de **2MN** con la α CD metilada, **140**, en la que aparece una nueva banda a 340 nm al aumentar la concentración de CD. En todos los casos se detectan cambios en la intensidad de fluorescencia cuya tendencia depende del tipo de CD empleada.

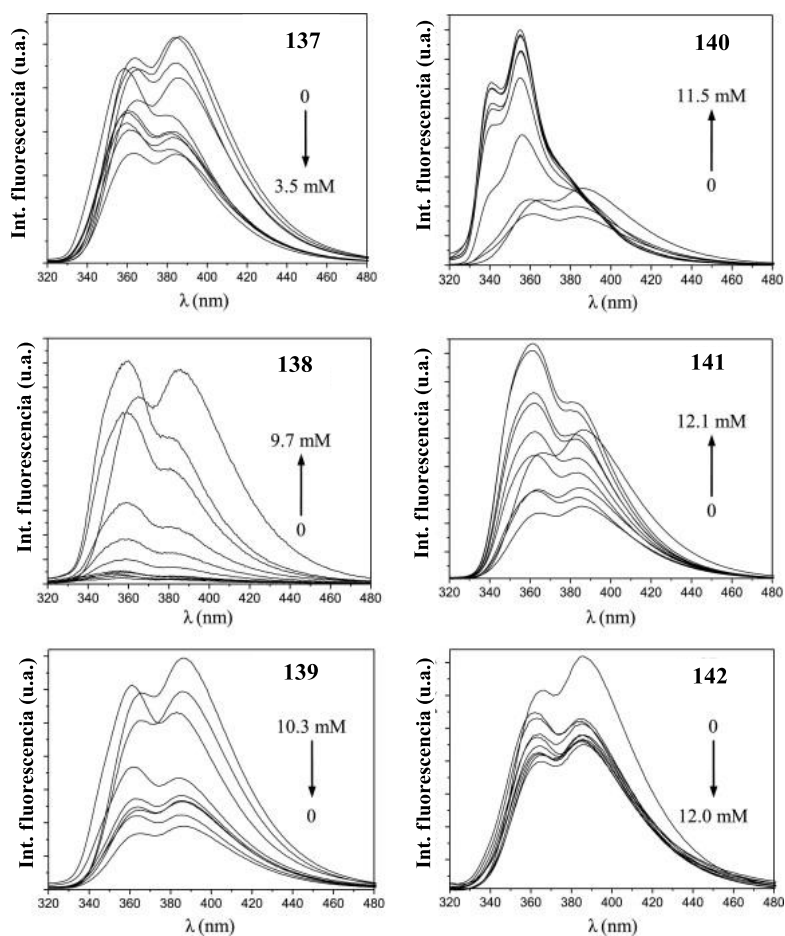


Figura 3.5. Espectros de emisión de disoluciones acuosas de **2MN** y **2MN** con CDs xililenadas (**137-139**) y metiladas (**140-142**) a diferentes [CD] y a 25 °C, tras la excitación selectiva del huésped **2MN** (292 nm).

Sin embargo, el parámetro que nos ofrece más información sobre el proceso de complejación no es la posición ni la intensidad de las bandas de emisión de fluorescencia sino la relación de intensidades de las bandas ($R = I_{385 \text{ nm}}/I_{360 \text{ nm}}$), que es muy sensible a la polaridad del medio.²⁷ Por ello nos centraremos en el estudio de la variación de R con la concentración de CD en una disolución acuosa de concentración fija de huésped, **2MN**.

La variación de R con $[CD]$ muestra una disminución del valor de R al aumentar la concentración de CD (en la Figura 3.6 se muestran los datos 25 °C; los resultados obtenidos a otras temperaturas se recogen en la Figura A.1 del anexo 1). Dado que la concentración de huésped es constante, el aumento de la concentración de CD supone un aumento de la fracción de huésped complejado, con la consiguiente disminución en la polaridad de su entorno que hace que varíe R . En conclusión, estas medidas indican que R es un parámetro que se puede emplear para monitorizar la fracción complejada de **2MN**, ya que su valor disminuye durante el proceso de complejación. Las líneas de la Figura 3.6 se obtuvieron por ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones que relacionan R con $[CD]$ (ver anexo 2, apartado 4) que se emplearán en el apartado 3.2.5.

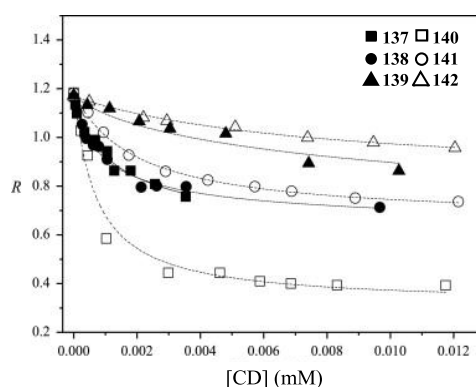


Figura 3.6. Relación de intensidades de bandas de fluorescencia, R , frente a $[CD]$, para disoluciones acuosas de **2MN**/CDs xililenadas (**137-139**) y **2MN**/CDs permetiladas **140-142** (25 °C, λ de excitación del **2MN**, 292 nm).

La magnitud de la variación de R depende fuertemente del tipo de CD . En el caso de la α CD permetilada, **140**, la variación es mucho mayor que con los demás derivados, lo que implica que la disminución de la polaridad del entorno del **2MN** es más acusada que en el resto de sistemas. La variación menor de R (y por tanto la menor disminución de la polaridad) la encontramos en el caso de los sistemas con derivados de γ CD, **2MN/142** y **2MN/139**.

Por otra parte, cuando se empleó la longitud de onda de excitación del grupo xilileno (260 nm) para las disoluciones acuosas de **2MN** y las CDs xililenadas, los espectros de emisión de fluorescencia mostraron una banda a 288 nm debida al grupo xilileno, además de las dos bandas características del **2MN** cuyo comportamiento fue similar al que se observó tras la excitación a 292 nm. La banda de emisión del grupo xilileno obviamente aumenta al aumentar la concentración de CD xililenada, puesto que se incrementa la concentración del cromóforo que se está excitando, mostrando una dependencia lineal con la concentración similar a la que se observa en ausencia de **2MN**.^{21,22} El hecho de que no se produzcan variaciones en las bandas de emisión del xilileno y del **2MN** implica que el grupo xilileno de las CDs **135-137** no transfiere su energía de excitación al **2MN**. De hecho, el radio de Förster, parámetro que da información sobre la distancia mínima necesaria para que la transferencia de energía de un cromóforo a otro sea de un 50%, se estimó en torno a 1 Å (ver anexo 2, apartado 1).²⁸

Con respecto a los procesos que compiten con la fluorescencia, cabe destacar que ninguno de los espectros mostró ensachamiento o desplazamiento de las bandas hacia mayores longitudes de onda durante la complejación, a ninguna concentración ni temperatura, lo que denota la ausencia de excímeros (dímeros que se forman por la interacción de dos moléculas iguales, una en el estado excitado y otra en el estado fundamental) o exciplejos (análogos a los excímeros pero las moléculas que interaccionan son diferentes).

En resumen, se ha demostrado que las técnicas de fluorescencia son sensibles a los cambios de polaridad que se producen, en el entorno del fluoróforo (**2MN** o xilileno), durante los procesos de auto-asociación de las CDs xililenadas y de complejación de **2MN** por CDs xililenadas y metiladas, por lo que son métodos adecuados para estudiar ambos equilibrios. La relación de intensidades de las bandas de fluorescencia, R , es el parámetro más apropiado para estudiar la termodinámica de complejación del **2MN**.

3.2.2. Decaimiento de la intensidad de fluorescencia.

El tiempo de vida medio, τ (tiempo que un fluoróforo permanece en el estado excitado antes de caer al estado fundamental y emitir fluorescencia), varía en función del medio que rodea al cromóforo por lo que, al igual que R, se empleará para el estudio del proceso de complejación del **2MN**. A partir de las gráficas de decaimiento de intensidad de fluorescencia frente al tiempo se puede determinar τ y también es posible identificar los diferentes componentes existentes en una muestra (huésped libre, complejo, etc.)

El perfil de decaimiento de la intensidad de fluorescencia se registró, para disoluciones acuosas de **2MN**/CDs xililenadas (**137-139**) y **2MN**/CDs metiladas (**140-142**), seleccionando diferentes longitudes de onda:

- (a) λ de excitación y emisión del **2MN** (292 nm/ 385 nm);
- (b) λ de excitación y emisión del grupo xilileno (260 nm/ 288 nm);
- (c) λ de excitación del grupo xilileno y emisión del **2MN** (260 nm/ 385 nm).

En todos los casos, en primer lugar se registraron los perfiles de decaimiento de intensidad de fluorescencia con el tiempo y se ajustaron a un sumatorio de funciones exponenciales. Cada una de las funciones fue atribuida a un fluoróforo, lo que permitió determinar los distintos componentes de cada sistema. A continuación, a partir de dicho ajuste, se calculó el tiempo de vida media para cada componente (τ_i) así como el promedio del tiempo de vida ponderado de la muestra $\langle\tau\rangle$ para analizar cómo varía de manera global durante la complejación (los cálculos se detallan en el anexo 2, apartado 2). Aunque haya más de un componente en el sistema estudiado (el **2MN** libre, el **2MN** complejo, etc.) sólo se detectan como componentes diferentes si sus tiempos de vida medio son diferentes.

(a) Excitación y emisión del huésped 2MN. Para las longitudes de onda de excitación y de emisión a 292 nm y 385 nm, respectivamente, se espera la existencia en disolución de dos componentes: el **2MN** libre y el **2MN** complejo. Sin embargo, sólo los perfiles

de decaimiento de las disoluciones acuosas de **2MN** con los derivados de la α CD (**2MN/137** y **2MN/140**) se ajustaron a la suma de dos funciones exponenciales, es decir, exhibieron dos componentes con dos tiempos de vida media diferentes: un componente en el rango de los 10-12 ns, debido al **2MN** libre, pues presenta tiempos similares al cromóforo libre, y otro componente en el rango de los 18 ± 3 ns, que se atribuye al **2MN** complejoado ya que la contribución de este último componente aumenta a medida que aumenta la concentración de CD, es decir, a medida que aumenta la fracción de **2MN** complejoado.

El resto de sistemas exhibieron decaimientos que, prácticamente, son descritos por una sola función exponencial (un solo componente) y son muy similares al decaimiento del **2MN** sin complejar. Esto se debe, probablemente, a que en esos sistemas el tiempo de vida media no es lo suficientemente sensible a los cambios en la microviscosidad o en la polaridad que tienen lugar durante la complejación. La diferencia observada con los derivados de α CD se debe a que, en estos casos el cambio, en la polaridad del entorno del **2MN** durante la complejación más acusado que en el resto de sistemas (como ya se vio en el apartado anterior), lo suficiente como para implicar cambios en el tiempo de vida medio.

A partir de los perfiles de decaimiento de intensidad de fluorescencia y de los tiempos de vida de los componentes individuales, se calculó el promedio del tiempo de vida ponderado de cada sistema $\langle\tau\rangle$. La variación del cociente $\langle\tau\rangle/\langle\tau_0\rangle$ (siendo $\langle\tau_0\rangle$ el tiempo de vida medio para el **2MN** libre) con la concentración de CD, muestra diferentes tendencias (Figura 3.7): $\langle\tau\rangle/\langle\tau_0\rangle$ aumenta con [CD] para los derivados de α CD (**137** y **140**), al igual que ocurre con la α CD nativa,²⁶ disminuye con [CD] para el derivado permetilado de γ CD (**142**), y apenas varía para el resto de derivados (β CDs **138**, **141** y γ CD xililenada **139**), como ocurre con la β CD nativa y con las β - y γ -HPCDs.²⁹ Estas diferencias se justificarán en el apartado 3.2.4.

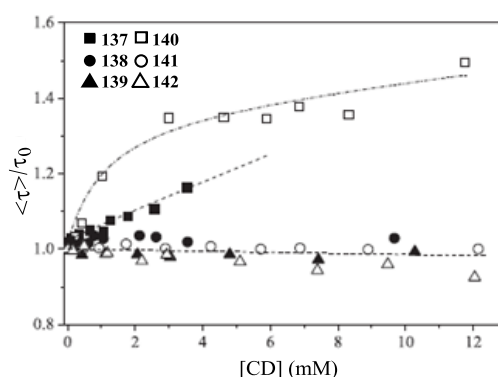


Figura 3.7. Variación $\langle\tau\rangle$ relativo al 2MN libre, $\langle\tau_0\rangle$, frente a [CD], para disoluciones acuosas de 2MN/CDs xililenadas (**137-139**) y 2MN/CDs permetiladas (**140-142**) (25 °C, λ de excitación de 292 nm, y emisión 385 nm, del 2MN).

Excitación y emisión del grupo xilileno. Cuando se seleccionan las longitudes de onda de emisión y excitación del grupo xilileno (260 nm / 288 nm), los perfiles de decaimiento de fluorescencia para las disoluciones acuosas de 2MN/**137-139** son el resultado de la suma de tres componentes de tiempos de vida diferentes (es decir, se pueden ajustar a la suma de tres funciones exponenciales):

- Un componente de tiempo de vida corto (en el rango de 0.1 ns), debido a la dispersión de la luz de la muestra y/o el disolvente.
- Un componente de vida intermedio (en el rango de 3-6 ns) atribuido al monómero de CD xililenada, pues su contribución aumenta con la temperatura (como cabe esperar para un proceso exotérmico en el que el aumento de temperatura desplaza el equilibrio hacia el monómero) y disminuye con la concentración de CD (ya que al aumentar la concentración aumenta la fracción de dímero y baja la concentración de monómero).
- Una componente de tiempo de vida lento (11-20 ns, 6-17 ns y 6-12 ns para **137**, **138** y **139**, respectivamente) atribuido a la especie dimérica de CD xililenada, pues se trata de un componente cuya contribución aumenta con la concentración de CD y disminuye con la temperatura.

Estos componentes son muy similares a los obtenidos para las disoluciones acuosas de los tres derivados en ausencia de **2MN**,^{21, 22} lo que indica que el proceso de dimerización coexiste con el de complejación.

A partir de los perfiles de decaimiento resultantes de la excitación del xilileno, se calcularon los tiempos de vida ponderados promedio $\langle\tau\rangle$, para los que no se tuvo en cuenta la componente debida a la luz dispersada, de modo que las variaciones observadas en $\langle\tau\rangle$ se deberán únicamente a las diferentes proporciones existentes de dímero y monómero. En la Figura 3.8. se representa $\langle\tau\rangle$ de disoluciones acuosas del derivado xililenado de la β CD, **138**, en presencia y en ausencia de **2MN**, frente a **[138]**, a distintas temperaturas.

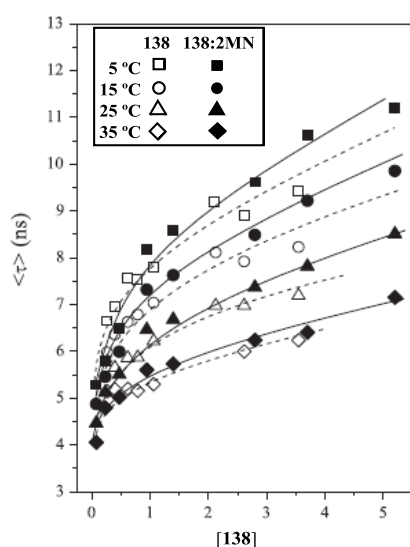


Figura 3.8. Variación $\langle\tau\rangle$ frente a **[138]** para disoluciones acuosas de **138** (símbolos huecos) y **2MN/138** (símbolos rellenos) a diferentes temperaturas (λ excitación, 260 nm y λ emisión, 288 nm, del grupo xilileno). Los datos de **138** en ausencia de **2MN** se tomaron de la referencia 21.

La tendencia de $\langle\tau\rangle$ con la concentración de CD es similar en presencia o en ausencia de **2MN**: $\langle\tau\rangle$ aumenta con la concentración de CD xililenada (**138** en este caso) ya que la fracción de dímero formado aumenta con la concentración, y el dímero presenta

mayor tiempo de vida que el monómero. Sin embargo, el valor de $\langle\tau\rangle$ es levemente menor para los sistemas con **2MN** (Figura 3.8, símbolos rellenos) que para las disoluciones de CDs xililenadas sin huésped (símbolos huecos), especialmente a las concentraciones más elevadas de CD. Esto implica que, con una concentración idéntica de CD, existe menor proporción del dímero en el medio cuando está presente el **2MN**, lo que supone que parte de la CD debe de estar complejada con el **2MN** y no en forma de dímero. El hecho de que la disminución de $\langle\tau\rangle$ con la complejación de **2MN** sea muy pequeña se debe a que la concentración inicial de **138** está siempre en exceso con respecto a la concentración del **2MN**, de modo que la cantidad de **2MN** que compite con el proceso de dimerización es muy baja. En cualquier caso, este resultado sugiere que es posible modular el equilibrio monómero-dímero en CDs xililenadas mediante la formación de complejos de inclusión con huéspedes de tamaño apropiado.

Excitación del grupo xilileno y emisión del 2MN. Cuando se seleccionaron las longitudes de onda de excitación del xilileno (260 nm) y de emisión del **2MN** (385 nm) para disoluciones acuosas de **2MN** con CDs xililenadas (**137-139**), no se observaron variaciones de $\langle\tau\rangle$ con la concentración de CD, lo que corrobora que no existe transferencia energética intermolecular del xilileno al **2MN**, incluso a elevadas concentraciones de CD, donde la fracción complejada de **2MN** es relativamente elevada.

Los estudios de decaimiento de intensidad de fluorescencia han demostrado la competencia que tiene lugar entre los equilibrios de dimerización y de complejación del **2MN** y han permitido determinar las especies implicadas en los ambos equilibrios (**2MN** libre, complejo **2MN:CD**, CD libre y dímero de CD). Las variaciones de τ durante la complejación (Figura 3.7) se estudiarán en el apartado 3.2.4.

3.2.3. Anisotropía de fluorescencia.

Un fluoróforo complejado en la cavidad de la CD presenta menor difusión rotacional que cuando está libre ya que su movimiento está más limitado, lo que implica que su velocidad de cambio de orientación es menor (menor difusión rotacional) y por tanto son más evidentes las diferencias entre las intensidades de fluorescencia emitidas en las distintas direcciones, con lo que la anisotropía de fluorescencia es mayor. Cuando se excita el **2MN** y se registran los valores de anisotropía de fluorescencia (r) a cualquiera de los máximos de emisión (360 ó 385 nm) para las disoluciones acuosas de CDs xililenadas **137-139** (Figura 3.9), se observa un aumento de anisotropía con la concentración de CD, lo que indica una disminución en la difusión rotacional del **2MN** como consecuencia del proceso de complejación.

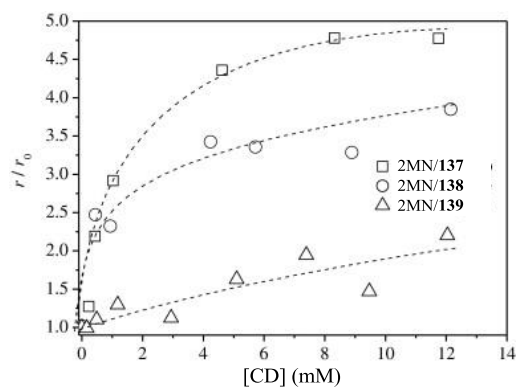


Figura 3.9. Anisotropías de fluorescencia para disoluciones acuosas de **2MN/137-139** a diferentes concentraciones de **137-139**, medidas como cocientes r/r_0 a 25 °C (r_0 es anisotropía de **2MN** en ausencia de CD).

También se observó que, al aumentar la temperatura, la anisotropía disminuye como consecuencia de la disociación del complejo y del aumento del movimiento rotacional del **2MN** libre y complejado debido a la disminución de la viscosidad del disolvente. Este comportamiento también se observó para las CDs nativas y las HPCDs.²⁷

No se observaron diferencias en la variación de la anisotropía durante la complejación del **2MN** entre ciclodextrinas metiladas y xililenadas. Para las concentraciones de CD más elevadas, la tendencia en los valores de anisotropía fue: $r(137 \text{ ó } 140) > r(138 \text{ ó } 141) > r(139 \text{ ó } 142)$. Puesto que r disminuye con el tamaño de la cavidad, podemos inferir que la diferente movilidad del **2MN** en el interior de la cavidad es responsable de este comportamiento: a menor tamaño de la cavidad, menor movimiento del huésped en el complejo y mayor anisotropía.

En conclusión, las medidas de anisotropía confirman que existe un proceso de inclusión del **2MN** en la cavidad de la CD, que es, en principio, exotérmico, y ponen de manifiesto las diferencias de movilidad del huésped cuando está complejado por los diferentes tipos de macrociclos como consecuencia de los distintos tamaños de la cavidad de la molécula anfitrión.

3.2.4. Propiedades de la cavidad de las CDs.

La inclusión del **2MN** en la cavidad de la CD implica una disminución de la polaridad (ϵ) y un aumento de la microviscosidad (η) del entorno del huésped. La dependencia de R y τ con la polaridad y la microviscosidad del medio puede determinarse haciendo medidas de fluorescencia de disoluciones diluidas de **2MN** en diferentes disolventes de ϵ y η conocidos. Así, el estudio de la variación de R y τ de disoluciones de **2MN** al pasar de disolventes polares (y/o baja viscosidad) a disolventes menos polares (y/o alta viscosidad) simula el cambio que experimentan R y τ durante el proceso de complejación y permite un análisis más profundo de los resultados de medidas de relación de intensidades de fluorescencia (R , apartado 3.3.1) y de tiempo de vida media (τ , apartado 3.3.2) durante la complejación. El modelo propuesto servirá para predecir la tendencia de los valores de R y τ durante la complejación y explicar los datos experimentales observados.

En primer lugar se registraron los espectros de emisión de fluorescencia para las disoluciones de **2MN** en diferentes disolventes de polaridad conocida (Figura 3.10, A). Se observaron las dos bandas electrónicas típicas de este cromóforo cuya relación de intensidades R ($I_{385 \text{ nm}}/ I_{360 \text{ nm}}$) depende fuertemente de la polaridad del disolvente (R disminuye cuando disminuye la polaridad, al igual que ocurre durante la complejación). La disminución de polaridad del disolvente va acompañada de desplazamientos a menores longitudes de onda de los máximos de ambas bandas y de la aparición de una nueva banda a 340 nm para los disolventes más apolares (hexano y ciclohexano, de $\epsilon \sim 2$). Esta banda, que también aparece para las concentraciones más elevadas de disoluciones acuosas de **2MN/140** (Figura 3.5), indica que la cavidad de **140** es muy apolar.

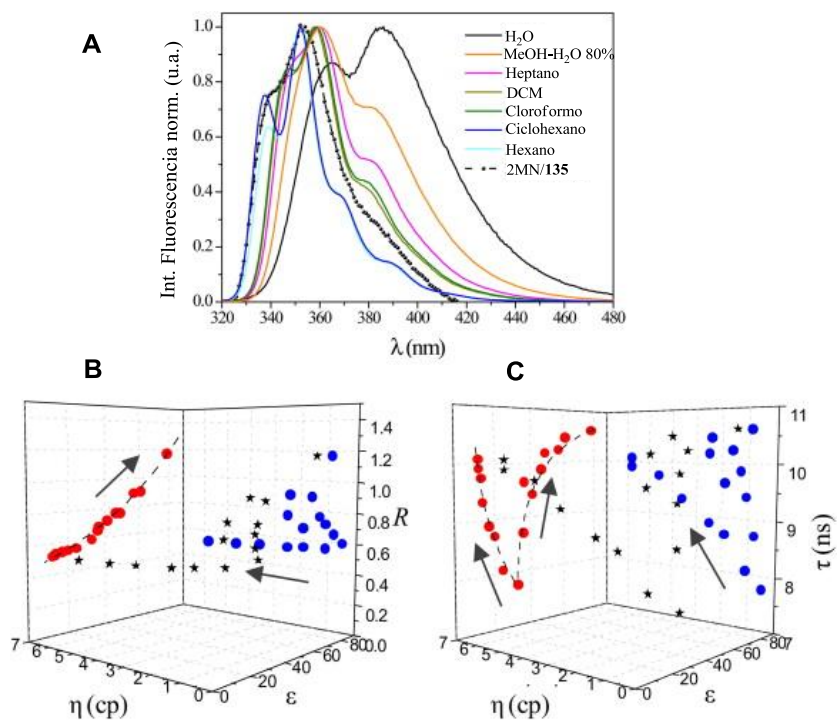


Figura 3.10. A. Espectros de fluorescencia (normalizados a la intensidad máxima) para disoluciones diluidas de **2MN** en disolventes de diferentes viscosidades y polaridades a 25 °C. B y C. Representación de la variación de R (B) y τ (C) del **2MN** con ϵ (rojo) y η (azul).

Para analizar la dependencia de R con la polaridad y la viscosidad, se ha representado, en la Figura 3.10 (B), el valor de R frente a ϵ (símbolos rojos), y frente a η (símbolos azules), para disoluciones de **2MN** en diferentes disolventes. Se observa que R aumenta con la polaridad del disolvente en que se encuentra inmerso el fluoróforo y que su valor se mantiene constante, en general, cuando se producen cambios en la viscosidad. Sólo se observó un pequeño aumento de R con η en las mezclas de metanol-agua y etanol-agua, lo que puede deberse únicamente a la dependencia de R de la polaridad del disolvente (R aumenta, en estos casos por el aumento de ϵ).

La dependencia de R con la polaridad, a 25 °C, se puede ajustar una ecuación polinomial que relaciona R con ϵ .

$$R = 0.409 + 5.39 \cdot 10^{-3} \epsilon + 5.06 \cdot 10^{-3} \epsilon^2$$

Para las disoluciones de **2MN** y los derivados de CDs, se determinaron los valores experimentales de R_{∞} , que es el valor de R cuando la concentración de CD es muy elevada ($[CD] \rightarrow \infty$) y la fracción de **2MN** complejoado, por tanto, es máxima. La interpolación de R_{∞} en la ecuación anterior permite calcular el valor de ϵ del entorno del **2MN** cuando la concentración de CD es máxima, es decir, cuando todo el **2MN** está complejoado, de modo que es un método para estimar la polaridad del entorno que rodea al huésped en el complejo, esto es, el valor de ϵ en la cavidad de la CD. Los valores de R_{∞} y de ϵ de la cavidad para los diferentes sistemas se recogen en la Tabla 3.1. Los resultados indican que las cavidades de las ciclodextrinas permetiladas (**140-142**) son más hidrofóbicas que sus homólogas nativas.³⁰ La instalación de un grupo xilileno de tipo tapadera en la cara secundaria de las CDs metiladas para formar las CDs xililenadas crea cavidades con un microentorno hidrofóbico con polaridad similar en los tres derivados con xilileno ($\epsilon \sim 27-29$). Las cavidades de las HPCDs de diferentes tamaños muestran polaridades más elevadas que las CDs xililenadas pero también muy similares entre ellas ($\epsilon \sim 44-56$).²⁷

Tabla 3.1. Constantes de asociación (K) y parámetros R_∞ y polaridad de la cavidad de la CD (ϵ) obtenidos por medidas de estado estacionario a 25 °C.

Compuesto	R_∞	K (M^{-1})	ϵ (CD)
140	0.31 ± 0.03	552 ± 93	<10
141	0.66 ± 0.01	101 ± 6	35
142	0.83 ± 0.03	95 ± 16	52
137	0.59 ± 0.07	1037 ± 379	27
138	0.61 ± 0.03	281 ± 34	29
139	0.59 ± 0.34	96 ± 87	27
116^a	0.50 ± 0.02	200 ± 20	10
127^a	0.80 ± 0.00	1970 ± 160	49
133^a	1.09 ± 0.02	210 ± 100	74
143^b	0.80 ± 0.00	790 ± 20	51
144^b	0.72 ± 0.00	2890 ± 130	44
145^b	0.85 ± 0.01	170 ± 10	56

^aLos valores de complejación del **2MN** con las CDs nativas se tomaron de las refs. 29, 24a y 26.

^bLos valores de complejación del **2MN** con las HPCDs se tomaron de las refs. 29 y 27.

Sin embargo, cuando el **2MN** es complejado por las α -, β - y γ CDs nativas, se encuentra en medios con polaridades muy diferentes, con valores de ϵ de 10, 49 y 74, respectivamente.²⁹

Por otro lado, los perfiles de decaimiento de fluorescencia para el **2MN** en disoluciones diluidas en todos los disolventes empleados fueron monoexponenciales, como corresponde a la presencia de un único componente. A partir del decaimiento de fluorescencia se calculó el tiempo de vida, τ , de **2MN** en los distintos disolventes, y se estudió su variación con la viscosidad (η) y la polaridad (ϵ) del medio.

Como se muestra en la Figura 3.10 (C, símbolos azules), τ de **2MN** aumenta con la viscosidad del disolvente, como cabía esperar.

Con respecto a la variación de tiempo de vida media con la polaridad del entorno (Figura 3.10, C, símbolos rojos), se observan dos tendencias diferentes:

- a) cuando el cromóforo se encuentra en un disolvente relativamente polar ($\epsilon > 32$) τ disminuye con la disminución de ϵ , predomina el efecto de la polaridad;
- b) cuando el disolvente es muy apolar y de elevada viscosidad, τ aumenta con la disminución de ϵ , probablemente porque el efecto de la viscosidad es predominante sobre el efecto de la polaridad.

Una vez que se ha establecido la dependencia de R y τ con la polaridad y la viscosidad del medio que rodea al **2MN**, se pueden predecir y explicar los cambios observados durante la inclusión del huésped en la cavidad de la CD, sabiendo que la complejación implica una disminución de polaridad y un aumento de viscosidad en el entorno del **2MN**. De acuerdo con esto, el valor de R debería disminuir durante la complejación (pues su valor disminuye con ϵ y no se ve afectado por η), tal y como se observa experimentalmente (Figura 3.6).

La variación del tiempo de vida medio con la complejación resulta del balance entre los efectos de la polaridad y la viscosidad:

- a) Cuando predomina la viscosidad sobre la polaridad, el valor de $\langle\tau\rangle$ aumenta durante la complejación como consecuencia del incremento de η . Esto ocurre en el caso de los derivados de α CD (**137** y **140**, Figura 3.7) porque en estos casos, donde la cavidad es muy pequeña y muy apolar, la viscosidad es muy elevada.
- b) Cuando se compensan los efectos de la viscosidad y la polaridad, el valor de $\langle\tau\rangle$ permanece constante durante la complejación. Esto ocurre con los derivados de β CD (**138** y **141**) y con la γ CD xililenada **139** (Figura 3.7).
- c) Cuando predomina la polaridad sobre la viscosidad, el valor de $\langle\tau\rangle$ disminuye durante la complejación como consecuencia de la disminución de ϵ . Esto ocurre con el sistema **2MN/142** (γ CD xililenada) que presenta una elevada polaridad ($\epsilon = 52$) y un pequeño valor de η como consecuencia del mayor tamaño de la cavidad.

En resumen, los estudios de R y tiempo de vida media con disolventes de polaridad y viscosidad conocida han permitido justificar los cambios que experimentan dichas magnitudes con la complejación mostrados en las Figura 3.6 y 3.7 y determinar las diferencias existentes para la inclusión del huésped en los tres tipos de macrociclo. Además, se ha estimado la polaridad de la cavidad de los distintos derivados de CD.

3.2.5. Constantes de equilibrio y estequiometría.

La relación de R (relación de intensidades de las dos bandas de emisión de fluorescencia del **2MN**) con la concentración de CD se puede expresar mediante ecuaciones lineales o no lineales desarrolladas en el anexo 2 (apartado 4). En la Figura 3.6 se representó R frente a [CD], a 25°C (en el anexo 1, Figura A1, se recogen los datos a otras temperaturas). El ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones que relacionan R y [CD] permite determinar los valores de las correspondientes constantes de complejación, K (líneas de la Figura 3.6 se corresponden con dicho ajuste). En todos los casos se determinó una estequiometría 1:1. Los datos para los derivados xililenados y permetilados, obtenidos a 25 °C, se recogen en la Tabla 3.1 (apartado 3.2.4) junto con los datos de la complejación de **2MN** con CDs nativas y con HPCDs. Las constantes de complejación para los sistemas **2MN**/CDs xililenadas son mayores que para los sistemas **2MN**/CDs metiladas, y el efecto de estabilización del grupo xilileno parece ser obvio para **137** y **138**, cuyas constantes a 25 °C son el doble que para sus homólogos metilados. Sin embargo, la influencia del fragmento de xilileno en la estabilización del complejo apenas es significativa para el derivado de γ CD **139**.

La mayor constante de asociación de los complejos con **2MN** de las β - y γ CDs nativas en comparación con sus homólogas permetiladas (**141** y **142**) y xililenadas (**138** y **139**) se debe, probablemente, a la estabilización resultante de las interacciones por enlaces de hidrógeno, que no tienen lugar cuando los grupos hidroxilo están alquilados.

Las mayores constantes de asociación para los complejos de **2MN** con las α CDs xililenada (**137**) y permetilada (**140**) respecto a la α CD nativa deben explicarse por la mayor flexibilidad y el tamaño de las α CDs alquiladas en relación a su homóloga α CD nativa^{30b,c} y, por tanto, por una posible mayor penetración de **2MN** en la cavidad. La baja polaridad de la cavidad estimada para **140** es compatible con esta afirmación.

En este apartado se demuestra que los complejos CD:**2MN** presentan una estequiometría 1:1 y que la incorporación del fragmento de xilileno ayuda a estabilizar el complejo, probablemente debido a interacciones hidrofóbicas favorables, hecho que se estudiará con mayor profundidad mediante simulaciones por mecánica y dinámica molecular.

3.2.6. Parámetros termodinámicos: variaciones de entalpía y entropía.

Mediante la ecuación de van't Hoff, empleando los valores de K obtenidos a diferentes temperaturas (Tabla A1, anexo 1), se pueden calcular los parámetros termodinámicos ΔH° y ΔS° del proceso de complejación (Tabla 3.2):

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2} \rightarrow R \ln K = \frac{\Delta H^\circ}{T} \quad (\text{Ecuación de van't Hoff})$$

La representación de $R \ln K$ frente a $1/T$ (Figura 3.11) da una línea recta cuya pendiente es ΔH° . Todos los sistemas **2MN**/CDs permetiladas y **2MN**/CDs xililenadas presentan $\Delta H^\circ < 0$, lo que es típico de fuerzas atractivas de tipo van der Waals (y/o de puentes de hidrógeno, que no es el caso). La contribución de las interacciones de van der Waals a la energía de unión depende fuertemente de la distancia huésped-anfitrión, y normalmente es menos favorable a medida que aumenta el tamaño de la cavidad de la CD en relación al huésped. Esta es la razón por la que las entalpías de los complejos de **2MN** con las α CDs son más favorables que para las β CDs y las γ CDs. Esto también puede explicar el hecho de que el ΔH° es menos exotérmico al pasar de las CDs nativas a las

HPCDs y/o a las CDs metiladas: la cavidad es más flexible y más ancha debido a las repulsiones de los sustituyentes de los grupos hidroxilo.

La incorporación del fragmento de xilileno a las CDs conduce a unos valores de entalpía más favorables respecto a sus homólogos metilados, lo cual presumiblemente se debe a la interacción atractiva adicional entre el huésped y el grupo xilileno. Este aspecto se volverá a estudiar en el apartado de mecánica y dinámica molecular.

Tabla 3.2. Valores de ΔH° y de ΔS° durante los procesos de complejación para el **2MN** con **140-142** y **137-139**.

Complejo	ΔH° (kJ·mol ⁻¹)	ΔS° (J·K ⁻¹ mol ⁻¹)
2MN/ 140	-13.9 ± 1.4	+5.1 ± 4.6
2MN/ 141	-11.2 ± 2.1	+0.2 ± 7.1
2MN/ 142	-10.5 ± 3.2	+1.8 ± 10.9
2MN/ 137	-25.1 ± 2.9	-26.5 ± 9.7
2MN/ 138	-11.3 ± 3.3	+8.6 ± 11.1
2MN/ 139	-9.4 ± 1.2	+6.5 ± 4.0
2MN/ 116	-30.9 ± 0.8	-59.8 ± 2.0
2MN/ 127	-15.0 ± 1.7	+11.7 ± 5.0
2MN/ 133	-9.6 ± 2.5	+11.3 ± 8.4
2MN/ 143	-24.7 ± 1.3	-28.3 ± 4.5
2MN/ 144	-7.6 ± 2.1	+39.8 ± 7.1
2MN/ 145	+6.3 ± 3.3	+63.3 ± 11.3

^aLos valores de complejación del **2MN** con las CDs nativas se tomaron de las refs. 29, 24a y 26.

^bLos valores de complejación del **2MN** con las HPCDs se tomaron de las refs. 29 y 27.

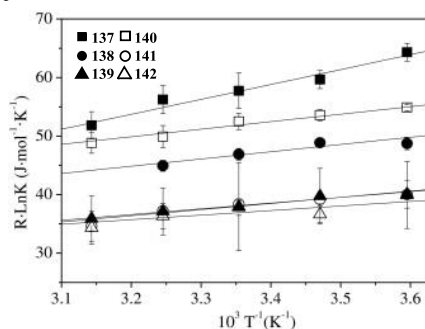


Figura 3.11. Representaciones de van't Hoff para la formación de complejos 1:1 del **2MN** con CDs xililenadas (**140-142**) y permetiladas (**137-139**).

El signo de ΔS° asociado al proceso de complejación de ciclodextrinas con un huésped relativamente hidrofóbico, como es el **2MN**, es el resultado de un balance entre la pérdida de entropía debida a la disminución de los grados de rotación traslacionales y vibracionales del sistema (el **2MN** presenta menos movilidad cuando se encuentra en el interior de la cavidad de la CD) y la ganancia de entropía debida a la pérdida de orden en las capas de moléculas de agua que se encontraban alrededor del huésped o solvatando el interior de la cavidad. Así, se observa lo siguiente:

a) Valores de $\Delta S^\circ < 0$ son típicos de huéspedes voluminosos que sólo penetran parcialmente en una cavidad relativamente pequeña, de modo que su movimiento está moderadamente impedido. En estos casos, el proceso de complejación debería venir acompañado por un aumento relativamente alto en la anisotropía de fluorescencia y por fuertes interacciones huésped-anfitrión (que implican $\Delta H^\circ < 0$), tal y como ocurre con la α CD nativa **116** ($\Delta S^\circ = -59.8 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$).²⁶

b) Si el huésped penetra profundamente en el interior de la cavidad, la complejación presenta valores de $\Delta S^\circ > 0$. Esto se observa en la complejación de **2MN** con las β -, γ CD nativas, **127** ($+11.7 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$) y **133** ($+11.3 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$), y con las β - y γ -HPCDs **144** ($+39.8 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$) y **145** ($+63.3 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$).

c) Para las CDs permetiladas (**140-142**), se obtienen valores de $\Delta S^\circ > 0$ pero muy pequeños en comparación con sus homólogos las CDs nativas, lo que podría ser atribuido al hecho de que el movimiento del huésped en el interior de la cavidad de las CDs metiladas estaría más impedido que en las CDs nativas como consecuencia de la presencia de los grupos metilo. Adicionalmente, se puede asumir que, al ser la cavidad de las CDs metiladas más hidrofóbicas que las cavidades de las CDs nativas, las CDs metiladas liberan un menor número de moléculas de agua que las CDs nativas cuando se produce la complejación, efecto hidrofóbico que contribuiría en la misma dirección (menor ganancia de entropía).^{31,32}

d) A las β - y γ CDs xililenadas **138** y **139** les ocurre algo parecido que a las CDs metiladas: el efecto hidrofóbico va acompañado de valores de ΔS° relativamente pequeños. El fragmento de xilileno podría contribuir también a un mejor ajuste del huésped a la cavidad (y menor movilidad por tanto), y además a reforzar el efecto hidrofóbico, con la consiguiente menor ganancia de entropía. En el caso de la α CD xililenada (**137**) estos efectos son más acusados, lo que explica el valor de $\Delta S^\circ < 0$ relativamente elevado que se obtiene experimentalmente.

En conclusión, se han determinado los parámetros termodinámicos del proceso de complejación del **2MN** por las distintas CDs, confirmándose que se trata de un equilibrio exotérmico, lo que está de acuerdo con resultados mostrados anteriormente. Los valores de ΔH° , más favorables para las CDs xililenadas, han corroborado el efecto estabilizador del grupo xilileno. Las diferencias obtenidas para los valores de ΔS° en los distintos sistemas se han explicado en base a las características estructurales de los compuestos.

3.2.7. Mecánica molecular.

La mecánica molecular es un procedimiento teórico que emplea las leyes de la física clásica para predecir la geometría y la energía de las moléculas. Permite obtener la energía total del sistema objeto de estudio para la geometría optimizada del mismo. De todos los términos que contribuyen a la energía total, nos centraremos en la energía de van der Waals (E_{vdw}) y en la energía electrostática (E_{ele}) pues son los términos que se ven afectados de manera más significativa durante el proceso de complejación. La suma de ambos se conoce como energía de interacción ($E_{int} = E_{ele} + E_{vdw}$). El procedimiento consiste en la aproximación del huésped a la CD, que se sitúa en el origen del sistema de coordenadas, y el cálculo de los parámetros geométricos (como la distancia huésped-anfitrión) y de los valores de energía correspondiente para cada geometría obtenida. La representación de la E_{int} frente a la distancia huésped-anfitrión permite determinar la posición del huésped en la cavidad de la CD, que será aquella geometría que se

corresponda con un mínimo en el perfil de energía de interacción. El huésped se puede aproximar a la CD con orientación polar (P) o no polar (NP), como se representa en la Figura 3.12.

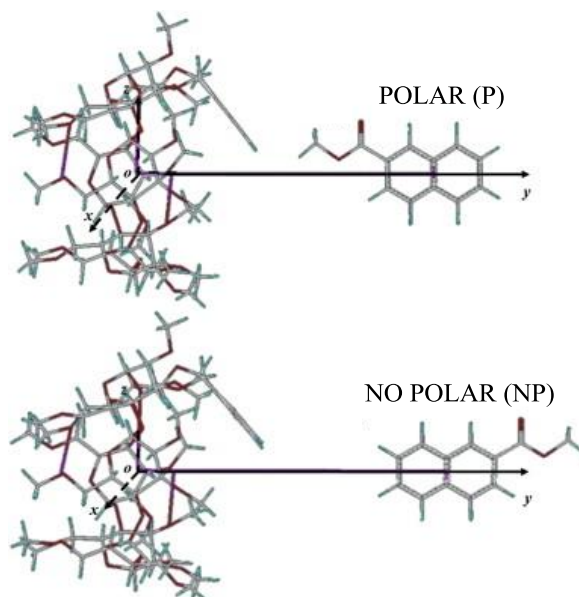


Figura 3.12. Modos de aproximación del huésped a la CD **138**: polar (P) y no polar (NP).

En la Figura 3.13. se representa el perfil de energía de interacción frente a la distancia entre **2MN** y las correspondientes CDs metiladas y xililenadas cuando la aproximación del huésped se produce por el sitio polar (P) o no polar (NP). El valor de distancia cero se toma en el centro de masas de la CD y las líneas punteadas indican los límites de la cavidad de la CD: el extremo de la cara primaria (línea de la izquierda, valores negativos) y de la cara secundaria (línea de la derecha, valores positivos). En todos los casos se obtienen los valores mínimos de energía de interacción en el interior de la cavidad (entre las dos líneas punteadas) y el valor de energía de interacción aumenta con la distancia al centro de masas de la CD, siendo mínimo en el interior de la cavidad. Esto significa que la penetración de huésped en la cavidad es total, incluso para las CDs

con cavidades de menor tamaño, la α CDs permetilada (**140**) y xililenada (**137**), lo que difiere de lo observado para la complejación con la α CD nativa **116**.²⁶

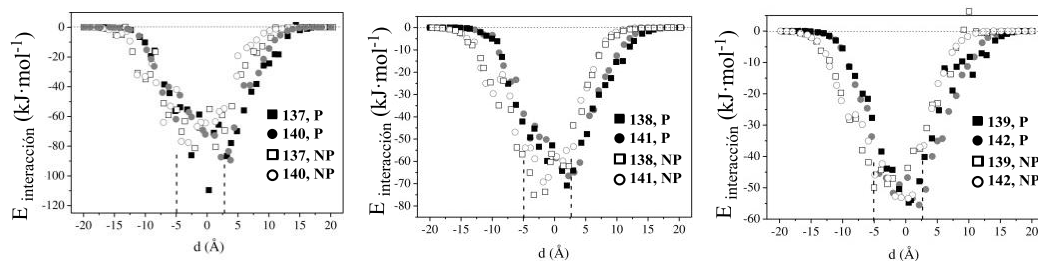


Figura 3.13. Energías de interacción en función de la distancia (Å) para aproximaciones del 2MN por el lado polar (P, símbolos sólidos) y no polar (NP, símbolos huecos) para los derivados xililenados (**137-139**) y permetilados (**140-142**). Las líneas punteadas representan los límites de las caras primaria (línea izquierda) y secundaria (línea derecha) de las CDs.

En cada sistema se determinó la estructura del complejo de inclusión que presenta la energía de interacción mínima (correspondiente al mínimo de las gráficas en la Figura 3.13) y en la Tabla 3.3. se recogen los datos de distancias y energías correspondientes para dichas estructuras. Todos los valores se corresponden con energías favorables y geometrías en las que el 2MN se encuentra práctica o totalmente en el interior de la cavidad. Se observa que no hay grandes diferencias de energías de interacción entre las aproximaciones polar y no polar. En los casos de α CDs y γ CDs con y sin xilileno, se obtiene una energía ligeramente inferior para los casos de aproximación por el lado polar, mientras que para las β CDs xililenada y permetilada (**141** y **138**) la inclusión se da preferentemente en la orientación apolar.

En todos los casos se observa que la energía de interacción disminuye con el tamaño del macrociclo, del mismo modo que lo hacen las constantes de equilibrio y las variaciones de entalpía determinadas experimentalmente, como consecuencia de un peor ajuste del huésped a la cavidad de la CD a medida que aumenta el tamaño de la misma.

Tabla 3.3. Coordenada y del centro de masas del **2MN** (d), distancia naftaleno-xilileno (d') y energías de interacción para las estructuras de mínima energía de de los complejos 1:1 de **2MN:140-142** y **2MN:137-139** (aproximaciones P y NP), obtenidas por MM.

Parámetro	137 (P)	138 (P)	139 (P)	140 (P)	141 (P)	142 (P)
	137 (NP)	138(NP)	139 (NP)	140 (NP)	141(NP)	142 (NP)
d (y , Å)	+0.2	+1.9	+0.5	+3.8	+2.2	+2.1
	-2.0	-3.4	-1.0	-3.0	-1.8	+0.4
d' (Å)	5.9	7.0	7.2	—	—	—
	8.1	10.8	8.1	—	—	—
$E_{\text{interacción}}$ (kJ mol ⁻¹)	-109.6	-70.9	-54.8	-89.5	-66.5	-55.5
	-81.4	-75.1	-51.9	-77.6	-69.3	-53.4
$E_{\text{Electrostática}}$ (kJ mol ⁻¹)	-16.9	2.8	2.8	-7.8	5.2	-1.4
	-14.8	-2.5	1.8	-12.3	-6.3	-1.3
$E_{\text{van der Waals}}$ (kJ mol ⁻¹)	-92.7	-73.7	-57.6	-81.7	-71.7	-54.1
	-66.6	-72.6	-53.7	-65.3	-63.0	-52.1
$E_{\text{interacción Xy/2MN}}$ (kJ mol ⁻¹)	-8.0	-4.3	-10.5	—	—	—
	-1.0	-0.4	+8.6	—	—	—

En la Tabla 3.3. también se muestra la contribución de la energía electrostática y la energía de van der Waals a la energía de interacción huésped-anfitrión. Se observa que la mayor parte de la energía de interacción se debe a las interacciones de tipo van der Waals en todos los sistemas, la energía electrostática apenas varía durante la complejación, y su contribución es más significativa en los derivados de α CD (**140** y **137**). El impacto de la energía electrostática en la energía de interacción disminuye al aumentar el tamaño de la CD.

La incorporación del fragmento de xilileno se traduce en una penetración aún mayor del **2MN** (distancia d más cerca del centro de masas de las CDs xililenadas que para las CDs permetiladas) y en una mayor estabilización del huésped en la cavidad (energías de interacción más favorables). Los valores de $E_{\text{interacción}}$ de las α - y β CD xililenadas (**137** y **138**) son ligeramente más favorables que para sus homólogos metilados (**140** y **141**), mientras que los derivados xililenado y metilados de la γ CD (**139** y **142**) presentan valores muy similares, como ocurría también con los valores de constante K y de variación de entalpía. En las CDs xililenadas también existe preferencia

de penetración del **2MN** por el lado polar, con excepción de la β CD xililenada (**138**). El resto de características relativas a las interacciones de van der Waals y electrostáticas para las CDs xililenadas son similares a las de sus homólogos permetilados.

Cabe destacar que las interacciones atractivas entre el grupo xilileno y el huésped también contribuyen de manera significativa a la estabilización del complejo. Dichas interacciones representan el 7-20% de la energía de interacción cuando **2MN** se aproxima a la cavidad por el lado polar mientras que dicha interacción casi desaparece o es incluso repulsiva cuando la aproximación se da en orientación no polar.

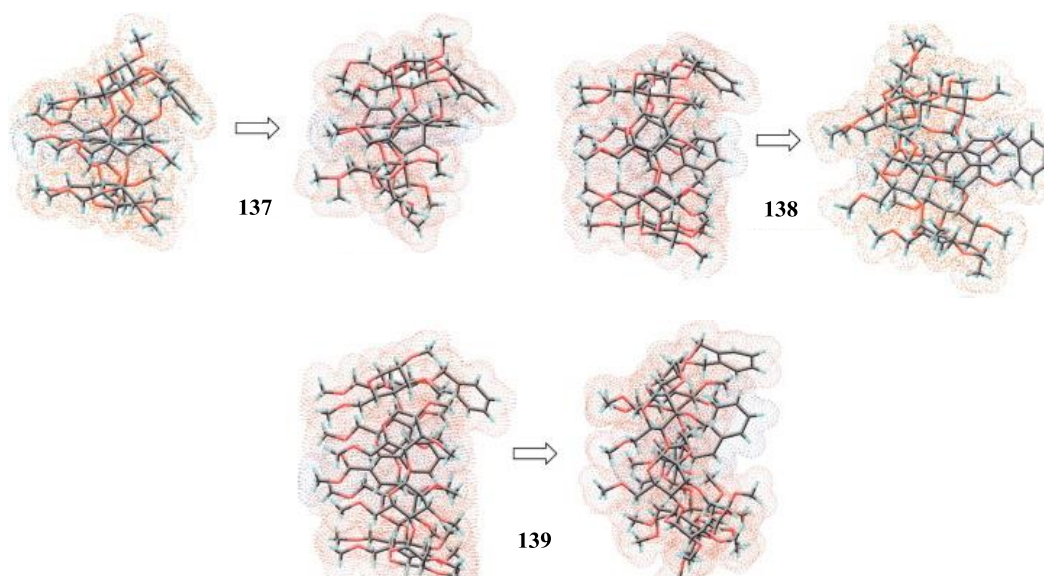


Figura 3.14. Estructuras de mínima energía de interacción para los complejos 1:1 **2MN/ 137-139** obtenidos por cálculos de MM (izquierda de la flecha) y de DM (derecha de la flecha), con orientación polar del **2MN**.

Las distancias entre el centro de masas del anillo de naftaleno de **2MN** y el anillo de benceno del grupo xilileno son, en Å: 5.9 (8.1), 7.0 (10.8) y 7.2 (8.1) para los sistemas con **137**, **138** y **139** con aproximaciones por la cara polar (no polar) del huésped, respectivamente. La localización del **2MN** en el interior de la cavidad y las posibles interacciones huésped-xilileno están de acuerdo con los valores y signos de los

parámetros termodinámicos obtenidos experimentalmente, ΔH° y ΔS° . Además, las distancias obtenidas por modelización molecular también estarían de acuerdo con la ausencia de evidencias experimentales de la transferencia energética xilileno-**2MN** en el complejo. Como ejemplo, en la Figura 3.14. (a la izquierda de la flecha) se muestran las estructuras de mínima energía de interacción (geometrías optimizadas) para los complejos 1:1 del **2MN** con CDs xililenadas por aproximación polar.

La complejación causa una leve disminución en la energía potencial total de los sistemas estudiados. Las interacciones no enlazantes de tipo van der Waals que se dan durante la complejación son las principales responsables de esa disminución, a pesar de que dichas interacciones no constituyen la mayor contribución a la energía total. Las interacciones electrostáticas apenas varían durante la complejación. La energía de tensión de enlace es la que más peso tiene en la energía total, pero sólo disminuye ligeramente durante la aproximación del huésped a la CD (Tabla A.2, anexo 1).

Los resultados obtenidos a partir de los cálculos por mecánica molecular están de acuerdo con los valores termodinámicos presentados anteriormente, a la vez que dan una explicación para los hechos observados. Se ha confirmado la afinidad del **2MN** por la cavidad de la CD, ya que las geometrías de mínima energía se dan cuando el huésped se encuentra complejoado, y se ha evidenciado que el efecto estabilizador de los derivados xililenados se basa en interacciones favorables entre el huésped y el fragmento de xilileno.

3.2.8. Dinámica molecular.

La dinámica molecular (DM) se basa en una simulación computacional del movimiento de los átomos de una molécula a lo largo del tiempo, recogiendo la posición y la velocidad instantánea del sistema a los mismos intervalos de tiempo, para posteriormente analizar las distintas conformaciones obtenidas durante la trayectoria

estudiada y así se puede evaluar cómo varía una propiedad a lo largo del tiempo: una distancia determinada, la energía del sistema, etc.

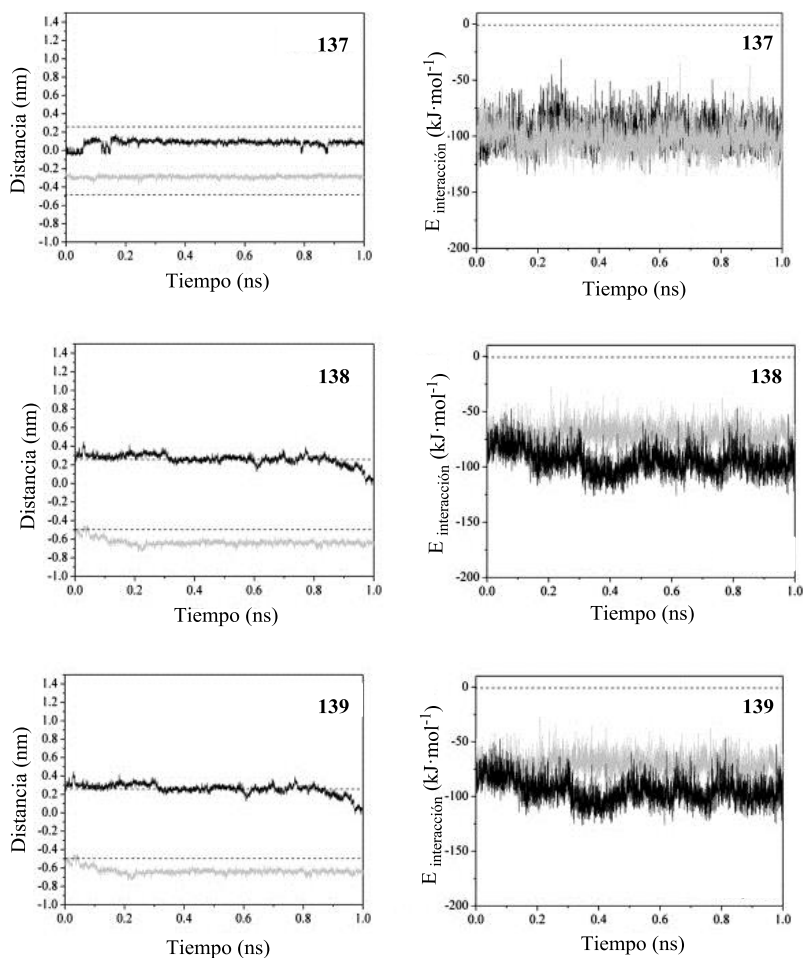


Figura 3.15. Izquierda: historias de la distancia 2MN-CD para 137-139. Derecha: energías de interacción durante la simulación por DM. Leyenda: señales negras (aproximación polar), señales gris (aproximación no polar), líneas punteadas (límites de las caras de las CDs).

En la Figura 3.15 (izquierda) se muestra la evolución de distancia del centro de masas del anillo de naftaleno (2MN) al centro de masas de las CD xililenadas (137-139) para trayectorias estudiadas por dinámica molecular (DM) durante 1 ns, donde el huésped

se aproxima por el lado polar (señal negra) y apolar (señal gris). El centro de masas de la CD se sitúa en la posición $y = 0 \text{ \AA}$ y las líneas punteadas indican la distancia del límite de la cara primaria de la CD (línea inferior, $y = -4.9 \text{ \AA}$) y de la cara secundaria de la CD (línea superior, $y = +2.5 \text{ \AA}$). Las gráficas para las CDs permetiladas (**140-142**) se recogen en el anexo 1 (Figura A2).

En todos los casos, a excepción de la última parte de la trayectoria de las γ CDs xililenada, **139** (y permetilada, **142**, Figura A2 en anexo 1) en la aproximación polar, el centro de masas del anillo de naftaleno de **2MN** permanece, durante toda la trayectoria, entre las dos líneas que limitan las entradas a la cavidad de la CD. Esto significa que **2MN** penetra total o casi totalmente en el interior de las α - y β CDs xililenadas y permetiladas y se mantiene en el interior durante toda la trayectoria, lo que confirma la estabilidad del complejo.

En la Figura 3.15 (derecha) también se muestra la variación de la energía de interacción durante la trayectoria. La energía de interacción es favorable y constante a lo largo de la trayectoria en todos los casos, lo que está de acuerdo con la formación y la estabilidad de los complejos. La excepción se da para la aproximación polar de los derivados de γ CD (**139** y **142**), donde se observa que se produce una disminución de la energía de interacción, probablemente como consecuencia de las bajas constantes de asociación de los complejos.

A partir de los datos de las trayectorias, se calcularon los valores promedios de distancias y energías, en concreto: las distancias entre el huésped y la CD, entre el huésped y el xilileno, energías de interacción (electrostática y de van der Waals) y energías de interacción xilileno-huésped para las aproximaciones polar y no polar de los complejos 1:1 de **2MN** con CDs permetiladas y xililenadas (Tabla 3.4.). Los valores están de acuerdo con los cálculos de mecánica molecular y confirman la estabilidad del complejo durante la trayectoria.

Tabla 3.4. Coordenada y del centro de masas del **2MN** (d), distancia naftaleno-xilileno (d') y valores promedio de energías de interacción para las estructuras de mínima energía de de los complejos 1:1 de **2MN:140-142** y **2MN:137-139** (aproximaciones P y NP), obtenidas por DM.

Parámetro	137 (P)	138 (P)	139 (P)	140 (P)	141 (P)	142 (P)
	137 (NP)	138 (NP)	139 (NP)	140 (NP)	141(NP)	142 (NP)
d (y , Å)	0.85±0.27	2.6±0.6	4.3±2.6	2.9±0.2	1.0±0.4	10.2±4.6
	2.8±0.2	6.3±0.4	4.3±1.4	4.6±1.5	3.6±1.1	4.8±0.8
d' (Å)	3.9±4.5	5.8±0.4	0.2±7.2	—	—	—
	0.6±9.2	14.5±0.4	-10.3±4.5	—	—	—
E_{enlace} (kJ mol ⁻¹)	-96.1±13	-94.5±12.1	-52.7±23.4	-97.8±13.0	-75.2±13.0	-14.6±10.0
	-101.6±13	-71.1±8.8	-67.3±21.6	-87.3±13.0	-42.6±8.8	-36.4±7.9
$E_{\text{Electrostática}}$ (kJ· mol ⁻¹)	-20.5±5.4	-13.8±4.2	-4.2±10.0	-24.7±5.0	-12.1±7.1	-1.3±2.9
	-24.7±4.6	-9.6±3.8	-5.4±5.4	-20.9±5.4	-1.7±3.8	-1.7±2.9
E_{vdW} (kJ· mol ⁻¹)	-85.7±13.0	-81.1±12.1	-48.1±20.0	-76.9±12.5	-63.1±11.3	-13.4±12.5
	-76.9±12.5	-61.9±8.8	-62.3±9.6	-66.5±12.2	-41.0±8.8	-34.3±6.7
$E_{\text{Xil-2MN}}$ (kJ· mol ⁻¹)	-12.1±3.8	-5.9±4.2	-7.9±7.5	—	—	—
	-2.5±3.8	-0.4±0.4	0.4±0.8	—	—	—

Adicionalmente se ha llevado a cabo el estudio comparativo de los procesos competitivos de dimerización y de complejación de la sonda **2MN** para la α CD xililenada **134** (Esquema 3.6), en la que los hidroxilos no se encuentran metilados, en comparación con la α CD nativa (**116**) y la α CD xililenada y metilada (**116**), obteniéndose resultados similares a los expuestos en este capítulo que demostraron la mayor estabilidad de los dímeros y los complejos de inclusión para el derivado xililenado y metilado.³³ Esto indica que para la preparación de derivados policatiónicos xililenados resulta más conveniente metilar el resto de grupos hidroxilo libres de la CD (capítulo 4).

3.3. Conclusiones.

Se ha estudiado la termodinámica de complejación del 2-naftoato de metilo (**2MN**), una sonda fluorescente sensible a la polaridad del medio, con CDs xililenadas (**137-139**), y con sus homólogos permetilados **140-142**. Estudios de decaimiento de intensidad de fluorescencia han permitido identificar los componentes existentes en las

muestras y confirmar la presencia simultánea de los equilibrios de dimerización y complejación. Los resultados también revelan que las cavidades de las CDs permetiladas son más hidrofóbicas que sus homólogas, las CDs nativas, con polaridad creciente a medida que aumenta el tamaño de la CD, mientras que la instalación de un fragmento de xilileno en la cara inferior de la CD crea un microentorno de polaridad similar para las tres CDs xililenadas. Todos los sistemas forman complejos de estequiometría 1:1, siendo las constantes de asociación de los complejos **2MN**/CDs xililenadas mayores que las de **2MN**/CDs permetiladas, lo que demuestra que el grupo xilileno tiene un efecto de estabilización del complejo, aunque dicho efecto no es significativo en el caso de la γ CD xililenada (**139**) respecto a su homólogo permetilado (**142**). Todos los complejos de **2MN** con CDs permetiladas y xililenadas presentan valores de ΔH° negativos debidos a las interacciones atractivas de tipo van der Waals, que son menos favorables a medida que aumenta el tamaño de la cavidad de la CD. La incorporación de un fragmento de xilileno implica variaciones de entalpías más favorables en las CDs xililenadas que en las CDs permetiladas, lo que se debe a las interacciones adicionales que se dan entre el grupo xilileno y el **2MN**. Estas interacciones favorables disminuyen a medida que lo hace el tamaño del macrociclo, del mismo modo que ocurre con las constantes de asociación y de la variación de entalpía, como consecuencia de una menor interacción xilileno-**2MN**.

Las energías de interacción de α CD y β CD xililenadas (**137** y **138**) con la sonda **2MN**, determinadas mediante cálculos de MM, son levemente más favorables que para sus homólogos metilados (**140** y **141**). Como ocurre para las constantes de asociación y las variaciones de entalpía, los derivados xililenado y permetilado de la γ CD (**139** y **142**) muestran valores de energía de interacción similares. Las estructuras propuestas para los complejos mediante MM y DM y las posibles interacciones **2MN**-xilileno están de acuerdo con el signo y los valores cuantitativos de los parámetros termodinámicos obtenidos experimentalmente. En su conjunto, estos resultados demuestran que la incorporación del fragmento de xilileno en la cara secundaria de la CD promueve la dimerización sin evitar la formación de complejos de inclusión, dos características

favorables en vista al diseño de sistemas auto-ensamblados para la encapsulación y liberación controlada de fármacos y material génico.

Los resultados de este capítulo han sido publicados recientemente en la revista *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2961-2972.³⁴

Referencias

- ¹ a) A. R. Khan, P. Forgo, K. J. Stine, V. T. D'Souza, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977-1996; b) E. Engeldinger, D. Armspach, D. Matt, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4147-4173; c) J. Szejtli, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1753; d) Y. Liu, Y. Chen, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 681-691; e) H. Dodziuk, *Cyclodextrins and their Complexes*; Wiley-VCH: **2008**.
- ² a) F. Hapiot, S. Tilloy, E. Monflier, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 767-781; b) Z.-Y. Dong, X. Huang, S.-Z. Mao, K. Liang, J.-Q. Liu, G.-M. Luo, J.-C. Shen, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3575-3579; c) S. V. Bhosale, S. V. Bhosale, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2007**, *4*, 231-242.
- ³ a) L. G. Marinescu, M. Bols, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4590-4593; b) F. Ortega-Caballero, C. Rousseau, B. Christensen, T. E. Petersen, M. Bols, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3238-3239.
- ⁴ B. A. McNally, W. M. Leevy, B. D. Smith, *Supramol. Chem.* **2007**, *19*, 29-37.
- ⁵ H. Tian, Q.-C. Wang, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 361-374.
- ⁶ N. Smiljanic, V. Moreau, D. Yockot, J. M. Benito, J. M. García Fernández, F. Djedaini-Pilard, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5465-5468.
- ⁷ T. Loftsson, D. Duchene, *Int. J. Pharm.* **2007**, *329*, 1-11.
- ⁸ K. Chmurski, J. Defaye, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7365
- ⁹ H. Law, J. M. Benito, J. M. García Fernández, L. Jicsinszky, S. Crouzy, J. Defaye, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 7524-7532.
- ¹⁰ a) A. J. Pearce, P. Sinay, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3610-3612; b) W. Wang, A. J. Pearce, Y. Zhang, P. Sinay, *Tetrahedron Asymmetry*, **2001**, *12*, 517-523.

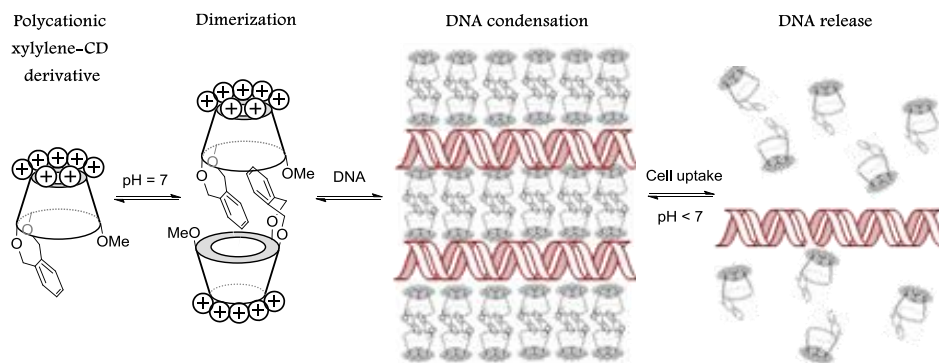
-
- ¹¹ a) E. Zaborova, M. Guitet, G. Prencipe, Y. Bleriot, M. Ménand, M. Sollogoub, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1-7; b) M. Petrillo, L. Marinescu, C. Rousseau, M. Bols, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1983-1985.
- ¹² R. Ghosh, P. Zhang, A. Wang, C.-C. Ling, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1580-1584.
- ¹³ M. Sollogoub, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 1295-1303.
- ¹⁴ R. Gramage-Doria, D. Rodríguez-Lucena, D. Armspach, C. Egloff, M. Jouffroy, D. Matt, L. Toupet. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3911-3921.
- ¹⁵ H. Law, I. Baussanne, J. M. García Fernández, J. Defaye, *Carbohydr. Res.*, **2003**, *338*, 451-453.
- ¹⁶ G. J. Tarver, S. J. A. Grove, K. Buchanan, A. Bom, A. Cooke, S. J. Rutherford, M. Q. Zang, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1819-1827.
- ¹⁷ N. Masurier, O. Lafont, R. Le Provost, D. Lesur, P. Masson, F- Djedaini-Pilard, F. Estour, *Chem. Commun.*, **2009**, 589-591.
- ¹⁸ S. Xiao, M. Yang, P. Sinay, Y. Blériot, M. Sollogoub, Y. Zhang, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1510-1516.
- ¹⁹ P. Balbuena, D. Lesur, M. J. González-Álvarez, F. Mendicuti, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Commun.* **2007**, 3270-3272.
- ²⁰ M. J. González-Álvarez, P. Balbuena, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Mendicuti, F. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13717-13729.
- ²¹ M. J. González-Álvarez, J. Vicente, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 975-988.
- ²² M. J. González-Álvarez, A. Méndez-Ardoy, J. M. Benito, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Photochem. Photobiol., A* **2011**, *223*, 25-36.
- ²³ M. J. González-Álvarez, J. M. Benito, C. Ortiz-Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti Madrid, *J. Phys. Chem. B.* **2013**, *117*, 5472-5585.

-
- ²⁴ a) J. M. Madrid, F. Mendicuti, W. L. Mattice, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2037-2044.
b) T. Carmona, M. J. González Álvarez, F. Mendicuti, S. Tagliapietra, K. Martina, G. Cravotto. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 22431-22440
- ²⁵ J. M. Madrid, J. Pozuelo, F. Mendicuti, W. L. Mattice, *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *193*, 112-120.
- ²⁶ J. M. Madrid, F. Mendicuti, *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 1621-1627.
- ²⁷ A. Di Marino, F. Mendicuti, *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 1579-1587
- ²⁸ J. F. Rabek, *Mechanics of Photophysical Processes and Photochemical Reactions in Polymers: Theory and Applications.*; John Wiley & Sons.: Chichester, **1987**.
- ²⁹ F. Mendicuti, *F. Trends Phys. Chem.* **2006**, *11*, 61-77.
- ³⁰ a) J. Shi, D.-S. Guo, F. Ding, Y. Liu, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 923-931; b) Koji, K.; Taizo, I.; Shigeru, N. J. *Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1995**, *22*, 285-298; c) R. Reinhardt, M. Richter, P. P. Mager, *Carbohydr. Res.* **1996**, *291*, 1-9
- ³¹ C. Scheonbeck, P. Westh, J. C. Madsen, K. Lambertsen Larsen, L. Wagner Steade, R. Holm, *Langmuir* **2011**, *27*, 5832-5841.
- ³² J. Nishijo, M. Yasuda, M. Nagai, M. Sugiura, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 761-767.
- ³³ N. Mayordomo, M. J. González-Álvarez, L. Gallego Yerga, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2013**, *256*, 42-51
- ³⁴ M. J. González-Álvarez, N. Mayordomo, L. Gallego-Yerga, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2961-2972.

Capítulo 4

Vectores de genes supramoleculares sensibles a pH mediante autoensamblado jerarquizado de ciclodextrinas policatiónicas y ADN

Abstract. The ability of cyclodextrin-based polycationic cluster to undergo reversible DNA condensation and release in a physiologically useful pH window has been finely tuned by the installation of a capping xylylene moiety at the secondary face of the cyclooligosaccharide. This strategy can be exploited advantageously in the design of self-assembling nonviral gene-delivery systems from molecular entities. Dimerization of xylylene-CD derivatives in water as well as pH-dependent supramolecular dimerization with DNA have been studied by NMR, fluorescence experiments, circular dichroism, computational calculations, gel agarose electrophoresis, dynamic light scattering and transmission electron microscopy. Remarkable transfection efficiency of supramolecular systems was observed in COS-7 cells.



4. Vectores de genes supramoleculares sensibles a pH mediante autoensamblado jerarquizado de ciclodextrinas policatiónicas y ADN.

4.1. Antecedentes bibliográficos.

Entre los relativamente escasos prototipos de vectores de genes moleculares monodispersos autoensamblables propuestos hasta ahora, las ciclodextrinas policatiónicas anfifílicas (paCDs) están, sin duda, entre los más prometedores. Estos derivados presentan anfiflicidad facial, esto es, constan de un área policatiónica y otra hidrofóbica, cada una de ellas localizadas en una de las caras del ciclooligosacárido. En presencia de un ácido nucleico, las paCDs se autoorganizan formando nanocondensados, llamados CDplejos, en los que el material génico se encuentra completamente protegido del medio.^{1,2} Las imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) de los CDplejos muestran ultraestructuras finas en forma de serpiente consistentes con la presencia de bicapas de paCDs que se intercalan entre las cadenas de ADN (Figura 4.1).³ Es interesante destacar que los derivados de ciclodextrinas no anfifílicos son mucho menos eficaces en la complejación del ADN que las paCDs⁴ y que, por su parte, las paCDs no dan lugar a agregados definidos en ausencia de ADN.⁵

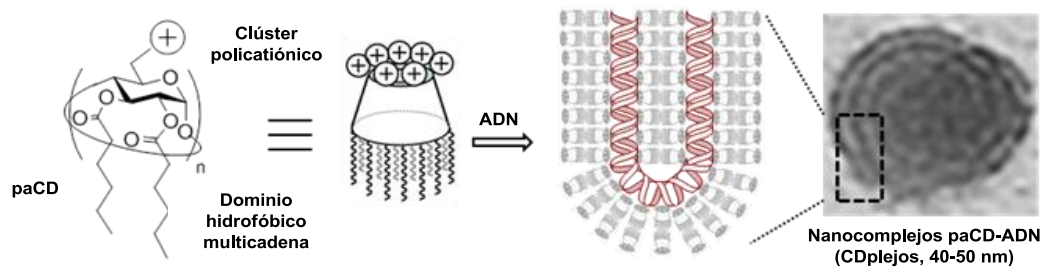


Figura 4.1. Estructura general de las ciclodextrinas policatiónicas anfifílicas (paCDs; $n = 6, 7$ u 8) e imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) de un CDplejo mostrando la típica ultraestructura en capas.

Trabajos anteriores del grupo de investigación han mostrado que los CDplejos formados a partir de las paCDs pueden internalizarse en las células empleando diferentes rutas de endocitosis y son eficaces como sistemas de transfección en un rango amplio de líneas celulares.⁶ Aunque aún no están claros los mecanismos implicados en la salida del material génico desde el endosoma, que es una etapa clave en la transfección, cabe esperar que un aumento de la protonación de las paCDs dé lugar a un incremento en la repulsión coulombica entre los clústeres policatiónicos, desestabilizando las bicapas y contribuyendo a la rotura del endosoma y la liberación del ADN.

Si el razonamiento anterior es correcto, podría esperarse que la programación de los componentes moleculares derivados de ciclodextrinas para que se autoorganicen en dímeros supramoleculares de tipo “cabeza-cabeza”,⁷ esto es, enfrentando sus caras secundarias y exponiendo los clústeres policatiónicos en direcciones opuestas, facilite el proceso reversible de la formación de bicapas y la disociación de los nanocondensados en función del pH, lo que tendría un impacto positivo en el proceso de transfección.⁸ Como hemos visto en el capítulo anterior, la incorporación de un sustituyente aromático doblemente enlazado en la cara secundaria de las ciclodextrinas puede promover la dimerización, dando lugar a arquitecturas de tipo cabeza-cabeza con simetría C_2 .⁹ Partiendo de estos antecedentes, en esta Tesis hemos diseñado una aproximación que se basa en la incorporación de un grupo xilileno en la cara secundaria de derivados de β -ciclodextrina policatiónicos como un elemento funcional capaz de inducir la preorganización deseada. El enlace de tipo diéter, que implica exclusivamente una unidad de glucopiranosilo, impide la auto-inclusión del anillo aromático en la cavidad de la CD así como procesos supramoleculares de oligomerización.¹⁰ Por el contrario, la presencia del anillo aromático favorece, a través de interacciones hidrofóbicas, la formación de especies diméricas bien definidas, con una topología adecuada para complejar el ADN de una manera dinámica y reversible que se active o desactive en un margen de pH fisiológicamente relevante (Figura 4.2).

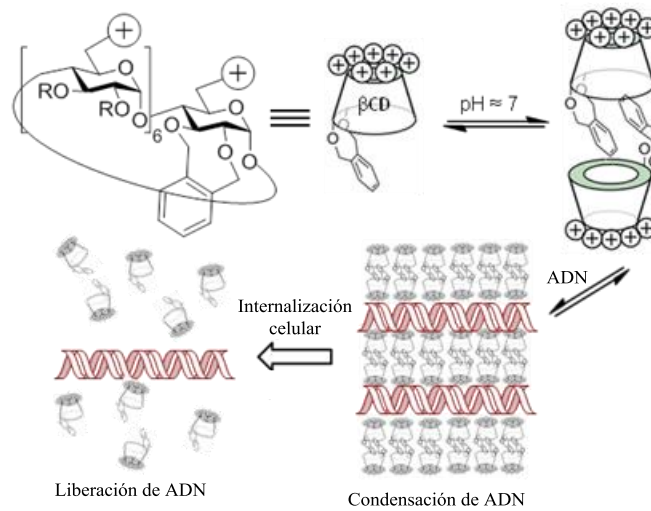


Figura 4.2. Estructura general del prototipo de βCD policatiónica funcionalizada con un grupo xilileno capaz de promover la autoasociación dependiente del pH. Representación esquemática de los procesos de ordenación jerárquica y de liberación de ADN.

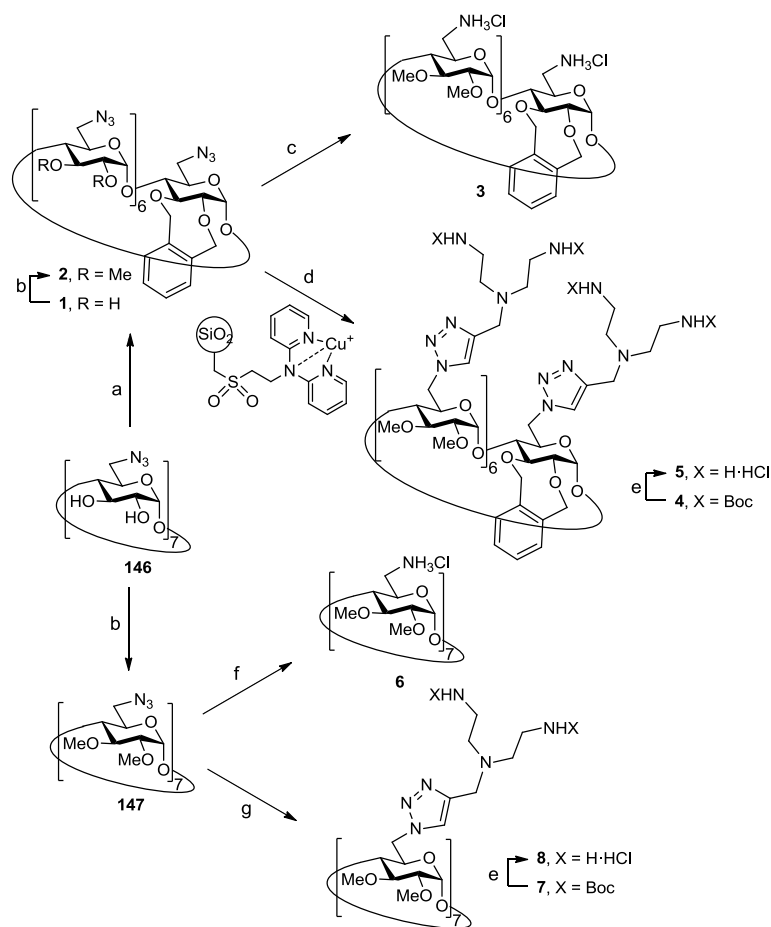
Para confirmar nuestra hipótesis se han preparado derivados policatiónicos de βCD xililenadas y sus homólogos permetilados, y se han estudiado sus propiedades de autoasociación por RMN y fluorescencia así como se han evaluado sus capacidades de interacción con ADN mediante dicroísmo circular, modelización molecular y dinámica molecular. Los complejos formados con ADN se han caracterizado mediante electroforesis en gel de agarosa, medidas de tamaño y potencial z y microscopía de transmisión electrónica. Finalmente, se ha evaluado su capacidad de complejación de ácidos nucleicos y su eficiencia de transfección *in vitro*.

4.2. Resultados y discusión.

4.2.1. Síntesis de derivados de CDs policationicas xililenadas y permetiladas.

Se han preparado los derivados xililenados de β CD **3** y **5**, que difieren en la naturaleza de las cabezas catiónicas (7 ó 14 grupos amino primarios, respectivamente), y los correspondientes análogos de CD permetilada¹¹ **6** y **8**, respectivamente, que no están funcionalizados con el grupo xilileno. La síntesis parte de la heptaazida¹² de la β CD **146** y se basa en la tendencia de los sistemas *vic*-dioles trans-diecuatoriales para formar el correspondiente ciclo insaturado de ocho miembros por reacción con α,α' -dibromo-*o*-xilileno (Esquema 4.1).¹³ El derivado **1** se obtuvo con un 24% de rendimiento (69% considerando la heptaazida sin reaccionar **146**, que se recupera) llevando a cabo la reacción en DMSO y en presencia de diisopropilamido de litio (LDA) como base. La metilación de los hidroxilos restantes (\rightarrow **2**) y la reducción de los grupos azido con trifenilfosfina condujo a la heptaamina **3** en forma de heptahidrocloruro. La preparación de la poliamina dendrítica xililenada **5**, se llevó a cabo por multiacoplamiento tipo “click”, haciendo uso de la reacción azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC), del derivado **2** con 3-bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]aminopropino,¹⁴ usando sílica funcionalizada con bis(piridil)amina (BPA) como agente quelatante de Cu(I) ($\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$)¹⁵ (\rightarrow **4**). El uso de este catalizador heterogéneo, fácilmente manipulable y recuperable, permite obtener en heptaaducto triazólico deseado con un 93% de rendimiento. La desprotección en medio ácido de los grupos carbamato condujo al derivado **5**, con 14 grupos amino primarios, que se caracterizó como el correspondiente tetradecahidrocloruro.

Una secuencia de reacciones similares partiendo de la heptaazida de la β CD per-(*O*-2,*O*-3)-metilada¹⁶ **147** proporcionó los compuestos **6** y **8**, que se usaron como referencias para evaluar el impacto del grupo xilileno en la capacidad de complejación y transporte del ADN. La homogeneidad de los compuestos **3**, **5**, **6** y **8** se confirmó mediante RMN (Figura 4.3.) así como EM-ESI y análisis elemental.



Esquema 4.1. Preparación de las paCDs **6** y **8** y de sus análogos dimerizables **3** y **5**. Reactivos y condiciones: a) i. LDA, DMSO, t.a., 16 h; ii. *o*-dibromoxileno, DMSO, t.a., 6 h, 24%; b) MeI, NaH, DMF, 0 °C → t.a., 76-95%; c) PPh₃, NH₄OH, MeOH, t.a., 6 h, 96%; d) 3-bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]aminopropino, DMF, 120 °C, 2 h, 93%; e) i. TFA-DCM 1:1, t.a., 3 h; ii. HCl aq., 99%; f) PPh₃, NH₄OH, MeOH, t.a., 6 h, 99%; g) 3-bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]aminopropino, ^tBuOH-H₂O 2:1, reflujo, 12 h, 95%.

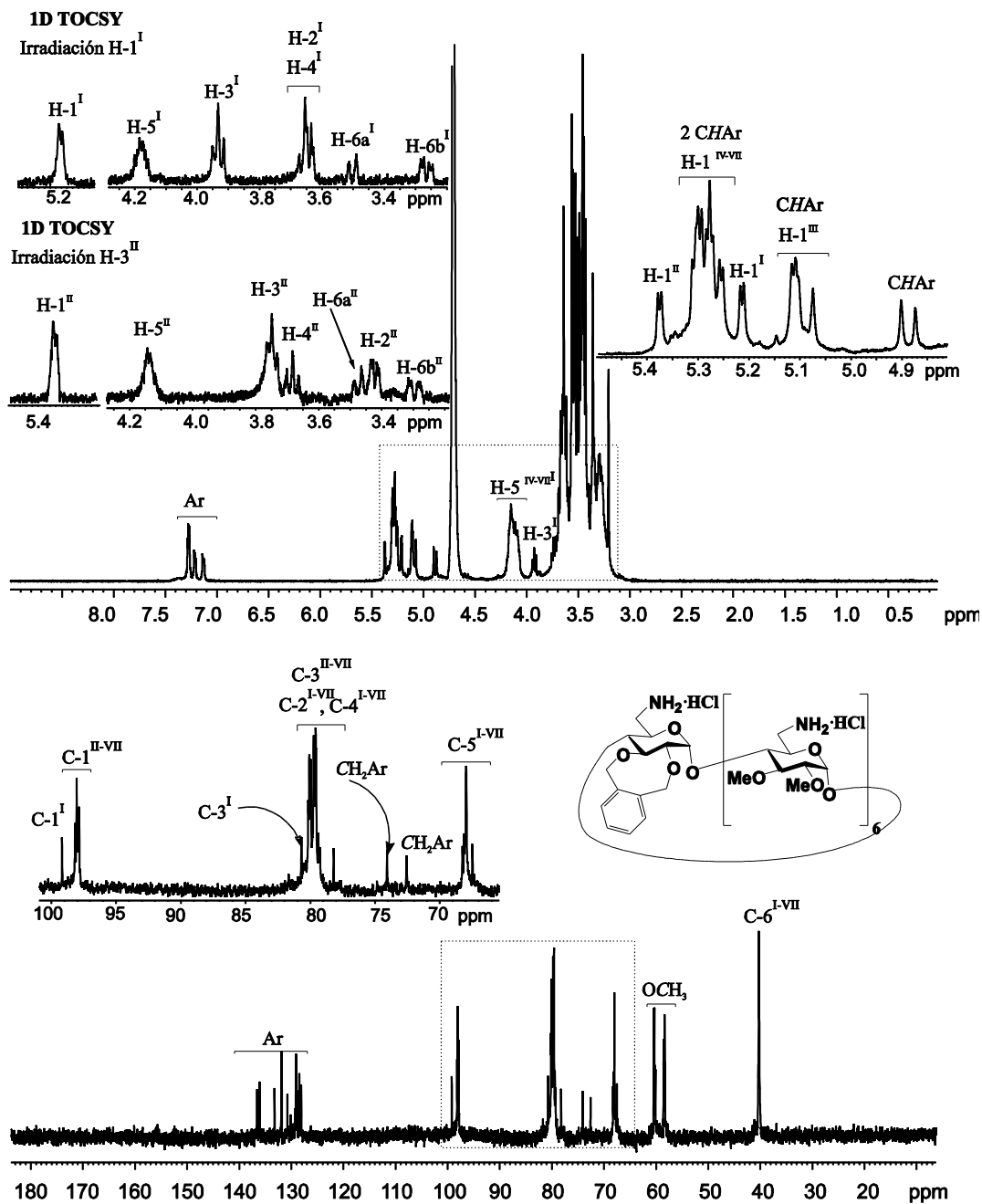


Figura 4.3. Espectros de ^1H , 1D TOCSY (irradiación a H-1^I y H-3^{II}), y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, respectivamente, D_2O , 313 K) de **3**.

4.2.2. Estudio de las propiedades de asociación de las CDs policatiónicas xililenadas mediante RMN.

Las ciclodextrinas funcionalizadas con el grupo xilileno **3** y **5**, a diferencia de los derivados no xililenados **6** y **8**, mostraron coeficientes de temperatura de solubilidad en agua negativos, lo que significa que sus disoluciones saturadas experimentan precipitación al calentar. La disminución de la solubilidad en agua con el aumento de temperatura es un indicativo de la formación exotérmica de especies supramoleculares hidrofílicas las cuales se desorganizan al elevar la temperatura para dar componentes hidrofóbicos que precipitan en agua. En vista de estos resultados, se estudiaron las propiedades de asociación de los derivados xililenados mediante resonancia magnética nuclear. Los espectros de ^1H RMN de la heptaamina **3** (Figura 4.3) en disolución acuosa mostraron desplazamientos significativos de las señales de los protones metilénicos de los grupos bencilo al variar la concentración (de 5 a 0.5 mM), el pH (de 7.4 a 5.0) o la temperatura (de 283 a 333 K). Esta observación es consistente con la existencia de un fenómeno de agregación asociado a un cambio conformacional en la región del puente de tipo diéter.

Los espectros de ^1H RMN de disoluciones acuosas de **3** a temperatura variable (Figura 4.4) indican que el proceso de agregación está favorecido entálpicamente, pues se observa la formación de los agregados a bajas temperaturas (como denota el ensachamiento de las señales al pasar de 333 K a 283 K) y su disociación a altas temperaturas, ya que a 333 K las señales de RMN presentan una mayor resolución característica de especies monomoleculares.

Los experimentos de ^1H RMN a concentración variable confirmaron que la fracción de especie que se encuentra formando parte del agregado aumenta con la concentración de CD.

Los espectros de ^1H RMN a pH variable mostraron que la disminución de pH conlleva la disociación de los agregados (Figura 4.5), característica deseable para el empleo de estos derivados como vectores de genes.

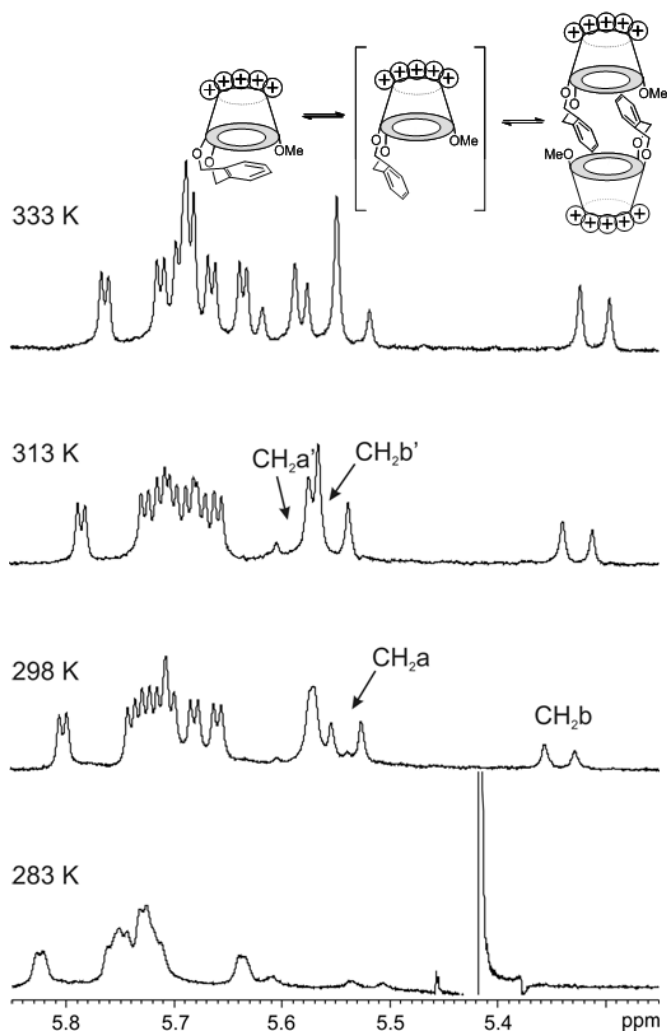


Figura 4.4. Espectros de ^1H RMN (500 MHz, D_2O) de **3** a temperatura variable.

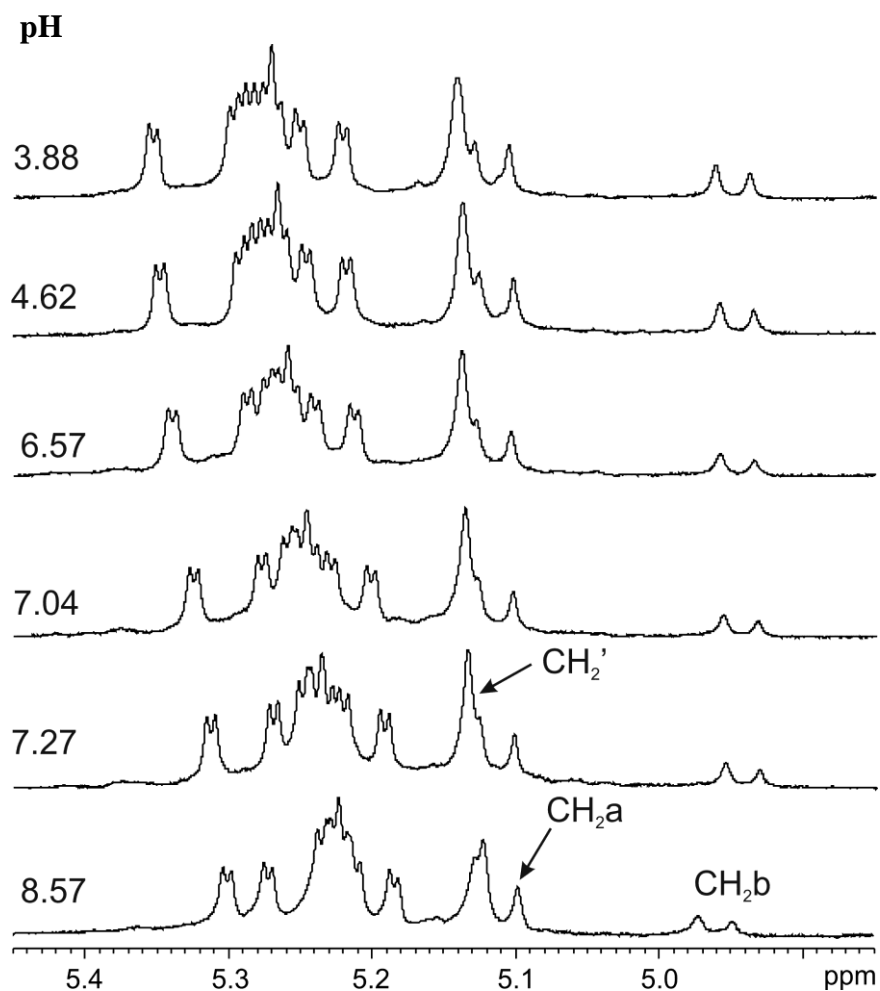


Figura 4.5. Espectros de ^1H RMN (500 MHz, D_2O) de **3** a pH variable.

Experimentos NOE descartaron procesos de auto-inclusión y fueron consistentes con el cambio conformacional entre las disposiciones “con tapadera” y “abierta” al pasar del monómero al dímero cabeza-cabeza que se espera que se dé por analogía con los derivados de CD-xilileno neutros estudiados en el capítulo 3.^{10b} Estos equilibrios explican los coeficientes negativos de solubilidad en agua: a bajas temperaturas predomina la especie dimérica, en la que el grupo xilileno está aislado del medio acuoso externo; al

aumentar la temperatura, el equilibrio se desplaza hacia la forma monomérica, en la que grupo aromático está más expuesto al medio acuoso, lo que se traduce en una disminución de la solubilidad.

Aunque la complejidad de los espectros en el caso del compuesto **5** impidieron un análisis similar (**3** y **5** son heptasacáridos no simétricos), cabe esperar un comportamiento análogo, de acuerdo con la disminución de la solubilidad en agua observada cuando aumenta la temperatura y se disocia el dímero.

En conclusión, los estudios de RMN indican que los derivados de CDs policatiónicas xililenadas dan fenómenos de agregación en medio acuoso que se ven favorecidos con la disminución de la temperaturas (procesos exotérmicos), el aumento del pH y el aumento de la concentración de la CD.

4.2.3. Estudio de las propiedades de asociación de las CDs policatiónicas xililenadas y de sus interacciones con ADN mediante técnicas de fluorescencia y de dicroísmo circular.

Con objeto de profundizar en las propiedades conformacionales y de agregación de los derivados preparados, se ha realizado, en colaboración con el Prof. Francisco Mendicuti (Universidad de Alcalá de Henares), un estudio detallado usando diferentes técnicas fluorimétricas y de dicroísmo circular.

Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia del derivado **3** en presencia de ADN (*calf thymus*), en agua y en medio tamponado (HEPES 20 mM, pH 7.4 y tampón pH 5.5) tras excitación del grupo xilileno a 260 nm a diferentes temperaturas (5-25°C). Los espectros mostraron un máximo de emisión centrado en 288 nm y la ausencia de desplazamientos de las bandas hacia menores longitudes de onda indican que no se forman excímeros intermoleculares. Estos resultados son similares a los observados para los derivados de CDs xililenadas neutras (capítulo 3).

Las medidas de la caída de intensidad de fluorescencia del compuesto **3** en agua se registraron para longitudes de onda de excitación y de emisión del grupo xilileno ($\lambda_{em} = 280$ nm, $\lambda_{exc} = 260$ nm). Los perfiles de caída de fluorescencia se ajustaron a la suma de tres funciones exponenciales. Así, además de un componente con tiempo de vida corto (≈ 0.3 ns), debido a una pequeña dispersión por parte del disolvente (causada, principalmente, por el uso de celdas cilíndricas), se han identificado otros dos componentes con tiempos de vida de ≈ 5 y ≈ 10 ns, que pueden atribuirse a las especies monomérica y dimérica, respectivamente, lo que confirma la existencia de un proceso de dimerización de la CD. La contribución del dímero aumenta con la concentración y disminuye ligeramente con la temperatura, mientras que se observa la tendencia inversa para la contribución del monómero, lo que apoya la existencia de un proceso de dimerización exotérmico y está de acuerdo con los resultados obtenidos por RMN y con el comportamiento de los derivados xililenados neutros **137-139**.

A partir de los perfiles de caída de fluorescencia se determinaron los tiempos de vida media ponderado $\langle \tau \rangle$, y se registró la variación de $\langle \tau \rangle$ con la concentración del derivado **3** (Figura 4.6, A). El ajuste de dichos datos experimentales a la ecuación que relaciona $\langle \tau \rangle$ y concentración de CD (anexo 2, apartado 4), permitió calcular las constantes del equilibrio de dimerización (K).

La constante del equilibrio de dimerización (K) mostró una fuerte dependencia del pH. Así, a pH 5.5 y 25 °C, se obtuvo un valor de K de 150 ± 30 M⁻¹ mientras que los experimentos que se llevaron a cabo a pH 7.4 mostraron un incremento en la constante de dimerización de 10 veces, con un valor de $K = 1900 \pm 100$ M⁻¹ a 25 °C (Tabla 4.1).

Los valores de variación de entalpía (ΔH°) y de entropía (ΔS°) del proceso de dimerización en agua y en medio tamponado (pH 5.5 y 7.4) se obtuvieron mediante representaciones de van't Hoff (Figura 4.6, B). Los resultados se recogen en la Tabla 4.1.

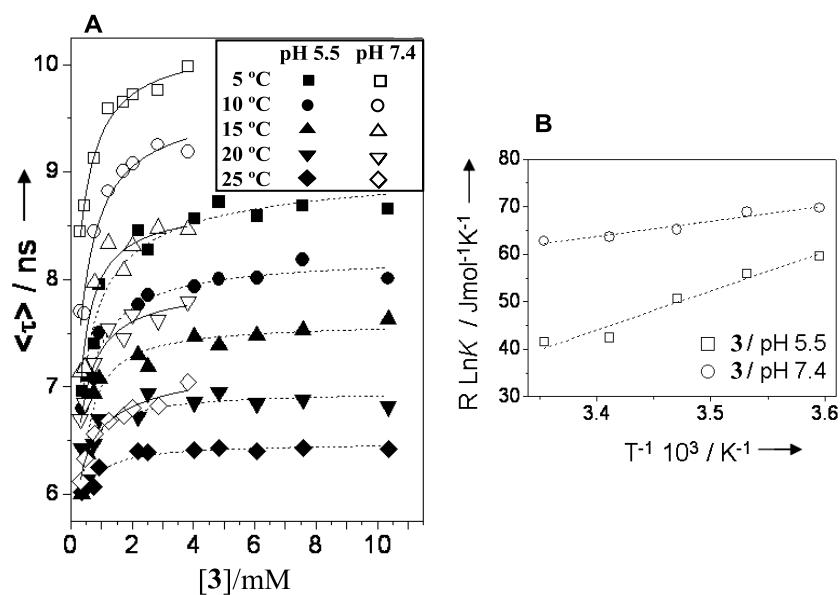


Figura 4.6. (A) Variación del promedio de vida media ponderada, $\langle \tau \rangle$, frente a la concentración de **3** para disoluciones acuosas a pH 5.5 (marcadores rellenos) y a pH 7.4 (marcadores huecos), a varias temperaturas. (B) Representación lineal de van't Hoff, a pH variable, en el rango 5-25 °C a intervalos de 5 °C.

Tabla 4.1. ΔH° , ΔS° y constantes de equilibrio (K) asociados al proceso de dimerización del derivado **3** a pH 5.5 y pH 7.4, a 25 °C.

Sistema	K (M^{-1})	ΔH° ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔS° ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
Dímero de 3 (agua)	147 ± 25	-77 ± 3	-218 ± 10
Dímero de 3 (pH 5.5)	150 ± 30	-83 ± 9	-237 ± 33
Dímero de 3 (pH 7.4)	1900 ± 100	-32 ± 5	-45 ± 16

Los valores negativos de ΔH° indican interacciones intermoleculares entre CDs basadas en interacciones de tipo van der Waals mientras que los valores negativos de ΔS° son, probablemente, consecuencia de la pérdida de grados de libertad rotacional y traslacional del dímero respecto al monómero, que no se ven compensados por la liberación de moléculas de agua que se produce durante la dimerización. Estos valores

también indican que el fragmento de xilileno no penetra en la cavidad de la CD adyacente ya que dicha internalización implicaría valores de ΔS° positivos.

Experimentos de control usando el derivado no xililenado **6** y mezclas de **3** y **6** descartaron la formación de dímeros de **6** o de heterodímeros **3:6** bajo las mismas condiciones, confirmando la importancia del motivo de xilileno en el proceso de autoensamblado. Estos resultados están de acuerdo con los que se obtuvieron para los derivados de CD neutros estudiados en el capítulo 3.

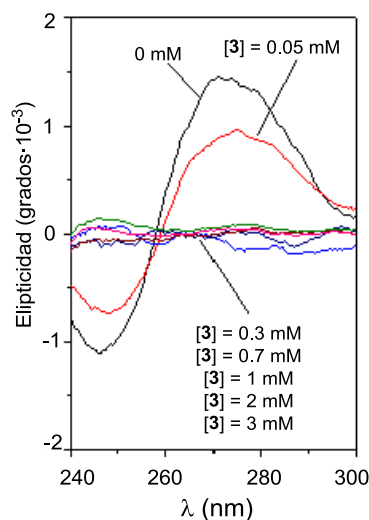


Figura 4.7. Espectros de dicroísmo circular de ADN (*calf thymus*) en ausencia y en presencia del derivado **3** (0.05-3 mM) en medio tamponado (HEPES, 20 mM) a pH 7.4 y 25 °C.

Los espectros de dicroísmo celular de ADN, registrados en ausencia y en presencia del derivado **3**, a pH 7.4, indicaron inequívocamente la existencia de interacciones que distorsionan la estructura de tipo B típica del ADN no complejo (Figura 4.7). Así, el aumento de concentración del derivado **3** en las formulaciones CD:ADN condujo a una disminución de las intensidades de las bandas positiva y negativa, a 278 y 245 nm, correspondientes al apilamiento de las bases y a la helicidad de la cadena de polinucleótidos, respectivamente.¹⁷

Los resultados obtenidos demuestran la existencia de un equilibrio de dimerización entálpicamente favorable y sensible al pH, así como la capacidad de los dímeros de interactuar con el ADN. La elevada estabilidad de los dímeros a pH fisiológico, así como su disociación a pH ácido, es una propiedad que podría favorecer la complejación eficaz del ADN y su liberación en el citoplasma como consecuencia de la acidificación del endosoma.

4.2.4. Estudios teóricos de las propiedades de asociación de las CDs policatiónicas xililenadas y de sus interacciones con ADN mediante modelización molecular y dinámica molecular.

Con objeto de obtener una información más detallada del proceso de autoensamblado, se ha estudiado la estabilidad del dímero de **3** en ausencia y en presencia de ADN mediante cálculos de mecánica molecular (MM) y dinámica molecular (DM) empleando el programa Sibyl X-2.0 y el campo de fuerzas Tripos.¹⁸ Se emplearon dos fragmentos de ADN-B helicoidales con una secuencia de doce nucleótidos (CGCGAATTCGCG) cada uno. En primer lugar, se obtuvo la estructura de mínima energía (*Minima Binding Energy*, MBE) del dímero de **3** en agua usando cálculos de MM, y esa estructura se empleó para el análisis por DM. A continuación se utilizaron dichas geometrías optimizadas para estudiar su interacción con ADN por MM y DM.

Estudios teóricos del proceso de dimerización en ausencia de ADN.

Inicialmente se estudió la formación del dímero del derivado **3** por mecánica molecular y su estabilidad en agua. Para ello se llevó a cabo la aproximación de dos moléculas de **3**, con geometrías previamente optimizadas, con pasos de 0.5 Å a lo largo del eje y, tal y como se muestra en la Figura 4.8, y se calculó la energía del sistema para

cada distancia CD-CD. Como molécula de partida se consideró la molécula de CD neutra y cargada (con todos los grupos aminos protonados, carga +7).

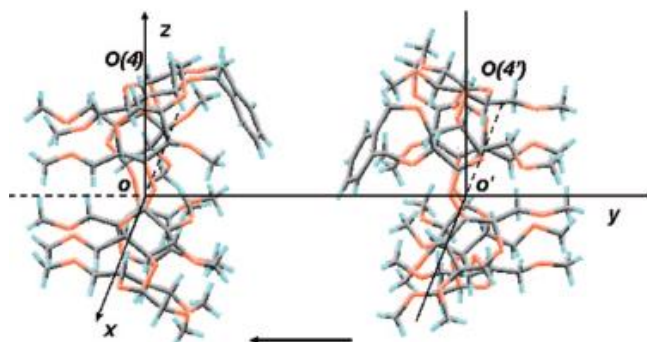


Figura 4.8. Sistema de coordenadas empleado y procedimiento para simular la el proceso de dimerización de **3**, por MM, mediante una aproximación cabeza-cabeza.

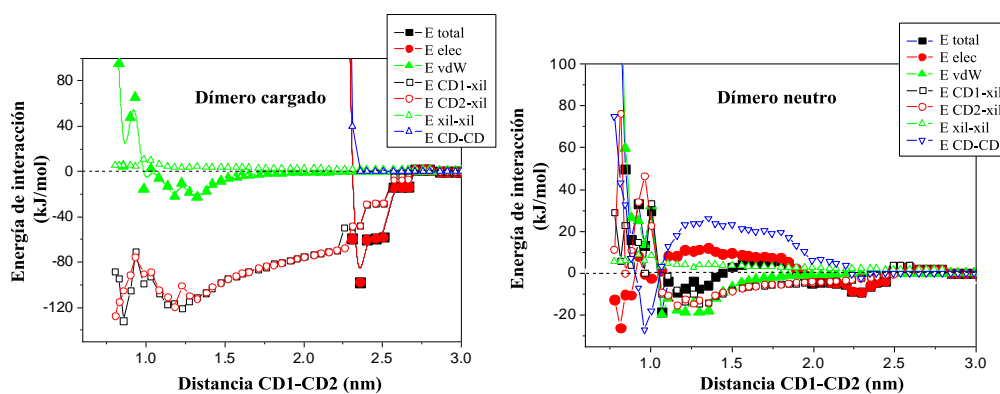


Figura 4.9. Energías de interacción total y distintas contribuciones en función de la distancia CD-CD, a lo largo de la coordenada y, para el dímero de **3** cargado y neutro.

En la Figura 4.9. se representa la energía de interacción total y diferentes contribuciones en función de la distancia entre los centros de masas de las moléculas de CD (en el eje y), para el dímero neutro (izquierda) y cargado (derecha). Las diferentes

contribuciones son la energía electrostática (E_{elec}), energía de van der Waals (E_{vdW}), energías de interacción entre el grupo xilileno y la molécula de CD adyacente ($E_{CD1-xil}$ y $E_{CD2-xil}$), energía de interacción entre los dos fragmentos de xilileno-xilileno ($E_{xil-xil}$) y energía de interacción entre las dos moléculas de CD sin considerar la interacción debida a los grupos de xilileno (E_{CD-CD}).

La energía electrostática constituye la principal contribución a la energía de interacción total del dímero cargado, que presenta un mínimo para la distancia CD-CD de 23.5 Å. A menores distancias, la energía es repulsiva debido a interacciones electrostáticas desfavorables. Aunque la energía de van der Waals apenas contribuya a la energía total, presenta un mínimo en torno a 12.5 Å debido fundamentalmente a las interacciones atractivas entre los fragmentos de xilileno. En el dímero neutro se observa una menor contribución de la energía electrostática y una mayor contribución de energía de van der Waals, de modo que en este caso el mínimo de la energía total se localiza a 10.7 Å, con energías de interacción, en general, mayores que para el dímero cargado.

Las geometrías de mínima energía de interacción obtenidas por MM fueron empleadas como estructuras de partida para las simulaciones por DM de trayectorias de 1 ns a 300 K.

En la Figura 4.10 se muestran los resultados obtenidos para el dímero neutro. A lo largo de toda la trayectoria se mantienen las distancias CD-CD (Figura 4.10, A) y la energía de interacción es favorable (Figura 4.10, B). La energía de interacción de van der Waals y de interacción xilileno-CD constituyen las mayores contribuciones responsables de dicha estabilidad. La estructura MBE obtenida se muestra en la Figura 4.10, D.

Los estudios por DM del dímero cargado mostraron que la protonación de los grupos aminos resulta en una desestabilización de la estructura, pues, aunque las distancias entre los dos monómeros se mantuvieron a lo largo de toda la simulación (Figura 4.11, A), la energía de interacción fue repulsiva durante toda la trayectoria. Estos resultados están de acuerdo con la disminución en la constante de dimerización cuando disminuye el pH.

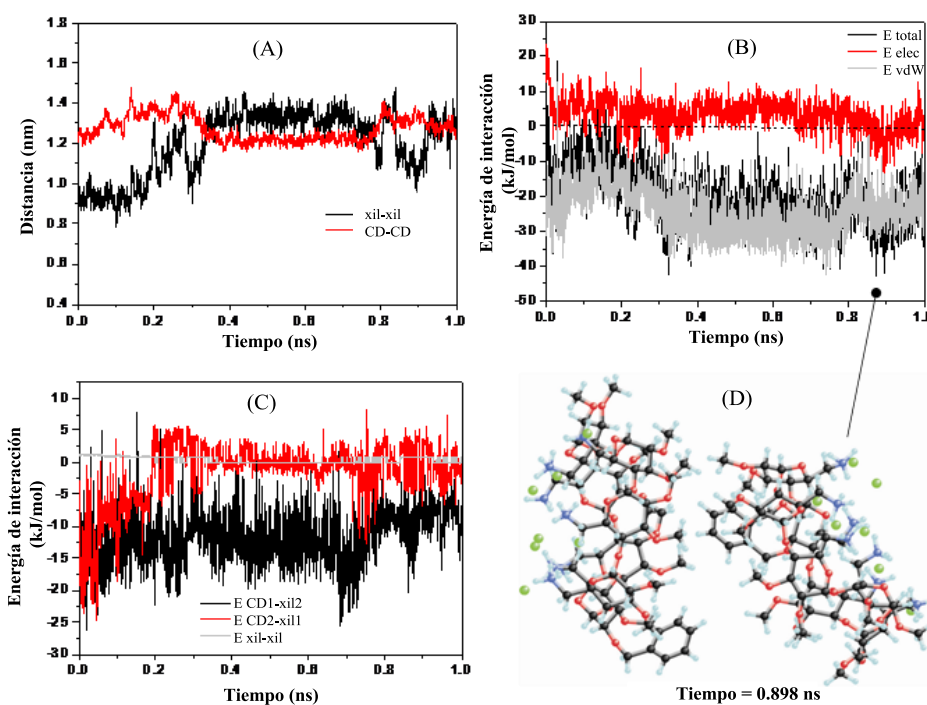


Figura 4.10. Simulaciones de DM para el dímero de **3** neutro: A. Historias de las distancias CD-xilileno. B. Energía total de interacción, electrostáticas y de van der Waals. C. Energías de interacción CD1-xilileno, CD2-xilileno y xilileno-xilileno. D. Estructura MBE del dímero neutro.

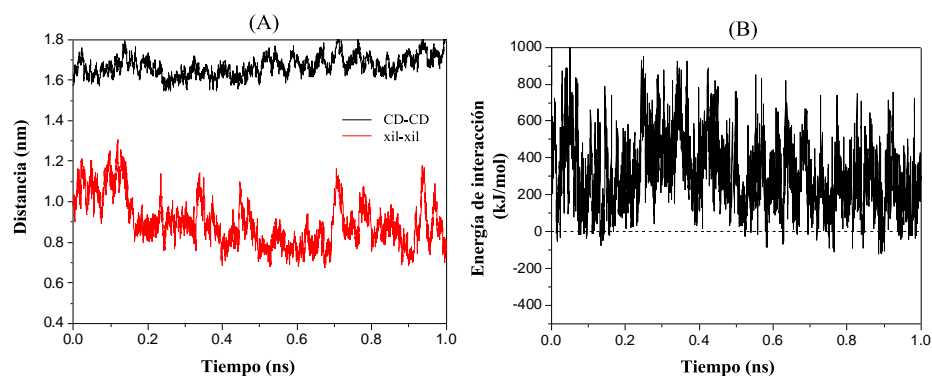


Figura 4.11. Trayectoria de DM para el dímero de **3** cargado: A. Historias de las distancias CD-xilileno. B. Energía total de interacción.

Estudios teóricos de las interacciones del dímero con ADN.

Para las simulaciones en presencia de ADN se empleó únicamente el dímero cargado dado que la interacción con los nucleótidos de ADN debe de ser fundamentalmente de tipo electrostático.

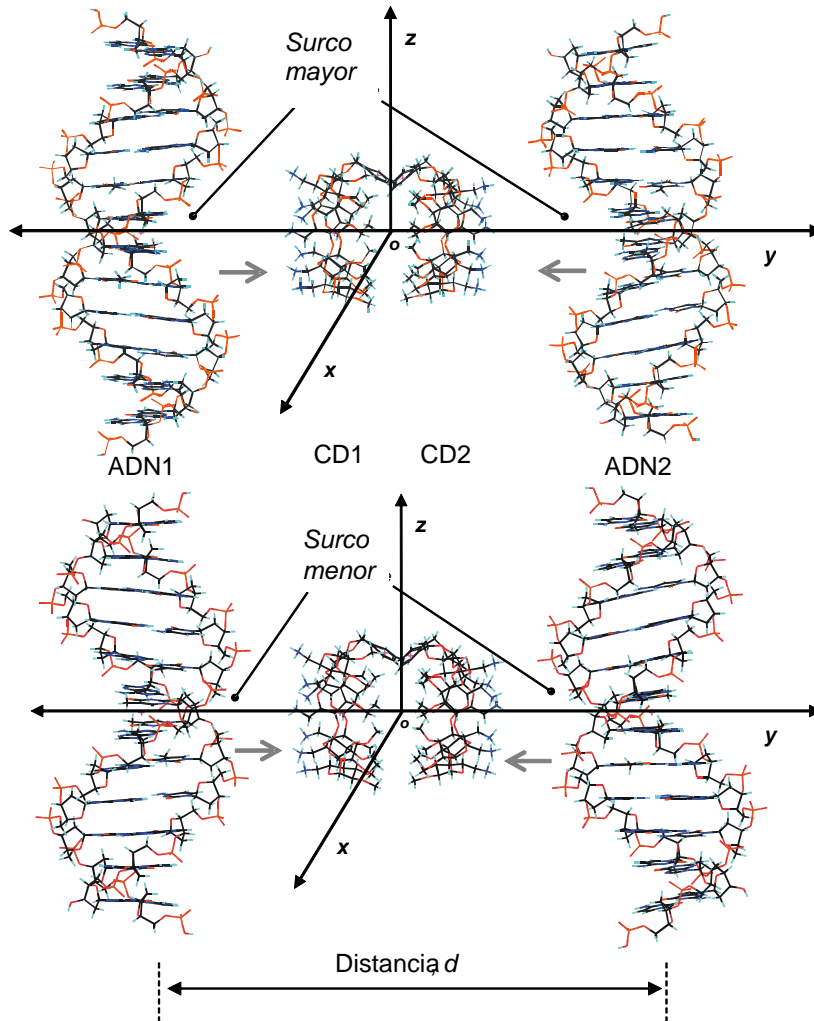


Figura 4.12. Sistema de coordenadas usado para la aproximación simultánea de dos fragmentos de ADN al dímero de **3** a lo largo de la coordenada y , que interactúan por el surco mayor (arriba) o menor (abajo).

La estructura de mínima energía del dímero de **3** cargado, obtenida por MM (MBE), se utilizó como geometría de partida para el estudio de la interacción de dicha especie supramolecular con el ADN. El dímero se situó en el origen del sistema coordenadas y, por MM, llevó a cabo la aproximación de los dos fragmentos de ADN, en pasos de 1 Å, a lo largo de eje y, considerando las dos orientaciones posibles del ADN: aproximación por el surco mayor o por el surco menor (Figura 4.12).

Los cálculos de energía del sistema en función de la distancia entre los dos fragmentos de ADN indican que la interacción CD-ADN es favorable en ambos casos, alcanzándose un mínimo de energía entre 25-30 Å, siendo la energía levemente más estable cuando el ADN se aproxima por el surco mayor. La energía electrostática es la principal responsable de la interacción global mientras que la energía de van der Waals sólo contribuye a distancias ADN-ADN menores de 30 Å, valor al que se empieza a observar impedimento estérico (Figura 4.13, A).

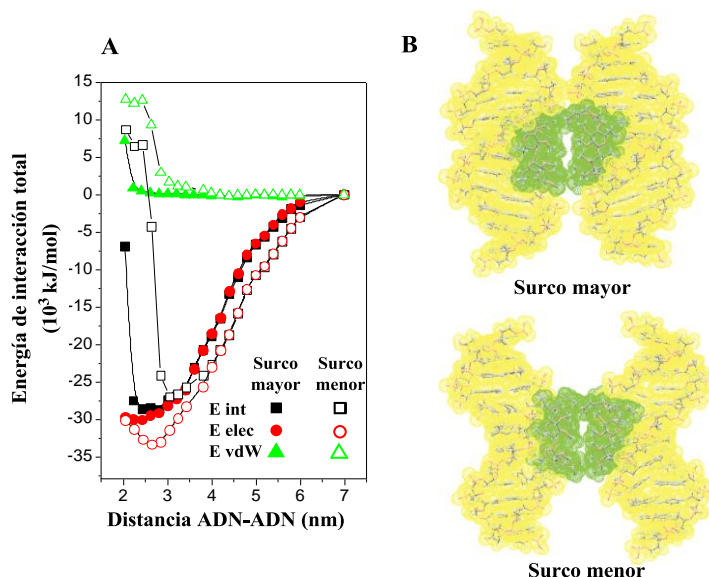


Figura 4.13. A. Energías de interacción en función de la distancia ADN-ADN para aproximación por el surco mayor o menor al dímero de **3**. B. Estructuras MBE obtenidas por MM, para una aproximación del ADN por el surco mayor o menor.

Las estructuras optimizadas por MM (MBE, Figura 4.13, B) correspondientes a los mínimos de energía, fueron empleadas como geometrías de partida para las simulaciones de DM (Figura 4.13, B). Los datos geométricos y energéticos obtenidos para las estructuras MBE así como los perfiles de energía-distancia en los que se distinguen las contribuciones de los distintos componentes del sistema se incluyen en el anexo 2 (Tabla A5 y Figura A3).

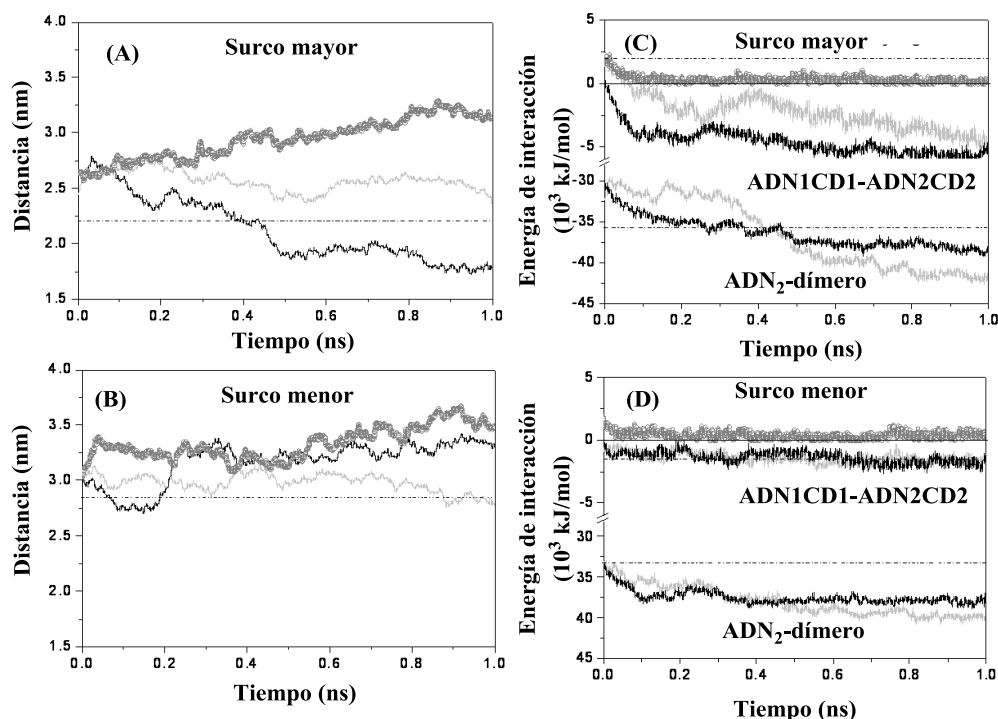


Figura 4.14. Historias de las distancias ADN-ADN para aproximación por el surco mayor (A) o menor (B) al dímero de **3**. Energías de interacción para la aproximación ADN-dímero (**3**) por el surco mayor (C) o menor (D). ADN conformacionalmente restringido (negro), no restringido (gris) y en ausencia de CD (gris oscuro).

En la Figura 4.14 (C y D) se recogen los datos de energía de interacción que tienen lugar, durante la trayectoria de 1 ns, entre los dos fragmentos de ADN y el dímero (ADN₂-dímero) y entre un conjunto formado por un fragmento de ADN y la molécula de

CD adyacente (ADN1-CD1) y el otro fragmento de ADN junto con su correspondiente molécula de CD (ADN2-CD2). Las energías fueron favorables a lo largo de toda la trayectoria, aunque fueron ligeramente más estables en el caso de la aproximación del ADN por el surco mayor. Se incluyeron estudios con ADN con conformación restringida (señales negras) para evitar pérdidas parciales de la conformación en los extremos de los oligonucleótidos durante la simulación. También se llevaron a cabo simulaciones de DM en ausencia del dímero de CD, cuyo resultado reveló que la estabilización del ADN requiere la presencia del dímero ya que la ausencia del dímero de CD condujo a energías desfavorables (Figura 4.14, C y D, gris oscuro). Del mismo modo, se observó que los oligonucleótidos tienden a alejarse cuando se lleva a cabo la simulación en ausencia de dímero mientras que las distancias ADN-ADN del complejo dímero-ADN se mantiene a lo largo de toda la trayectoria (Figura 4.14, A y B).

El conjunto de resultados obtenidos confirma la existencia de un proceso de dimerización promovido por el fragmento de xilileno de la cara secundaria de la CD, que se desestabiliza como consecuencia de la protonación de los grupos amino, lo que concuerda con la disminución de la constante de equilibrio al bajar el pH. Las simulaciones por DM han confirmado la estabilidad de los dímeros y los cálculos en presencia de fragmentos de ADN indican que existe una interacción favorable ADN-CD, con una mejor acomodación del ADN cuando se aproxima por el surco mayor.

4.2.5. Estudios de interacción de los dímeros de CD con ADN mediante electroforesis en gel de agarosa , dispersión dinámica de la luz (DLS) y microscopía de transmisión electrónica (TEM).

La capacidad de los derivados **3** y **5** para complejar y compactar un plásmido de ADN (pADN) se confirmó mediante experimentos de movilidad electroforética en gel de agarosa, utilizando el agente intercalante fluorescente GelRed™ para su visualización y empleando valores de N/P 1-50 (Figura 4.15). La relación N/P se refiere al número de

grupos amonio catiónicos del vector (N) frente al número de grupos fosfato aniónicos del pADN (P).

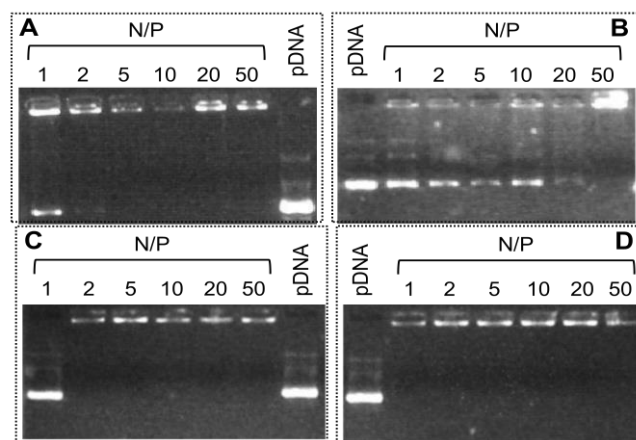


Figura 4.15. Electroforesis en gel de agarosa de las formulaciones de pADN y **3** (A) ó **5** (C), y de sus correspondientes análogos no xililenados **6** (B) y **8** (D), respectivamente.

Las formulaciones se prepararon por adición, sobre una disolución del pDNA en HEPES (20 mM, pH 7.4), de la cantidad correspondiente de CD, empleando un plásmido que codifica la luciferasa pTG11236 (pCMV-SV40-luciferase-SV40pA, 5739 pares de bases). Durante el experimento, se aplica una diferencia de potencial entre los dos extremos de la celda electroforética, de modo que el pADN libre se desplaza hacia el polo positivo y los complejos de ADN-CD en los que se haya neutralizado la carga del ADN presentan una movilidad nula. Los dos derivados xililenados, **3** y **5** (Figura 4.14, A y C), exhibieron una complejación total de ADN a una relación $N/P \geq 1$. El compuesto de referencia **6**, que no presenta ningún elemento que promueva la dimerización, requiere un exceso de derivado de CD 20 veces mayor que su análogo xililenado **3** (Figura 4.15, panel B). La mayor densidad de grupos catiónicos que presentan los derivados poliaminotriazólicos, **5** y **8**, hizo que no apreciaran las diferencias debidas a la presencia del grupo xilileno. La integridad del plásmido en los complejos xililenados fue confirmada por electroforesis después de descomplejación con dodecilsulfato de sodio

(SDS). Esto demuestra que la presencia de señal en el gel de agarosa para los complejos de derivados xililenados no se debe a que el pADN esté accesible al agente intercalante sino a la inclusión del reactivo de visualización GelRed® en la cavidad de la CD.

La determinación del tamaño de las nanopartículas mediante DLS, a N/P 10, mostró que los derivados xililenados **3** y **5** forman nanopartículas de 380 nm y 121 nm, respectivamente, con bajos índices de polidispersidad, mientras que sus homólogos no xililenados no son capaces de compactar el ADN de manera eficiente, originando agregados de más de 1 μm y elevados índices de polidispersidad. Esto demuestra la importancia del fragmento del xilileno en las capacidades de complejación y compactación del ADN. Los valores de potencial ζ fueron positivos en todos los casos, lo que confirma la total neutralización del ADN (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Tamaños hidrodinámicos (nm), índices de polidispersidad (PI) y potenciales ζ (mV) para los CDplejos formulados con los derivados **3**, **5**, **6** y **8** y pADN, a N/P 10.

CDplejo	Tamaño \pm SD	PI \pm SD	ζ -potencial \pm SD
3 :pDNA	380.3 \pm 6.7	0.396 \pm 0.025	+17.6 \pm 0.9
5 :pDNA	121.5 \pm 1.4	0.196 \pm 0.018	+30.6 \pm 1.1
6 :pDNA	1683 \pm 194.2	0.627 \pm 0.085	+2.2 \pm 0.1
8 :pDNA	1011.5 \pm 83.7	0.317 \pm 0.035	+36.5 \pm 0.9

Los experimentos de microscopía de transmisión electrónica, TEM, confirmaron los resultados obtenidos por DLS. Se llevaron a cabo a N/P 20 para asegurar que el ADN está totalmente neutralizado en los cuatro casos. A N/P 20, el compuesto **3** en presencia de ADN da lugar a una mezcla de nanopartículas con diámetros menores que 100 nm (Figura 4.15, A). El aumento de densidad de carga positiva en el derivado **5** previene la agregación, dando lugar a una población monodispersa de nanopartículas esféricas con un diámetro de alrededor de 40 nm (Figura 4.16, C). La estructura ultrafina muestra regiones

alternadas de densidad electrónica alta (oscuras) y baja (claras), compatibles con el alineamiento de dímeros autoensamblados en capas situadas entre dos segmentos diferentes de ADN.¹⁹

La influencia de la capacidad de autoensamblado en las propiedades de condensación de ADN se puso también de manifiesto al comparar con la topología de los complejos formados por los análogos no dimerizables **6** y **8**, para los que se obtuvieron agregados con tamaños superiores a 500 nm (Figura 4.15., B y D, respectivamente).

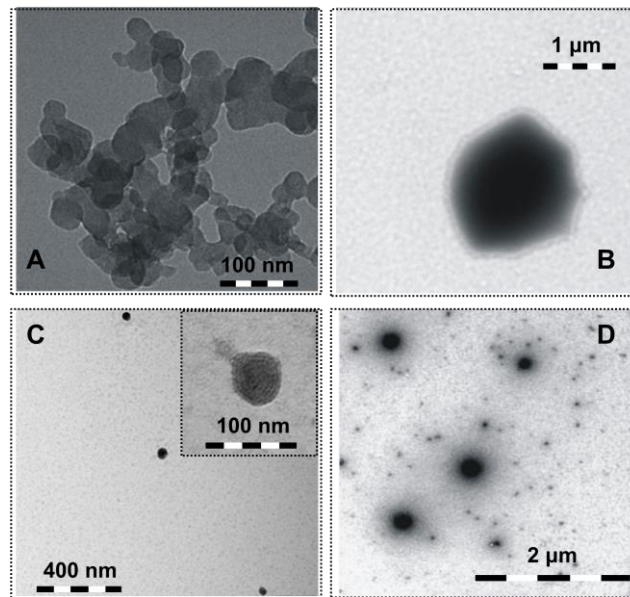
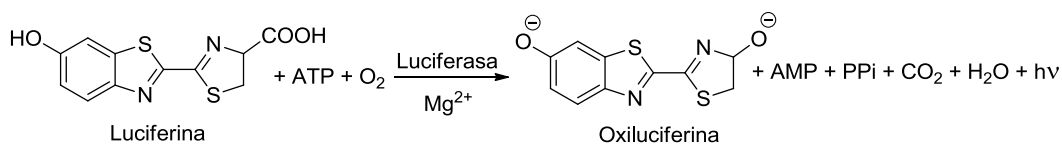


Figura 4.16. Imágenes de microscopía TEM de los complejos de pADN y **3** (A) y **5** (C), y de sus correspondientes análogos no xililenados **6** (B) y **8** (D), respectivamente, a N/P 20.

4.2.6. Eficiencia de transfección en células COS-7.

La eficacia de transfección de los CDplejos se evaluó utilizando un gen reportero de luciferasa (pTG11236) en células de riñón de primate COS-7. La luciferasa cataliza la oxidación de la luciferina para dar oxiluciferina y luz en el rango de 440 a 479 nm

(Esquema 4.2).



Esquema 4.2. Oxidación de luciferina catalizada por luciferasa.

La Figura 4.17. muestra la expresión de luciferasa (logaritmo de nanogramos de luciferasa respecto a los mg de proteínas totales) para los derivados **3**, **5**, **6** y **8**, a valores de N/P 5 y 10, en un medio con un 10% de suero, en comparación con la polietilimina ramificada (bPEI, 25 kDa), un vector policatiónico empleado como referencia de sistema de transfección génica no viral, y el pADN desnudo como control negativo.

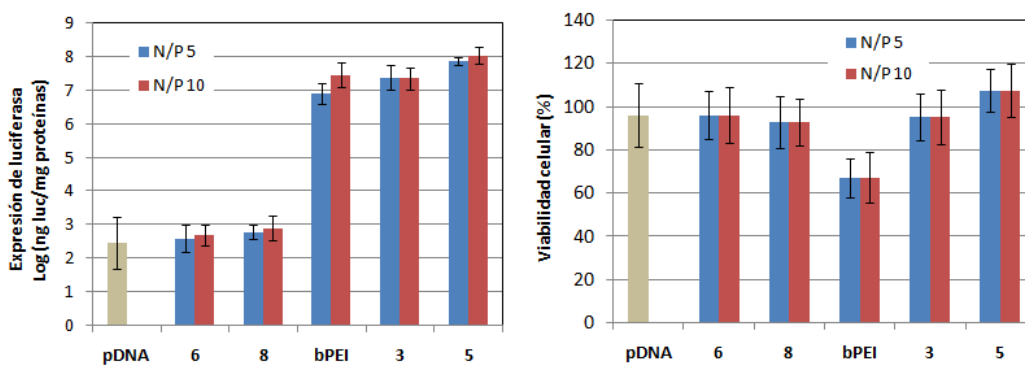


Figura 4.17. Eficacia de transfección (izquierda) y viabilidad celular (derecha) de CDplejos formulados con paCDs **3** y **5** a N/P 5 y 10 % de suero, en células COS-7. Como controles positivo y negativo se emplearon pDNA y poliplejos formulados con bPEI, respectivamente.

Se observó que, mientras que los derivados no xililenados **6** y **8** presentaron valores de transfección prácticamente nulos, análogos a los niveles residuales registrados en ausencia de vector policatiónico (control negativo, pDNA), sus homólogos xililenados mostraron unas excelentes propiedades de transfección. El derivado de heptaamina-CD **3** fue tan eficaz como la bPEI y las nanopartículas formuladas con **5** mostraron una eficacia 10 veces superior que bPEI a N/P 5 y 5 veces superior a N/P 10, que es la relación óptima

descrita para los poliplejos de bPEI. La superioridad del derivado **5** frente a **3** se debe, probablemente, a su mayor densidad de carga positiva (14 grupos amino-triazólicos) que favorece tanto la compactación más eficaz del pADN como su liberación en el citoplasma.

Es interesante destacar que todos los CDplejos mostraron un 100% de viabilidad celular, en contraste con la toxicidad relativamente alta de las formulaciones con bPEI (alrededor de 60% de viabilidad celular). Estos resultados confirman la importancia del fragmento de xilileno en las propiedades de transfección de los vectores policatiónicos preparados.

4.3. Conclusiones.

La incorporación de un grupo xilileno en la cara secundaria de β CD policatiónicas da lugar a sistemas capaces de formar nanocomplejos con el ADN y que presentan capacidad de dimerización dependiente del pH. Esta estrategia de preorganización facilita el autoensamblado de los componentes moleculares a pH neutro promovido por el propio ADN, que actúa como molde. Por el contrario, la acidificación del medio desestabiliza los dímeros y, en consecuencia, la superestructura formada con el ADN. El carácter dinámico y reversible de las interacciones implicadas permite el control de la condensación y liberación del material génico. Los resultados preliminares de transfección en células COS-7 sugieren que la liberación de ADN, después de la internalización, podría estar favorecida por un aumento de acidez en los endosomas.

Referencias

-
- ¹ Revisiones: a) C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. M. Benito, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1586-1608; b) J. M. García Fernández, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 1825-1845

-
- ² Referencias seleccionadas: a) A. M. O'Mahony, B. M. D. C. Godinho, J. Ogier, M. Devocelle, R. Darcy, J. F. Cryan, C. M. O'Driscoll, *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 744-752; b) N. Symens, A. Méndez-Ardoy, A. Díaz-Moscoso, E. Sánchez-Fernández, K. Remaut, J. Demeester, J. M. García Fernández, S. C. De Smedt, J. Rejman, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* 1276-1289; b) V. Villari, A. Mazzaglia, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, N. Micalli, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 811-817; c) A. M. O'Mahony, S. Desgranges, J. Ogier, A. Quinlan, M. Devocelle, R. Darcy, J. F. Cryan, C. M. O'Driscoll, *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 1086-1098; d) J. McCarthy, M. J. O'Neill, L. Bourre, D. Walsh, A. Quinlan, G. Hurley, J. Ogier, F. Shanahan, S. Melgar, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, *J. Control. Release* **2013**, *168*, 28-34; e) A. Martínez, C. Bienvenu, J. L. Jiménez Blanco, P. Vierling, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, C. Di Giorgio, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8143-8148.
- ³ a) A. Díaz-Moscoso, L. Le Gourriérec, M. Gomez-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, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12871-12888; b) A. Díaz-Moscoso, N. Guilloteau, C. Bienvenu, A. Méndez-Ardoy, J. L. Jiménez Blanco, J. M. Benito, L. Le Gourriérec, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Biomaterials* **2011**, *32*, 7263-7273; c) A. Méndez-Ardoy, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, F. Santoyo-González, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5882-5894.
- ⁴ A. Méndez-Ardoy, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, N. Sevillano, M. D. Girón, R. Salto, F. Santoyo-González, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2681-2684.
- ⁵ 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. Micalli, J. Defaye, J. M. García Fernández, *Chem. Commun.* **2008**, 2001-2003.

⁶ a) M. J. O' Neill, J. Guo, C. Byrne, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, *Int. J. Pharm.* **2011**, *413*, 174-183; b) A. Díaz-Moscoso, D. Vercauteren, J. Rejman, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, S. C. De Smedt, J. M. García Fernández, *J. Control. Release* **2010**, *143*, 318-325.

⁷ Las ciclodextrinas se han usado profusamente como componentes para la construcción de sistemas autoensamblados con topologías diferentes; ver ejemplos seleccionados: a) K. Yamauchi, Y. Takashima, A. Hashidzume, H. Yamaguchi, A. Harada, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5024-5025; b) M. Fathalla, A. Neuberger, S.-C. Li, R. Schmehl, U. Diebold, J. Jayawickramarajah, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9966-9967; c) I. Böhm, K. Isenbugel, H. Ritter, R. Branscheid, U. Kolb, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7407-7409; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7545-7547; d) I. Böhm, K. Isenbugel, H. Ritter, R. Branscheid, U. Kolb, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7896-7899; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8042-8045; e) A. Samanta, M. C. A. Stuart, B. J. Ravoo, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19909-19914; f) M. Ortiz, E. M. Wajs, A. Frago, C. K. O'Sullivan, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1045-1047; g) L. Chen, X. Zhao, Y. Lin, Y. Huang, Q. Wang, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9678-9680; h) S.-H. Hsu, M. D. Yilmaz, D. N. Reinhoudt, A. H. Velders, J. Huskens, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 714-719; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 742-747.

⁸ P. Daniele, G. Candiani, *J. Nanopart. Res.* **2013**, *15*, 1523-1527.

⁹ a) M. J. González-Álvarez, J. M. Benito, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 5472-5485; b) N. Mayordomo, M. J. González-Álvarez, L. Gallego Yerga, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* **2013**, *256*, 42-51; c) M. J. González-Álvarez, N. Mayordomo, L. Gallego-Yerga, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2961-2972; d) M. J. González-Álvarez, A. Méndez-Ardoy, J. M. Benito, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* **2011**, *223*, 25-36.

¹⁰ a) P. Balbuena, D. Lesur, M.J. González-Álvarez, F. Mendicuti, C. Ortiz Mellet, J.M. García Fernández, *Chem. Commun.* **2007**, 3270-3272; b) M. J. González-Alvarez, P.

Balbuena, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13717-13729.

¹¹ D. A. Fulton, A. R. Pease, J. F. Stoddart, *Isr. J. Chem.* **2000**, *40*, 325-333.

¹² a) A. Gadelle, J. Defaye, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 95-96; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 78-80; b) J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, J. L. Jiménez Blanco, J. Fuentes, A. Gadelle, A. Coste-Sarguet, J. Defaye, *Carbohydr. Res.* **1995**, *268*, 57-71.

¹³ P. Balbuena, R. Gonçalves-Pereira, J. L. Jiménez Blanco, M. I. García-Moreno, D. Lesur, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1390-1403.

¹⁴ A. Méndez-Ardoy, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, N. Sevillano, M. D. Girón, R. Salto, F. Santoyo-González, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2681-2684.

¹⁵ A. Megía-Fernández, M. Ortega-Muñoz, J. López-Jaramillo, F. Hernández-Mateo, F. Santoyo-González, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 3306-3320.

¹⁶ S. Choon, T. Ong, P. Fu, C. B. Ching, *J. Chromatogr. A.* **2002**, *968*, 31-40.

¹⁷ J. Kypr, I. Kejnovska, D. Renciuik, M. Vorlikova, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1713-1725.

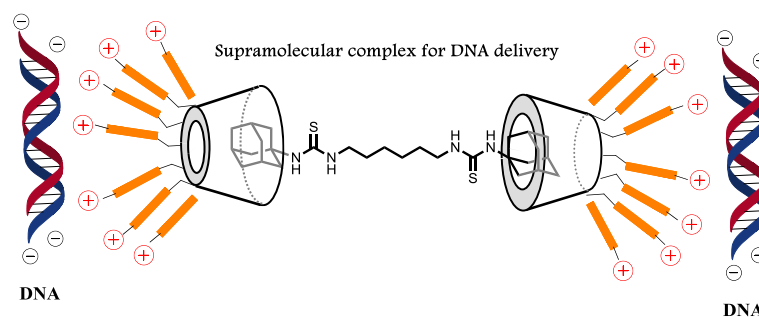
¹⁸ a) Sybyl-X 2.0, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA; b) M. Clark, R. D. Cramer III, O. N. Van, *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 982-1012.

¹⁹ 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. U.S.A.* **2007**, *104*, 16534-16539.

Capítulo 5

Preparación de sistemas autoensamblados mediante prefuncionalización supramolecular y evaluación de su capacidad de transfección

Abstract: ternary systems consisting of bis-adamantane derivatives and two units of per-cisteamine- β -cyclodextrin have been prepared. Their structure and the thermodynamic of the process has been studied by ^1H NMR, Isothermal Titration Calorimetry (ITC) and molecular mechanics and molecular dynamics. The self-assembled systems are able to complex DNA affording nanoparticles where gene material is fully protected, as electrophoresis shift mobility assays demonstrate. Excellent transfection efficiency and low toxicity levels were observed in COS-7 and HepG2.



5. Preparación de sistemas autoensamblados mediante preorganización supramolecular y evaluación de su capacidad de transfección.

5.1. Antecedentes bibliográficos.

La capacidad de las CDs y sus derivados de incluir fragmentos moleculares de tamaño complementario en su cavidad permite generar sistemas supramoleculares preorganizados utilizando huéspedes multitópicos de geometría adecuada. En el marco de esta Tesis, y con objeto de promover una interacción eficaz con el ADN, hemos explorado la formación de dímeros supramoleculares a partir de ciclodextrinas policationicas no anfifílicas y derivados de tipo bis-adamantano, considerando la elevada afinidad que presenta este motivo estructural por la cavidad de β CD en disolución acuosa.¹ Se originaría así un sistema dinámico que puede considerarse como el elemento mínimo de una bicapa, evitando la necesidad de la doble funcionalización facial de la plataforma de CD (Figura 5.1).

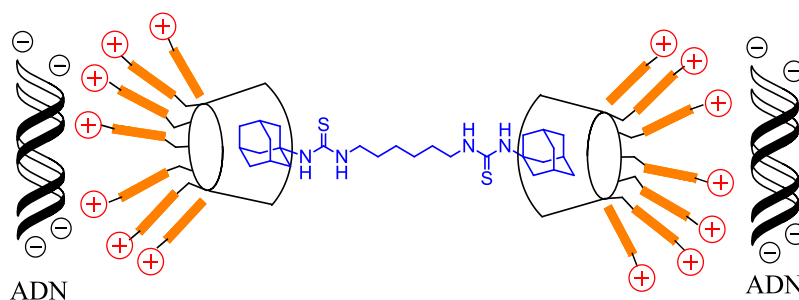


Figura 5.1. Representación esquemática de la interacción de un dímero supramolecular de ciclodextrina policationica con ADN.

Esta estrategia no sólo simplificaría la ruta sintética para la preparación de los vectores, sino que además permitiría introducir diversidad molecular de una forma mucho más simple y directa. La posibilidad de diseñar el espaciador para modular la distancia

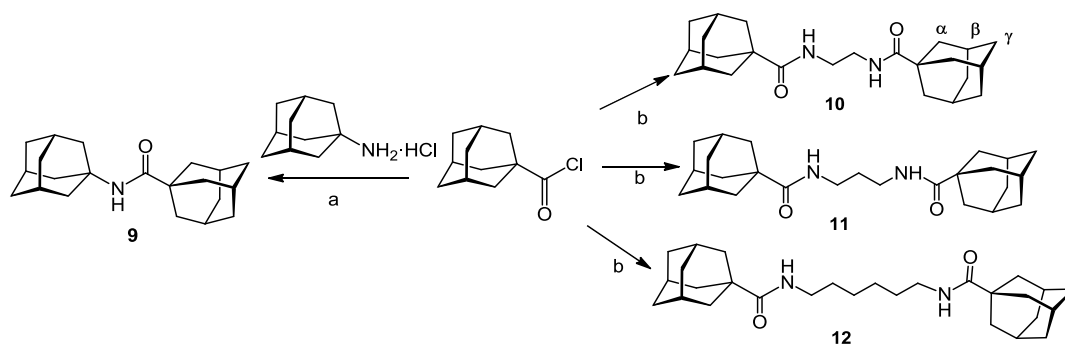
entre las dos cabezas policatiónicas o, incluso, para introducir un nuevo elemento funcional, por ejemplo para la visualización o la liberación controlada, hacen que tenga, *a priori*, una gran versatilidad.

5. 2. Resultados y discusión.

5.2.1. Síntesis de los derivados de bis-adamantano.

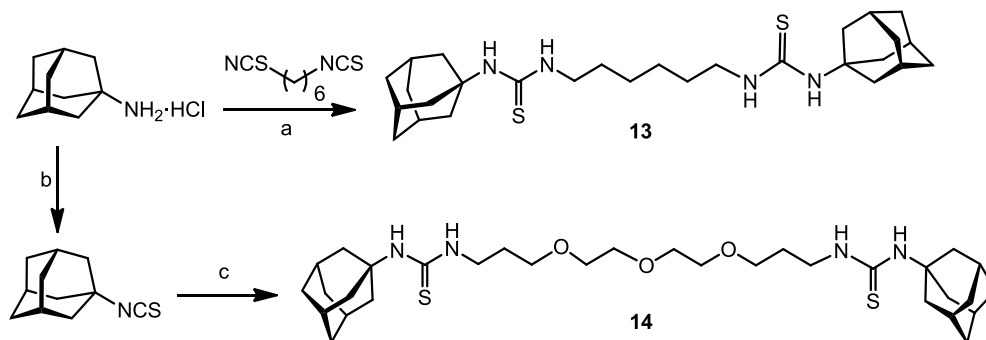
Como sistema modelo para el estudio del efecto de la pre-funcionalización supramolecular con dímeros de adamantano hemos escogido el derivado de β CD homogéneamente funcionalizado con grupos cisteaminilo en la cara primaria **148**, que se puede obtener a partir de la β CD comercial en dos etapas y con elevados rendimientos.² Por otra parte, aprovechando la disponibilidad comercial de varios derivados de adamantano, se abordó la preparación de ligandos ditópicos en los que los grupos adamantilo se encuentran unidos a través de espaciadores de diferente longitud para ser analizados como huéspedes que favorezcan la formación de complejos de estequiometría definida 2:1 CD:huésped.

Los dímeros **9**, **10**, **11** y **12**, que incorporan grupos amida en el espaciador, se prepararon a partir del cloruro de 1-adamantanocarboxilato mediante reacción con 1-adamantanilamina (\rightarrow **9**), 1,2-etilendiamina, (\rightarrow **10**), 1,3-propilendiamina (\rightarrow **11**) ó 1,6-hexilendiamina (\rightarrow **12**) con excelentes rendimientos (Esquema 6.1).

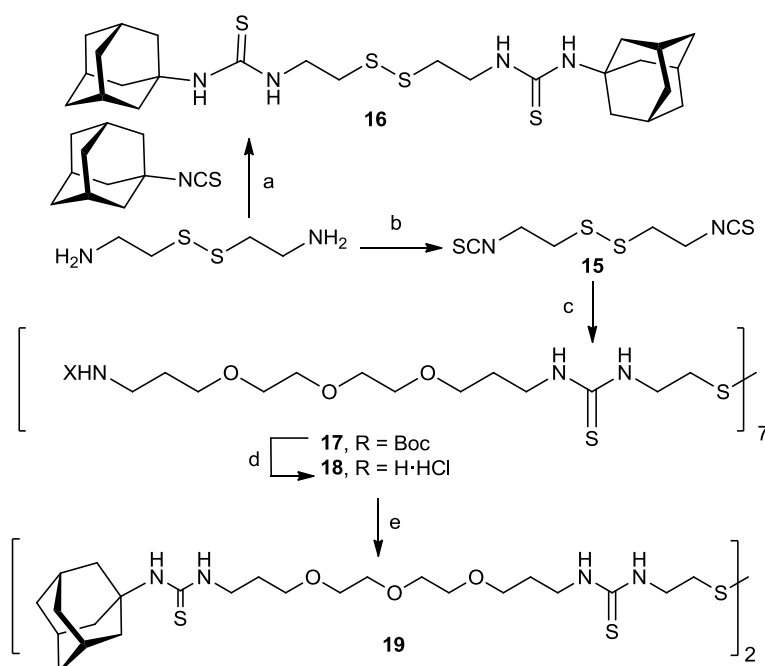


Esquema 5.1. Síntesis de los derivados de bis-adamantano **9**, **10**, **11** y **12**. Reactivos y condiciones: (a) Hidrocloruro de adamantanilamina, DIPEA, DCM, t.a., 2.5 h, 87%; (b) $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ (\rightarrow **10**), $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ (\rightarrow **11**), $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$ (\rightarrow **12**), DIPEA, DCM, t.a., 2.5 h, 96-99%.

El derivado de bis-adamantano **13**, que incorpora la función tiourea, se preparó por acoplamiento nucleofílico de la 1-adamantilamina comercial con 1,6-hexametilendiisotiocianato³ en diclorometano con un rendimiento del 86%. Además, con objeto de aumentar la solubilidad en agua y prevenir las interacciones de tipo no específico, se incorporó una cadena de trietilenglicol en el conjugado **14**, que se aisló con un rendimiento del 96% por reacción del 1-adamantilisotiocianato⁴ (preparado por isotiocianación de la 1-adamantilamina), con la 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (Esquema 6.2).



Esquema 5.2. Síntesis de los derivados de bis-adamantano **13** y **14**. Reactivos y condiciones: (a) DCM, 16 h, 86%; (b) CSCl_2 , Et_3N , DCM- H_2O 1:1, t.a., 3 h, 90%; (c) 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina, DCM, 16 h, 96%.



Esquema 5.3. Síntesis de los derivados de bis-adamantano **16** y **19**. Reactivos y condiciones: (a) Et₃N, CH₂Cl₂-H₂O 3:1, t.a., 16 h, cuantitativo; (b) CCl₄, CaCO₃, H₂O-DCM, t.a., 7 h, 96%; (c) *N*-*tert*-butoxi-4,7,10-trioxa-1,13-tridecildiamina, Et₃N, DCM, t.a., 16 h, 97%; (d) TFA- DCM 1:1, 1 h, 99%; (e) DCM, t.a., 16 h, 63%.

Con objeto de facilitar la disociación del ADN de los CDplejos tras la internalización celular, nos propusimos además incorporar en el espaciador elementos funcionales capaces de responder a estímulos, en particular enlaces disulfuro. Estos enlaces son sensibles al mayor potencial reductor en el citoplasma, debido a la elevada concentración de glutatión (aprox. 10 mM), lo que provoca su ruptura y la formación de los correspondientes tioles. En principio, esto debe desestabilizar la nanopartícula y promover la liberación de la carga. Para examinar esta hipótesis, hemos preparado derivados de cistamina, el disulfuro de la cisteamina. Así, el acoplamiento de la cistamina con el 1-adamantilisotiocianato condujo a **16** con rendimiento cuantitativo. Por otro lado, se abordó la isotiocianación de los grupos amino de la cistamina (\rightarrow **15**), seguida de

incorporación de la cadena de trietilenglicol (\rightarrow **17**), desprotección ácida de los grupos carbamato y acoplamiento nucleofílico posterior con el 1-adamantilisotiocianato, lo que permitió aislar **19** con un 65% de rendimiento (Esquema 5.3). Las estructuras de los derivados sintetizados se confirmaron mediante ^1H y ^{13}C RMN, espectrometría de masas (ESI MS) y análisis elemental.

5.2.2. Estudios de los complejos de inclusión por ^1H RMN y fluorescencia.

Previamente al estudio de formación de complejos supramoleculares de la serie de derivados de bis-adamantano con la per(C-6)cisteaminil β CD **148**, hemos confirmado su capacidad como receptor para formar en medio acuoso un complejo de inclusión con la sonda fluorescente 6-(*p*-toluidino)-2-naftalenosulfonato (TNS, Figura 5.2).⁵ Se ha escogido la fluorescencia como técnica para este estudio porque es sencilla, tiene una alta sensibilidad y permite estudiar sistemas con constantes de asociación elevadas (hasta 10^7 M^{-1}). La sonda TNS incrementa su intensidad de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$) de manera considerable al pasar de un medio polar a uno hidrofóbico, como es el interior de la cavidad de la ciclodextrina. Los experimentos de valoración por fluorescencia nos han permitido determinar la constante de la asociación para una estequiometría 2:1 CD:TNS ($K_{\text{as}2:1} = 9.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-2}$). Para ello se registraron espectros de fluorescencia en la región entre 390 y 650 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$) de una disolución acuosa de TNS a concentración fija de $10 \mu\text{M}$, a la que se fueron añadiendo alícuotas sucesivas de per(C-6)cisteaminil β CD hasta saturación de la disolución. Se representó la variación de intensidad de emisión de fluorescencia respecto a la intensidad obtenida para la muestra que contenía solo TNS, a 460 nm (máximo de emisión) frente a la concentración de CD, y el ajuste por mínimos cuadrados de los datos experimentales permitió determinar la constante de asociación del complejo (Figura 5.3).

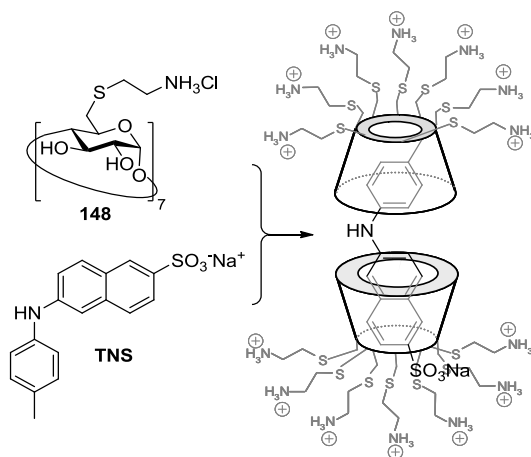


Figura 5.2. Estructuras de la per(C-6)cisteaminil- β CD **148** y de la sonda TNS y representación esquemática del complejo **148**:TNS de estequiometría 2:1.

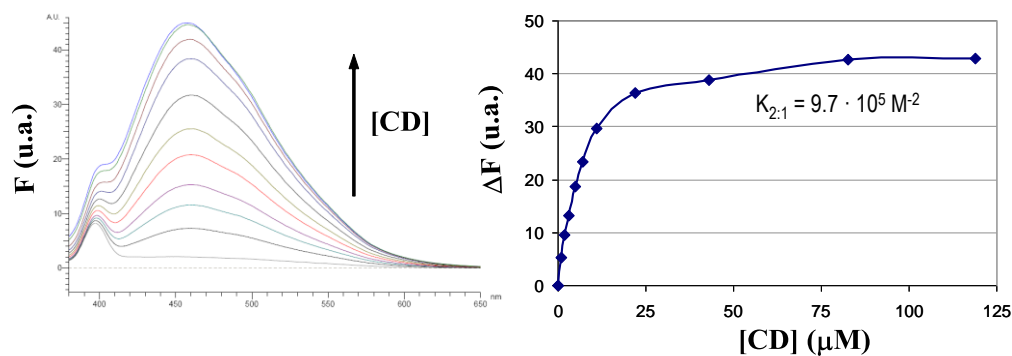


Figura 5.3. Espectros de fluorescencia (izquierda) e isoterma de asociación (derecha) para el complejo 2:1 **148**:TNS:**148** ([TNS] = 10 μ M) con indicación de la constante de asociación ($K_{as(2:1)}$) y de la estequiometría.

Los derivados de bis-adamantano **9-14**, **16** y **19** fueron diseñados, para ser insolubles en agua, de modo que sólo puedan encontrarse en disolución cuando formen un complejo de inclusión con el derivado de β CD. Así, la solubilización completa de los derivados de bis-adamantano requirió una proporción molar receptor-huésped 2:1. La formación de los complejos se llevó a cabo a partir de una disolución de CD **148** y

derivado de bis-adamantano (**9-14**, **16** y **19**), en relación molar 2:1, en acetona-agua 1:1, que se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La posterior evaporación de la acetona y liofilización de la disolución acuosa resultante condujo a la obtención de los correspondientes complejos de inclusión, que fueron redisoluertos en D₂O para su estudio y caracterización por ¹H RMN. La solubilidad de las muestras en agua sugiere la total complejación del dímero de adamantano.

Los espectros de ¹H RMN de las disoluciones en D₂O de los complejos **148**:bis-adamantano preparadas según el procedimiento indicado anteriormente, confirmaron la estructura dimérica con estequiometría 2:1 en la que los grupo adamantilo se encuentran en el interior de la cavidad hidrófoba de las dos unidades de ciclodextrina policatiónica. Los espectros mostraron desplazamientos a campo alto de los protones H-3 y H-5 del derivado de βCD **148**, orientados hacia el interior de la cavidad, tras la adición del huésped. En la Figura 5.4. se muestra la comparación de los espectros de ¹H RMN del derivado **148**, del complejo 2:1 de **148** con el derivado **11**, y de una disolución de **148** saturada en **11**.

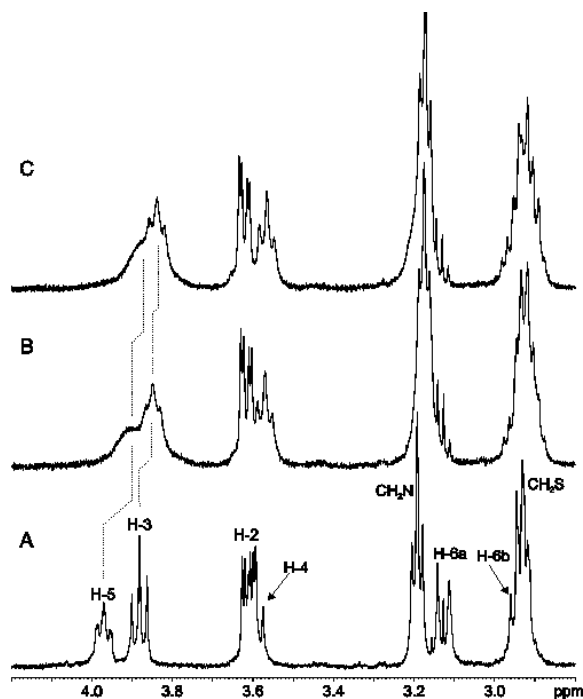


Figura 5.4. Comparación de los espectros de ^1H RMN del derivado de βCD **148** (A), el complejo 2:1 con el dímero de adamantano **11** (B), y una disolución saturada de **148** saturada en **11** (C).

Los espectros de ^1H RMN de todas las formulaciones **148**-bis adamantano (**9**, **10**, **11**, **12**, **13**, **14**, **16** y **19**) mostraron un comportamiento similar, confirmando que, en todos los casos, se forman los complejos de inclusión de estequiometría 2:1 (ver Figura 5.5 para el complejo **148:14**).

y los protones de adamantilo ($H-\alpha$, $H-\beta$ y $H-\gamma$), y una señal menos intensa para el acoplamiento de los protones H-5 de la CD con los protones $H-\beta$ y $H-\gamma$. Estos datos no sólo confirman la proximidad en el espacio entre la cavidad de la CD y el fragmento de adamantano, sino que también indican que la inserción del huésped tiene lugar vía cara secundaria, como cabría esperar, ya que ésta presenta mayor diámetro y menor impedimento estérico, y la repulsiones electrostáticas tras la formación del dímero son menores que si la complejación tuviese lugar por la cara primaria.

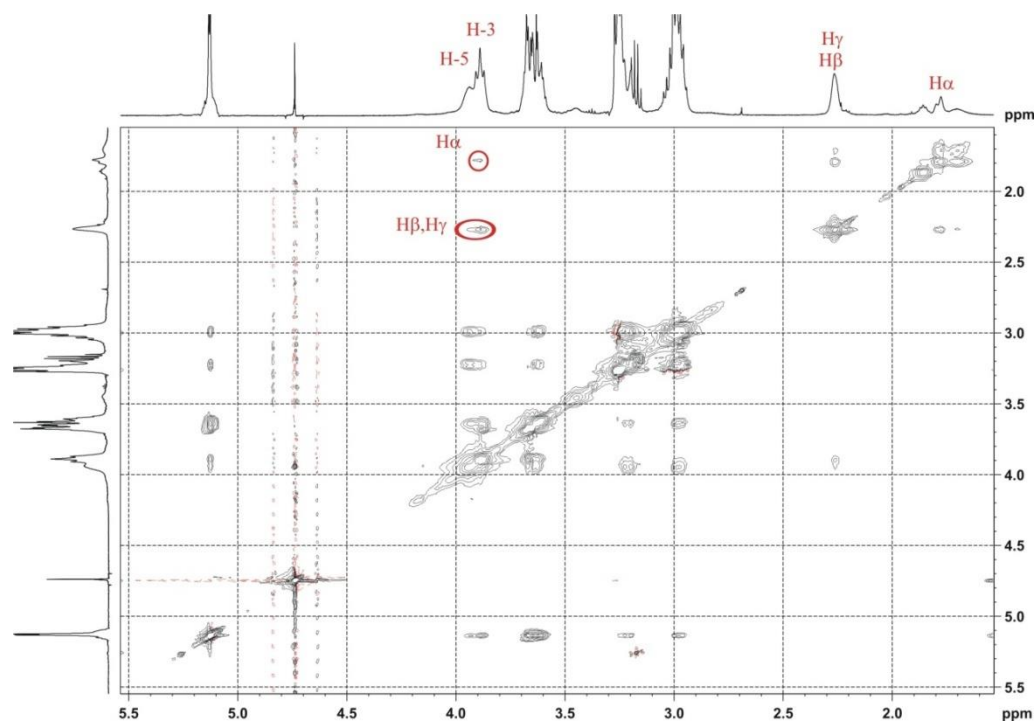


Figura 5.6. Espectro NOESY del complejo **148:14**, en D_2O , con un tiempo de mezcla de 400 ms.

5.2.3. Estudios de la variación de pKa de los complejos CD:bis-adamantano.

Para estudiar la estabilidad de los complejos CD:bis-adamantano a pH variable, se hicieron valoraciones por ^1H RMN (500 MHz) para el derivado **148** y para el complejo con **148:14**. El método se basa en la dependencia de desplazamiento químico de las señales de los protones con el pH debido al diferente apantallamiento de dichos núcleos en diferentes estados de ionización de la molécula. La valoración se llevó a cabo a 25 °C, en un rango de pH entre 3 y 12. Se emplearon disoluciones en 19:1 H_2O - D_2O , conteniendo HCl (10 mM) y NaCl (100 mM). Tras registrar el espectro inicial, se añadieron alícuotas de una disolución de NaOH 10 mM que contenía **148** o el complejo **148:14**, a concentraciones 2 mM de **148**, y NaCl (100 mM), de modo que las concentraciones de CD y bis-adamantano y la fuerza iónica se mantuvieron constantes durante todo el experimento. Los espectros registrados a diferentes valores de pH mostraron que la señal de H-5 de la CD es la que presenta una mayor variación de desplazamiento químico, por lo que se empleó para representar el perfil de $\Delta\delta$ (H-5) frente a pH (Figura 5.7).

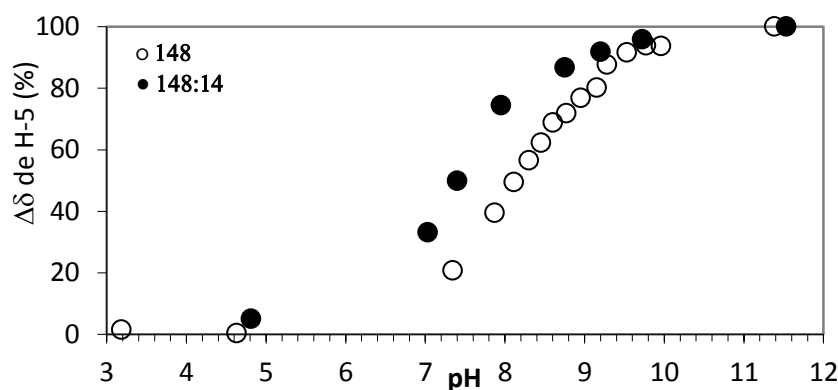


Figura 5.7. Desplazamiento de la resonancia de H-5 del derivado **148** (●) y del complejo **148:14**, estequiometría 2:1 (○) frente a pH en una disolución 19:1 H_2O - D_2O , 0.1 M NaCl, a 298 K.

Se observó una disminución en 0.5 unidades del valor de pKa aparente del complejo **148:14** (pKa = 7.8) en comparación con el derivado **148** (pKa = 8.3). Aunque esto no demuestre una variación en la constante de asociación, la modificación del equilibrio de protonación de la CD podría justificar la disociación del dímero cuando se produce una acidificación del medio.

5.2.4. Estudio de la termodinámica de complejación por ITC.

Con objeto de completar los resultados obtenidos mediante RMN y las predicciones teóricas obtenidas por Mecánica Molecular y Dinámica molecular, nos hemos planteado el estudio de los parámetros termodinámicos asociados a la formación de los complejos CD:bis-adamantano mediante valoración por microcalorimetría (ITC *Isothermal Titration Calorimetry*). Para ello se empleó un microcalorímetro 5300 Nano-ITC III modelo CSC, capaz de detectar el calor generado o absorbido resultante de la interacción entre moléculas. Consta de una celda de referencia, que contiene la misma disolución que la celda de la muestra, a excepción de los reactivos (en nuestro caso, DMSO en agua MilliQ, al 2% en volumen), la celda de la muestra, que contiene la disolución del derivado de bis-adamantano agitada mecánicamente, y un inyector que contiene la disolución de CD **148**. Inicialmente, ambas celdas se encuentran a la misma temperatura (25 °C), y la adición de una alícuota de CD de volumen conocido sobre la celda de la muestra implica la emisión o absorción de calor, que hará que la temperatura de dicha celda varíe respecto a la temperatura de la celda de referencia. El sistema aplicará la diferencia de potencial necesaria para que la diferencia de temperatura entre las celdas vuelva a ser cero, y esa energía aplicada es proporcional al calor generado o absorbido como consecuencia de las interacciones producidas entre las moléculas de la celda y las moléculas del inyector. La representación de la potencia (energía/ tiempo) frente al tiempo da el termograma del proceso, en el que se observa un pico para cada inyección. La integración del área de cada pico respecto al tiempo permite calcular la

energía absorbida o emitida en cada inyección, y la representación de dicha energía frente a la relación molar de las moléculas de la celda y el inyector resulta en una curva (isoterma de asociación) a partir de cuyo ajuste se puede determinar la constante de asociación (K), la estequiometría, la variación de entalpía del proceso (ΔH) y, a partir de estos valores, la variación de energía libre de Gibbs (ΔG) y la variación de entropía (ΔS). Una vez añadidos todos los equivalentes necesarios para saturar al derivado de bis-adamantano, el calor adsorbido o emitido será calor de dilución, que también se determina (ΔH_{dil}) y se resta al calor total del proceso para la determinación de ΔH de la complejación.

Los experimentos se llevaron a cabo en disolución acuosa (agua MilliQ) con un 2% de DMSO, ya que los derivados de adamantano son insolubles en agua. Mediante 1H RMN se confirmó que el complejo no se ve afectado cuando se añade DMSO en la proporción indicada. Se empleó la misma mezcla de disolventes para el derivado de adamantano y para la CD. Se prepararon disoluciones de derivados de bis-adamantano (**9**, **10**, **11**, **12**, **14**, **13**, **16** ó **19**) a 0.045 ó 0.09 mM y disoluciones de **148** a 1.4 ó 2.8 mM, respectivamente. Los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C, con inyecciones de 10 μL (excepto la primera inyección, que fue de 5 μL) de **148**, con un total de 25 inyecciones. En las Figuras 5.8. y 5.9 se muestran algunos ejemplos representativos de los termogramas e isotermas de asociación obtenidos para de los complejos CD:bis-adamantano.

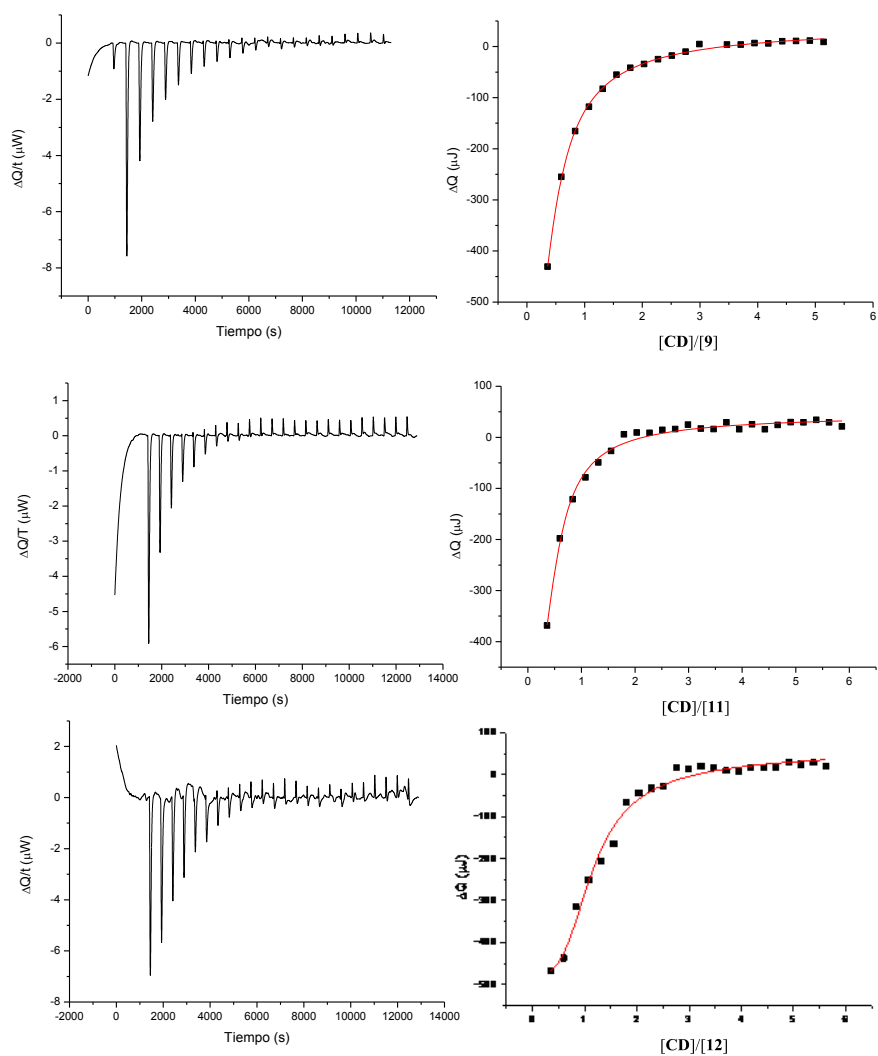


Figura 5.8. Termograma (arriba) e isoterma de asociación (abajo) de los derivados de bisadamantano (9, 11 y 12) y 148 (25 °C).

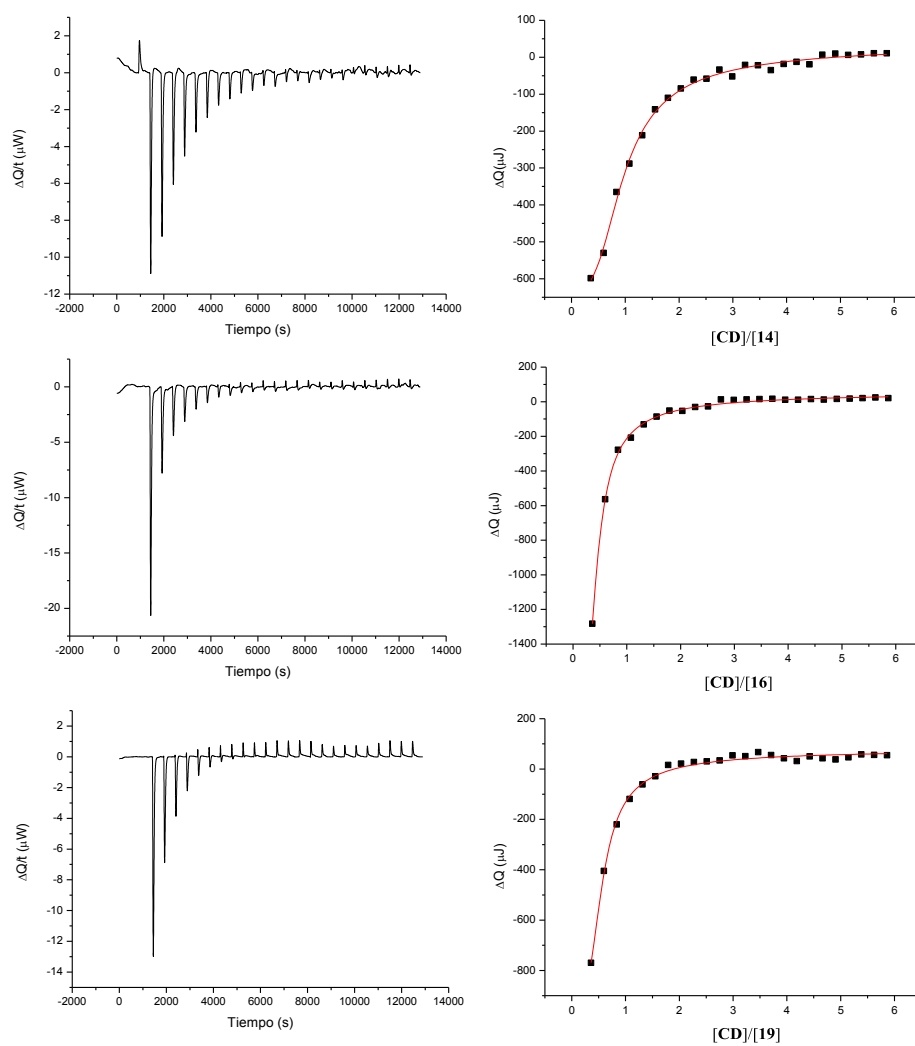


Figura 5.9. Termograma (arriba) e isoterma de asociación (abajo) de los derivados de bisadamantano (**14**, **16** y **19**) y **148** (25 °C).

Tabla 5.1. Parámetros termodinámicos de la interacción entre derivados de adamantano (**9**, **11-14**, **16** y **19**) y la CD **148** determinados por ITC a 25 °C.

Complejo	ΔG (KJ·mol ⁻¹)	ΔH (KJ·mol ⁻¹)	T· ΔS (KJ·mol ⁻¹)	K (M ⁻²)	N
148:9	-25.3	69.2 ± 1.2	94.5	(2.8 ± 0.2) · 10 ⁴	2.02 ± 0.02
148:11	-27.1	45.9 ± 1.1	73.3	(5.8 ± 0.7) · 10 ⁴	1.78 ± 0.03
148:12	-28.0	22.3 ± 1.0	50.3	(6.1 ± 1.8) · 10 ⁴	1.88 ± 0.02
148:13	-25.5	66.6 ± 2.0	92.2	(2.9 ± 0.3) · 10 ⁴	1.73 ± 0.03
148:14	-27.2	57.0 ± 1.3	84.2	(5.9 ± 0.6) · 10 ⁴	1.99 ± 0.03
148:16	-26.2	81.3 ± 0.5	107.5	(3.9 ± 0.2) · 10 ⁴	2.30 ± 0.02
148:19	-26.8	41.1 ± 0.5	67.9	(4.9 ± 0.5) · 10 ⁴	1.70 ± 0.02

Los parámetros termodinámicos derivados de estas curvas se recogen en la Tabla 5.1. En todos los casos se observó que el proceso de complejación está dirigido entrópicamente, de manera que a pesar de ser endotérmico ($\Delta H > 0$) está favorecido termodinámicamente ($\Delta G < 0$). Este efecto podría explicarse por el hecho de que la inclusión del derivado de adamantano en la cavidad de la CD implica la liberación de moléculas de agua que aumentan así su movilidad. La entalpía de dilución fue negativa en todos los casos y se confirmó la estequiometría 2:1, tal y como predijeron los experimentos de RMN. La constante de asociación fue del orden de 10⁴ M⁻² en todos los casos. La representación de la isoterma de asociación exhibió un perfecto ajuste a la curva de la ecuación empleada para realizar los cálculos, con errores muy pequeños. Esta tendencia se observó en todos los casos, tal y como se muestra en la Figura 5.8. Sólo en el caso del complejo de **148** con **10**, el derivado de bis-adamantano con dos grupos metileno en el espaciador de tipo diamida, fue imposible llevar a cabo el estudio de ITC. Incluso a concentraciones cien veces menores que las empleadas en el resto de los experimentos y con porcentajes de DMSO superiores al 2%, la baja solubilidad de este compuesto impidió la realización del experimento. A pesar de que sólo presenta un grupo metileno más que **9** y un grupo metileno menos que **11**, que sí fueron solubles en mezclas de agua con un 2% de DMSO, la distancia que presenta el derivado **10** entre los dos grupos amida

probablemente hace que se formen enlaces de hidrógeno intermoleculares que impiden su solubilización. El compuesto **10** sólo se encuentra en disolución cuando está complejoado por la CD, lo que sí permitió su estudio por RMN, tal y como se indicó en el apartado anterior.

Todos los derivados estudiados por ITC presentaron valores de ΔG , ΔH , ΔS y K del mismo orden, lo que implica que la complejación de todos los derivados es similar desde el punto de vista termodinámico, y que todos son, en principio, adecuados para emplearse como agentes transportadores de ADN.

5.2.5. Estudios teóricos de las propiedades de asociación de los sistemas ternarios CD:bis-adamantano y de sus interacciones con ADN mediante modelización molecular y dinámica molecular.

En colaboración con el Prof. Francisco Mendicuti de la Universidad de Alcalá de Henares, se ha llevado a cabo un estudio teórico basado en cálculos computacionales de mecánica molecular (MM) y dinámica molecular (DM), de la interacción de la β CD policatiónica **148** y el derivado de bis-adamantano **13** en el complejo 2:1 y de la interacción entre este complejo supramolecular y el ADN, empleando el programa Sibyl X-2.0 y el campo de fuerzas Tripos.⁶ Como modelo de ADN se empleó un fragmento de tipo ADN-B de doce nucleótidos, con una secuencia CGCAATTTCGGG.

En primer lugar se llevó a cabo el estudio en agua y en ausencia de ADN para, posteriormente, utilizar la estructura optimizada del complejo 2:1 CD:bis-adamantano para evaluar su comportamiento en presencia del ácido nucleico. El primer paso consistió en la modelización por mecánica molecular para predecir la geometría y la energía de los sistemas objeto de estudio y determinar las estructuras de mínima energía de interacción (MBE, *Minimal Binding Energy*). Partiendo de dichas estructuras optimizadas se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular, con trayectorias de 1 ns siguiendo las mismas estrategias que se emplearon para los derivados de xilileno.⁷

Estudio del complejo de inclusión CD:bis-adamantano en ausencia de ADN.

Mecánica Molecular

Inicialmente se estudió por mecánica molecular (MM) la formación del complejo **148:13** de estequiometría 2:1 y su estabilidad en agua. Para ello, el centro de masas del derivado **13** se situó en el origen de un sistema de coordenadas y se orientó a lo largo del eje y . A continuación, se dispusieron dos moléculas de **148** en el sistema de coordenadas, haciendo coincidir el eje y con el eje de simetría de las CDs, y se estudió la aproximación de dichas moléculas al derivado de adamantilo, empleando una orientación de las CDs en la que las caras secundarias de los macrociclos se encuentran enfrentadas (cabeza-cabeza), orientación que previamente se había determinado como la más favorable.

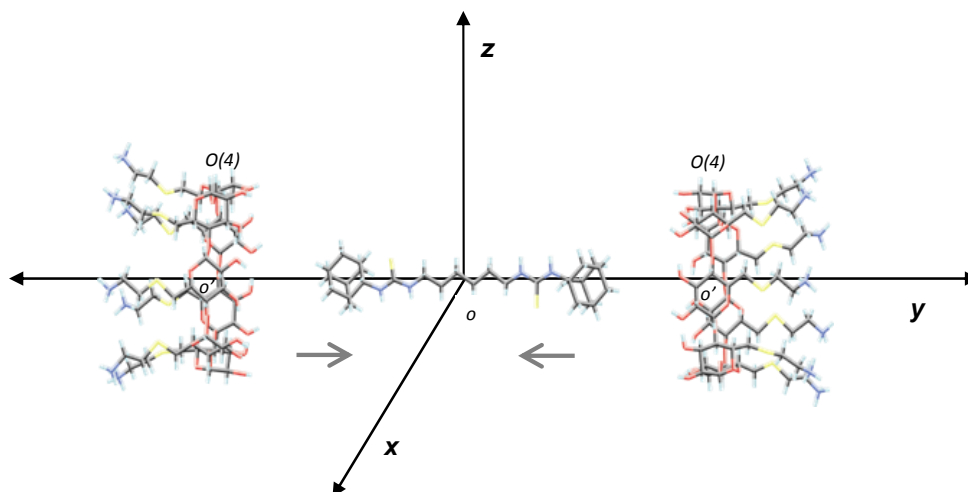


Figura 5.10. Sistema de coordenadas empleado para estudiar la aproximación de las moléculas de β CD **148** al derivado de bis-adamantano **13**.

En la Figura 5.10 se representa el proceso descrito, donde se indican el origen del sistema de coordenadas (o) y el centro de masas de las moléculas de CD (o'). Se generaron estructuras haciendo un barrido de distancias oo' desde 35 Å hasta 5 Å, a

intervalos de 5 Å, que posteriormente fueron solvatadas en agua y optimizadas para analizar sus geometrías y energías. Con respecto a la carga de las moléculas, se estudió la estructura en la que todos los grupos amino están protonados (con carga +1) y también aquella en la que todos los grupos amino presentan carga cero. En la Figura 5.11 se han representado los resultados, obtenidos por mecánica molecular, de la energía total de interacción de las moléculas implicadas en el sistema objeto de estudio (y de las contribuciones de energía de van der Waals y energía electrostática) en función de la distancia entre los centros de masas CD-CD cuando se produce su aproximación al derivado de bis-adamantano **13**. Los paneles superior e inferior se corresponden con las estructuras donde las CDs tienen carga neta +7 y 0, respectivamente.

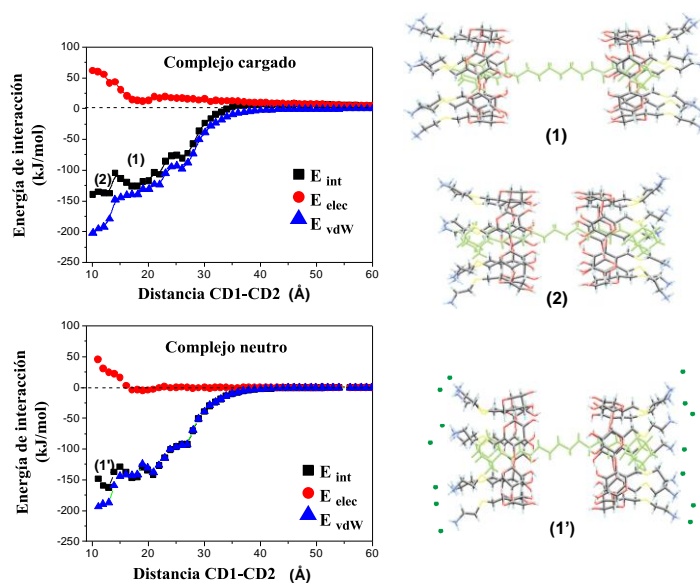


Figura 5.11. Energías de interacción de los complejos 2:1 CD:bis-adamantano **148:13**, en función de la distancia CD-CD para el complejo cargado (arriba) o neutro (abajo) y estructuras MBE correspondientes a los mínimos de energía **(1)** y **(2)** y **(1')**.

Los complejos con CDs cargadas y no cargadas presentan perfiles de energía bastante similares. En ambos casos se observa que la energía de interacción total (E_{int}) disminuye al disminuir la distancia CD—CD hasta alcanzar unos valores mínimos que se

corresponden con las estructuras más favorables (MBE). Para el complejo con carga (gráfica superior) los mínimos locales de energía se localizan a distancias CD—CD de 17 Å (1) y de 10 Å (2), y para el complejo sin carga (gráfica inferior) a 13Å (1'). Las estructuras MBE correspondientes a los puntos (1), (2) y (1') se han representado en la Figura 5.11 (derecha).

Tanto en el complejo cargado como en el complejo neutro, la principal contribución a la energía total de interacción (E_{ini}) es la energía de van der Waals (E_{vdw}). La energía electrostática (E_{elec}) apenas contribuye a la estabilización, con un valor prácticamente nulo hasta alcanzar la distancia CD-CD de 30 Å. Sin embargo, a distancias CD-CD por debajo de los 20 Å las interacciones electrostáticas adquieren un mayor peso y es menos favorable a medida que la distancia CD-CD disminuye, incluso para el sistema no cargado.

En conclusión, la presencia o no de cargas en las moléculas de **148** apenas tiene influencia en la estabilización del complejo 2:1 CD:bis-adamantano, siendo las interacciones de tipo van der Waals las principales responsables de la formación del trímero. El tamaño del espaciador entre los dos grupos adamantilo hace que las interacciones electrostáticas entre los derivados macrocíclicos sea casi despreciable, lo que es una propiedad deseable y contrasta con lo observado en los dímeros de derivados de CDs policatiónicas xililenadas estudiados en el capítulo 4, donde las pequeñas distancias CD—CD hacían que las repulsiones electrostáticas fuesen importantes, desestabilizando al dímero.

Dinámica Molecular

La estabilidad del complejo de CD:bis-adamantano se ha estudiado mediante cálculos de dinámica molecular (DM). Se hicieron simulaciones de 1 ns, partiendo de las estructuras MBE (**2**) para el complejo cargado y (**1'**) para el complejo neutro. En la Figura 5.12 se representan la distancia CD—CD y CD—bis-adamantano (izquierda) y las energías de interacción, total, electrostática y de van der Waals, frente al tiempo (derecha). En la gráfica de distancia frente a tiempo se observa que el complejo, tanto cargado como no cargado, mantiene una conformación similar a la inicial durante toda la trayectoria, con los fragmentos de adamantilo en el interior de la cavidad de la CD. Las energías de interacción también son favorables a lo largo de toda la simulación independientemente de si la CD está cargada o no. La energía de van der Waals es la que más peso tiene, siendo la contribución de la energía electrostática prácticamente nula en el caso del complejo neutro y desfavorable en el caso del complejo cargado, como consecuencia de la repulsión de cargas, lo que hace que la energía de interacción total sea menos favorable en el caso del complejo cargado. El conjunto de resultados obtenidos indican que el complejo es estable en la conformación estudiada, tanto en la forma cargada como en la neutra.

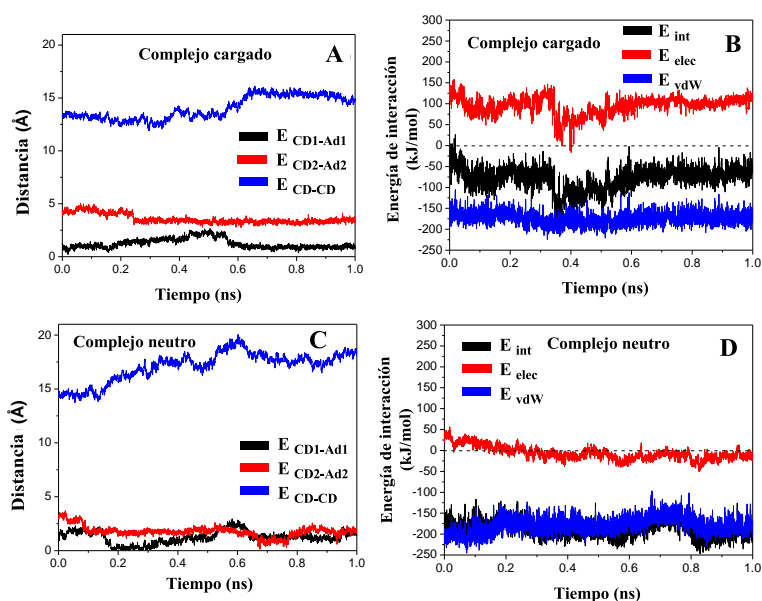


Figura 5.12. Historias de las distancias entre CDs y bis-adamantano para el complejo cargado (A) y neutro (C). Energías de interacción para los trímeros CD:bis-adamantano para el complejo neutro (B) y cargado (D).

Estudio de la interacción del ADN con el sistema CD:bis-adamantano.

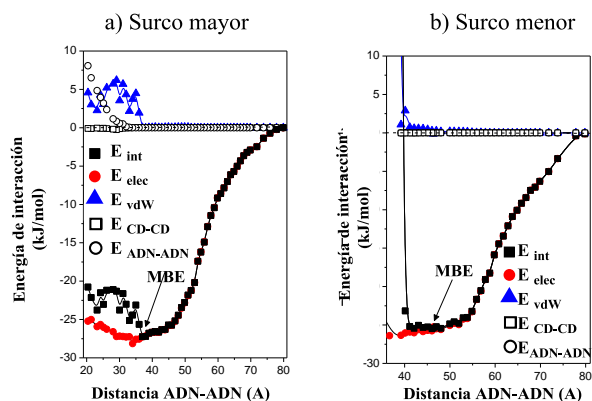
Mecánica Molecular

Para los estudios por MM de la interacción entre el trímero y el ADN, se partió de las estructuras MBE optimizadas previamente para el complejo CD:bis-adamantano (**1**) y (**2**), en las que las moléculas de CD están cargadas positivamente. En la Figura 5.13 se representa la energía de interacción total entre los fragmentos de ADN y el trímero (cuadros negros), así como las contribuciones electrostáticas (círculos rojos) y de van der Waals (triángulos azules), en función de la distancia ADN–ADN, para la aproximación simultánea de los dos fragmentos de ADN al complejo ternario situado en el origen del sistema de coordenadas. Se ha considerado la aproximación de los fragmentos de ADN

por el surco mayor o menor, y se han empleado las estructuras MBE **(2)** y **(1)**, respectivamente.

Las energías de interacción son negativas en ambos casos y disminuyen conforme se acorta la distancia ADN—ADN hasta alcanzar un valor mínimo, que es ligeramente más favorable en el caso de la aproximación por el surco mayor del ADN. Se han indicado con flechas los mínimos de energía. Las estructuras MBE **(A)** y **(B)** correspondientes se representan en la Figura 5.13 (abajo). Como se observa en la Figura 5.14, la energía electrostática constituye la principal contribución a la energía de interacción total y presenta un perfil muy similar a esta última. La contribución de van der Waals es prácticamente nula y sólo llega a ser importante y desfavorable para pequeñas distancias ADN—ADN (por debajo de 35 Å ó 40 Å, para la aproximación por el surco mayor o menor, respectivamente) como consecuencia del impedimento estérico entre el ADN y las moléculas de CD.

Las interacciones repulsivas también determinan el empaquetamiento ADN-dímero supramolecular para la estructura MBE en cada caso: el empaquetamiento parece ser más favorable cuando la CD interacciona con el surco mayor del ADN **(A)**, como se observa en la Figura 5.13 (abajo). Con respecto a las energías de interacción CD-CD, son prácticamente cero e independientes de la distancia ADN—ADN, como cabe esperar. Por otra parte, y a diferencia de lo que ocurre con CDplejos de dímeros de CDs xililenadas, presentados en el capítulo 4, la formación de estructuras en las que las dos cadenas de ADN puedan interactuar no se produce en este caso debido a la restricción que impone el tamaño del complejo ternario **148:13**.



MBE (A) (surco mayor, trímero MBE 2) MBE (B) (surco menor, trímero MBE 1)

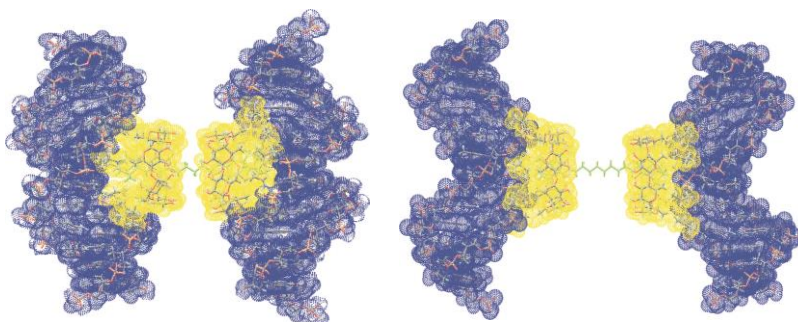


Figura 5.13. Energías de interacción para la aproximación del ADN al complejo **148:13** en función de la distancia ADN1-ADN2. La flechas indican los mínimos energéticos correspondientes a las estructuras MBE representadas en la parte inferior de la figura.

Dinámica Molecular

Las estructuras MBE (A) y (B), obtenidas por MM, se emplearon como puntos de partida para estudiar la estabilidad de los complejos supramoleculares con ADN mediante simulaciones de DM de 1 ns. En la Figura 5.14 (izquierda) se muestran distintos tipos de distancias frente al tiempo obtenidas en las trayectorias por DM del complejo [(CD)₂bisadamantano](ADN)₂ partiendo de dichas estructuras MBE. Se observa que ambas estructuras son bastante estables a lo largo de toda la trayectoria y algunas de las

distancias en las que está implicado el complejo ternario, como la interacción entre las dos moléculas de CD (CD1-CD2), entre cada molécula de CD y el ADN (CD1-ADN, CD2-ADN2) y entre la cada molécula de CD y el bis-adamantano (CD1-ADA y CD2-ADA) son prácticamente constantes a lo largo de toda la trayectoria.

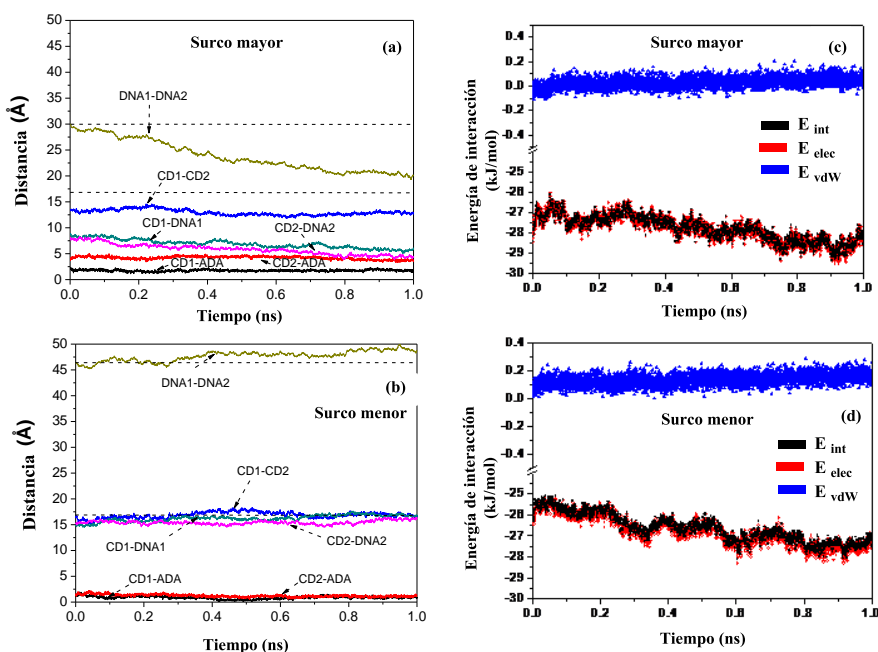


Figura 5.14. Izquierda: historias de diversas distancias obtenidas por DM para el sistema supramolecular de ADN con el complejo **148:13**. Derecha: Energías de interacción entre el complejo CD:bis-adamantano y el ADN, con aproximaciones por el surco mayor (A, C) o menor (C, D).

Las distancias entre los dos fragmentos de ADN, que es mucho mayor para el complejo en el que el ADN se aproxima por el surco menor, es casi constante a lo largo de toda la trayectoria en este caso (Figura 5.14, b). Sin embargo, como consecuencia del mejor ajuste del trímero al surco mayor del ADN, en este caso la distancia ADN1-ADN2 disminuye respecto al valor inicial de la estructura MBE (**2**) obtenida por MM (Figura 5.14, a). En la Figura 5.15 se representan las estructuras que se obtienen en la simulación

a lo largo del tiempo para el complejo donde la interacción se produce por el surco mayor del ADN, en la que se observa cómo los fragmentos de ADN tienden a rotar alrededor del eje para conseguir un mejor empaquetamiento y las caras primarias de las moléculas de CD, positivamente cargadas, interaccionan más estrechamente con los oligonucleótidos.

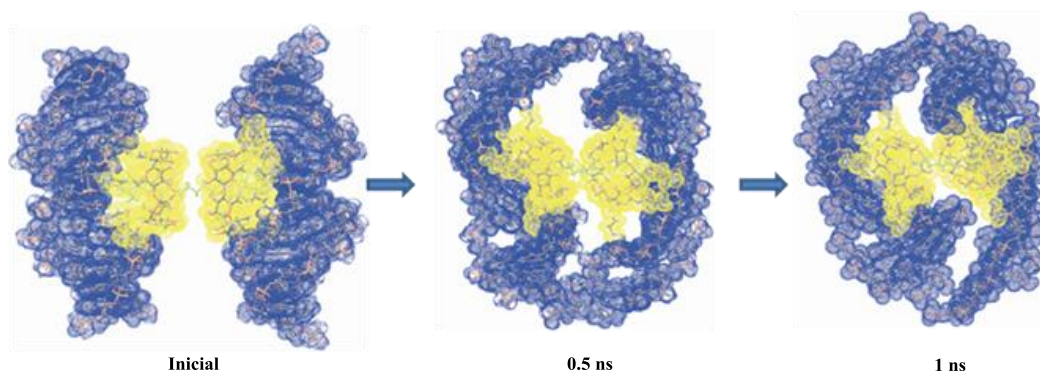


Figura 5.15. Imágenes instantáneas de la estructura del sistema ADN:148:13 inicial (izquierda), después de 0.5 ns (centro) y al final de la trayectoria de 1 ns (derecha) para una aproximación del ADN al trímero por el surco mayor.

En la Figura 5.14 (derecha) se muestran las historias de la energía de interacción total y de las contribuciones obtenidas del análisis de las trayectorias de 1 ns obtenidas por DM, para la aproximación del ADN por el surco mayor (a) y menor (b). Las interacciones son favorables y llegan a serlo en mayor medida al final de la trayectoria, observándose una menor energía en el caso del complejo de aproximación por el surco mayor como consecuencia de una mejor acomodación. Como se observó en los cálculos por MM, casi el 100% de las interacciones son de tipo electrostático. La energía potencial total, que no se muestra, también disminuye con el tiempo, confirmando la estabilidad de los complejos. En la Tabla 5.2. se recogen algunos parámetros geométricos y energéticos de las estructuras de los complejos al final de las trayectorias de DM.

Tabla 5.2. Distancias, energías de interacción y contribuciones energéticas para las MBE especies **148:13-ADN** obtenidas por MM y para las estructuras obtenidas al final de la trayectoria de DM, por aproximación del ADN por el surco mayor o menor.

Parámetro	<i>Surco</i> <i>mayor_{MBE}</i>	<i>Surco</i> <i>mayor_{Ins}</i>	<i>Surco</i> <i>menor_{MBE}</i>	<i>Surco</i> <i>menor_{Ins}</i>
Distancias (Å)				
<i>ADN1-ADN2</i>	30.7	20.0	46.3	48.7
<i>CD1-CD2</i>	10.7	13.0	18.1	16.8
<i>ADN1-ADA</i>	4.5	1.4	1.0	0.7
<i>ADN2-ADA</i>	4.0	3.7	0.7	1.4
<i>ADN2-CD1</i>	10.6	5.9	13.6	16.7
<i>ADN2-CD2</i>	9.5	4.4	14.6	16.2
Energía total ($10^3 \cdot \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	4.5	3.0	6.5	4.2
<i>Electrostática</i>	-3.1	-8.5	-2.3	-7.0
<i>van der Waals</i>	-1.3	-1.2	-1.1	-1.3
Energía de interacción ($10^3 \cdot \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)				
<i>(ADN)₂-trímero</i>	-27.2	-28.6	-25.5	-27.3
<i>Electrostática</i>	-27.2	-28.7	-25.8	-27.6
<i>van der Waals</i>	0.02	0.03	0.3	0.2
Energía de interacción ($10^3 \cdot \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)				
<i>ADN1-ADN2</i>	-0.00	1.8	-0.00	-0.02
<i>Electrostática</i>	0.00	1.8	0.00	0.00
<i>van der Waals</i>	-0.00	-0.0	0.00	0.00
<i>CD1-CD2</i>	0.02	0.2	0.02	-0.10
<i>Electrostática</i>	-0.00	0.2	0.02	0.03
<i>van der Waals</i>	-0.00	-0.0	0.00	-0.00

5.2.6. Estudios de interacción de los sistemas ternarios CD:bis-adamantano con ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, dispersión dinámica de la luz (DLS) y microscopía de transmisión electrónica (TEM).

Electroforesis en gel de agarosa.

Los estudios de complejación y transfección se llevaron a cabo en colaboración con la profesora Conchita Tros de Ilarduya, de la Universidad de Navarra. Con objeto de determinar si los complejos CD-adamantano preparados son capaces de complejar y proteger el pADN, se prepararon los correspondientes complejos de las nanoestructuras supramoleculares con el plásmido que codifica la luciferasa eFLuc (pCpG-hCMV-SPEC-eFLuc, 4640 pares de bases)⁸ y se llevaron a cabo experimentos de electroforesis en gel de agarosa valores de N/P 1-10 (según los casos), empleando Gel Red como agente intercalante. Las formulaciones se prepararon por adición, sobre una disolución del pDNA en HEPES (20 mM, pH 7.4), de la cantidad correspondiente de complejo CD-adamantano en agua, obtenidos según el procedimiento descrito en el apartado anterior.

En la Figura 5.17 se muestran los gels de agarosa obtenidos para los complejos de **148** con **14**, **13**, **16** y **19**. Se empleó, además, ADN plasmídico libre, una formulación de **148:19** con relación molar 1:1 (**19***), y una muestra de ADN y el vector sintético **149**, derivado de CD anfifílico policatiónico sintetizado en nuestro grupo de investigación, y que ha mostrado ser un excelente transportador de material génico tanto *in vitro* como *in vivo*.⁹

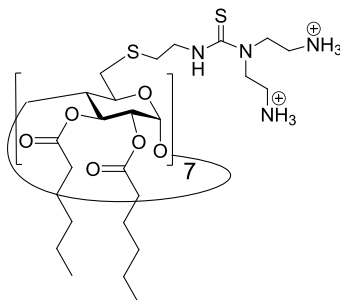


Figura 5.16. Estructura de la paCD **149** seleccionada como referencia para el estudio de transfección *in vitro*.

Los resultados mostraron que todos los derivados se comportaron como agentes complejantes del ADN a N/P 5 y 10, ya que no se observó movilidad electroforética en ninguno de los casos, a diferencia de lo observado para el ADN libre (Figura 5.17). Sin embargo, mientras que el derivado policationico no anfifílico **148** no es capaz de proteger el ADN, cuando **148** se encuentra formando parte de los complejos de inclusión con los dímeros de adamantano con estequiometría 2:1, el ADN queda protegido e inaccesible al agente intercalante, como denota la ausencia de fluorescencia en las calles correspondientes. Estas estructuras supramoleculares fueron tan eficientes en la complejación y protección del ADN como el derivado policationico anfifílico **149**.

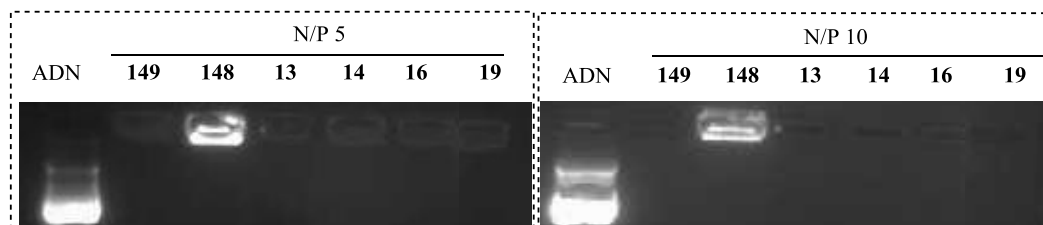


Figura 5.17. Electroforesis en gel de agarosa del complejo pADN-**148** y pADN-**149** y de los sistemas supramoleculares de pADN con **148:14**, **148: 13**, **148: 16** y **148: 19**, a valores de N/P 5 y 10 (abajo). Se empleó pADN libre como control negativo.

La formulación **148:19** con relación molar 1:1 (indicado en la Figura 5.18 como **19***), mostró un comportamiento similar al de la CD **148** en ausencia de derivado de bis-

adamantano: la movilidad electroforética nula implica una buena complejación del ADN pero la presencia de una señal fluorescente al UV indica que el agente intercalante puede acceder al material génico. Esto demuestra la necesidad de la existencia de un complejo CD-adamantano 2:1 que actúe como bicapa capaz de interaccionar con el ADN, compactarlo y protegerlo de manera eficiente.

Los complejos supramoleculares de **148** con el resto de derivados (**9**, **10**, **11**, **12**) fueron capaces de complejarse pero no de proteger totalmente al ADN plasmídico, tal y como demuestran los ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética mostrados en la Figura 5.18, por lo que se seleccionaron los complejos de **148** con derivados de tiourea (**14**, **13**, **16** y **19**) para continuar con su evaluación como vectores de genes.

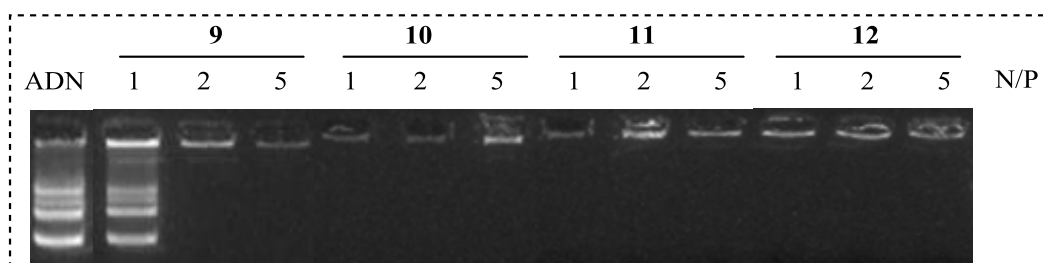


Figura 5.18. Electroforesis en gel de agarosa del complejo pADN -**148** y de los sistemas supramoleculares de pADN con **148:9**, **148:10**, **148:11** y **148:12**, a valores de N/P 1, 2 y 5. Se empleó pADN libre como control negativo.

Con el objeto de confirmar que el ADN plasmídico mantiene su integridad cuando se encuentra complejado por las nanoestructuras supramoleculares policationicas, se llevaron a cabo ensayos de protección de ADN frente a nucleasas en gel de agarosa. Para ello, los complejos preparados según se indicó anteriormente, a N/P 5 y 10, se trataron con nucleasas (1U/ μ g DNA) durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, se procedió a la inactivación de la enzima y se añadió dodecilsulfato sódico (SDS), con objeto liberar el ADN complejado y visualizarlo mediante electroforesis en gel de agarosa. Con efectos comparativos se empleó ADN libre tratado y sin tratar con nucleasas (Figura 5.19).

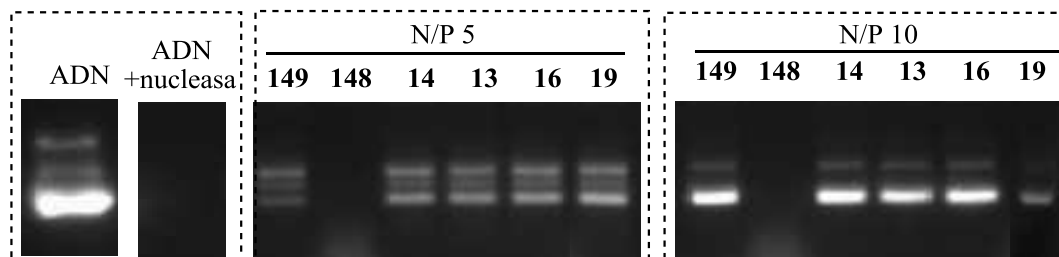


Figura 5.19. Ensayos de protección frente a nucleasas de los complejos formulados con pADN y **148**, **149** y con los sistemas supramoleculares **148:14**, **148: 13**, **148: 16** y **148: 19**, a N/P 5 y 10. Se empleó pADN libre sin tratar y tratado con nucleasas como referencia.

Los gels muestran que el ADN de referencia se degrada totalmente en presencia de la enzima y, por tanto, no aparece la señal en el pocillo correspondiente. El mismo resultado se observó en los casos en los que se empleó el derivado policatiónico no anfifílico **148** para complejar el ADN plasmídico indicando que el compuesto **148** compleja pero no protege el ADN por lo que resulta accesible al agente intercalante y a las nucleasas. Sin embargo, cuando se emplean las estructuras supramoleculares formadas entre **148** y los dímeros de adamantano **14**, **13**, **16** y **19**, en relación molar 2:1, el ADN está totalmente protegido, pues según se observa en la Figura 5.19, el material génico conserva su integridad tras el tratamiento con nucleasas y tras su descomplejación con SDS exhibe bandas idénticas al ADN libre sin tratar, confirmando las conclusiones extraídas de la Figura 5.19. Cuando no se cumple la estequiometría 2:1 del complejo CD-adamantano (**19***) no se consigue la protección del material génico y éste es degradado por nucleasas.

Estos resultados son especialmente relevantes pues la eficiencia de transfección de los derivados sintetizados requiere que protejan al ADN de su degradación por nucleasas hasta alcanzar el núcleo de la célula objetivo. El hecho de que los complejos **148**:adamantano sean altamente eficaces en la protección del ADN del medio externo a diferencia del derivado **148** en ausencia de dímero de adamantano corrobora la hipótesis inicial, según la cual la estructura formada entre la CD y los derivados de bis-adamantano favorece la compactación del material génico.

Determinación del diámetro hidrodinámico y el potencial ζ mediante medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS).

La determinación del diámetro hidrodinámico mediante medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS por sus siglas en inglés, *Dynamic Light Scattering*) mostró que las estructuras supramoleculares preparadas no sólo complejan y protegen el ADN sino que además lo compactan de una manera muy eficiente dando lugar a partículas con tamaños nanométricos y con pequeños índices de polidispersidad (PI), lo que indica una distribución de tamaños homogénea, ambas propiedades adecuadas para la internalización celular. Los bajos valores de desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado confirman la estabilidad de las muestras (Tabla 5.3, Figura 5.20).

Tabla 5.3. Diámetros hidrodinámicos, desviación estándar, índices de polidispersidad (PI) y potencial ζ , a N/P 5 y 10, de los complejos de ADN formulados con **149** y con los sistemas supramoleculares **148:13**, **148: 14**, **148: 16** y **148: 19**, con estequiometría 2:1.

Compuesto	N/P 5	PI	N/P 10	PI	Potencial ζ N/P 5 (mV)	Potencial ζ N/P 10 (mV)
149	180 ± 0.7	0.25	127 ± 0.79	0.22	15.0 ± 0.50	23.3 ± 1.74
148:13	152 ± 0.72	0.23	123 ± 1.42	0.22	17.7 ± 0.57	22.4 ± 0.4
148:14	134 ± 2.5	0.27	124 ± 0.45	0.18	18.5 ± 0.3	25,9 ± 0.21
148:16	145 ± 2.72	0.27	139 ± 6.9	0.27	14.6 ± 1.27	23.6 ± 0.45
148:19	137 ± 0.64	0.3	132 ± 4.5	0.3	13.7 ± 2.45	21.9 ± 0.21

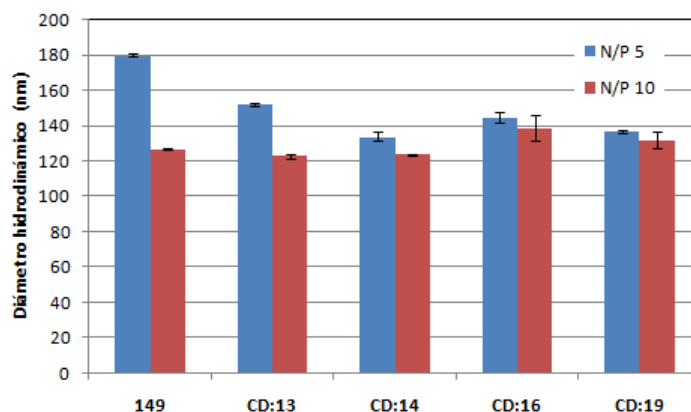


Figura 5.20. Diámetros hidrodinámicos de los complejos de ADN formulados con **149** y con los sistemas supramoleculares **148:13**, **148: 14**, **148: 16** y **148: 19**, con estequiometría 2:1.

Los valores obtenidos son del mismo orden que los del derivado **149**, vector sintético altamente eficiente en transfección de genes. Los ensayos se realizaron a N/P 5 y 10, y la tendencia general observada es que el tamaño de partícula tiende a ser inferior a N/P 10 respecto a N/P 5, como cabe esperar dado el mayor número de cargas positivas en el complejo cuando se incrementa el N/P, lo que aumenta la capacidad de condensación de ADN. No obstante, para los complejos formulados con **16** y **19**, el tamaño prácticamente no varía al aumentar la relación N/P, lo que puede significar que, en estos casos, a N/P 5 ya está condensado todo el ADN y que la compactación no puede mejorarse (y por tanto no puede disminuir el tamaño de los condensados) al aumentar la relación N/P. El compuesto **148**, en ausencia de derivado de bis-adamantano, no forma partículas nanométricas, lo cual demuestra su pobre capacidad de condensación de ADN.

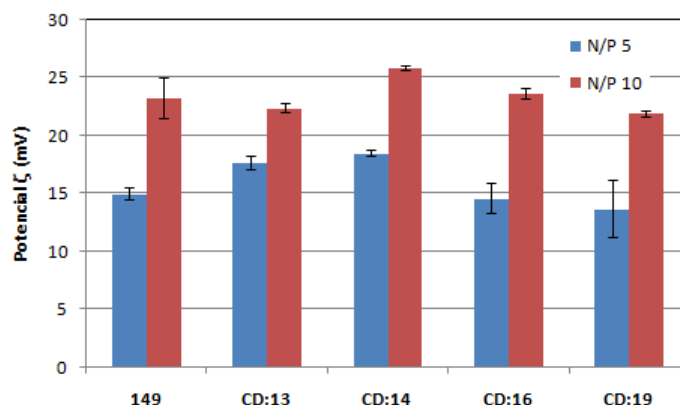


Figura 5.21. Valores de potencial ζ de los complejos de ADN formulados con **149** y con los sistemas supramoleculares **148:14**, **148: 13**, **148: 16** y **148: 19**, con estequiometría 2:1.

Los valores de potencial ζ , determinados por M3-PALS, (Tabla 5.3, Figura 5.21) fueron positivos en todos los casos (entre 15 y 26 mV), lo que indica que no existe ADN sin complejar (con carga negativa), corroborando así las conclusiones extraídas de los estudios por electroforesis. Además, la densidad de carga superficial positiva y elevada favorece la estabilidad de las nanopartículas, pues la repulsión de cargas evita la agregación de las nanoestructuras formadas. Los valores obtenidos son similares a los que presenta el vector usado como referencia, **149**. Al aumentar la relación N/P aumenta la densidad de carga superficial en todos los casos, dado el mayor número de cargas positivas que implica un incremento de la relación N/P.

Los estudios realizados hasta el momento indican que, mientras que el derivado de CD policatiónico y no anfifílico, **148**, no es capaz de complejar, proteger ni compactar el ADN, los complejos de estequiometría 2:1 que forma **148** con los derivados de bis-adamantano, previamente caracterizados por ITC y RMN, presentan propiedades similares al vector usado como referencia, **149**, en cuanto a la capacidad de condensación del material génico en nanopartículas estables así como su aislamiento del medio externo.

A la vista de los resultados obtenidos, nos propusimos llevar a cabo estudios de eficacia de transfección *in vitro*.

5.2.7. Eficiencia de transfección en células COS-7 y HepG2.

La eficacia de la transfección de los complejos formados se evaluó, en primer lugar, utilizando un gen reportero codificador de luciferasa eFLuc en células COS-7 (células de riñón de primate), empleando como control positivo el derivado **149**, pues se trata de uno de los vectores sintéticos más eficaces en transfección tanto *in vitro* como *in vivo*, superando a vectores policatiónicos comerciales ampliamente usados como referencias, como la polietilenimina lineal y ramificada. Los niveles de luciferasa expresada, indicativos de la cantidad de ADN transfectado, se determinaron por medidas de luminiscencia.

Los niveles de toxicidad se determinaron mediante el ensayo alamarBlue (Invitrogen). En el ensayo se emplea el poder reductor de las células vivas para cuantificar la proliferación de las mismas como una medida de viabilidad celular, aprovechando que las células vivas, a diferencia de las células muertas, presentan un citoplasma altamente reductor. El reactivo empleado es azul en su forma oxidada y, cuando entra en el citoplasma de células vivas, pasa a su forma reducida, fluorescente y de color rojo.

Los ensayos de transfección y de viabilidad se hicieron a relaciones N/P 5 y 10, pues estudios de movilidad electroforética, protección de ADN frente a nucleasas y DLS han demostrado que no se requieren mayores valores de N/P para conseguir complejar, proteger y condensar el ADN de manera eficiente. Además, para preservar la relevancia biológica de los resultados, todos los ensayos se realizaron en ausencia y en presencia de un 10% y de un 60% de suero (suero fetal bovino, FBS).

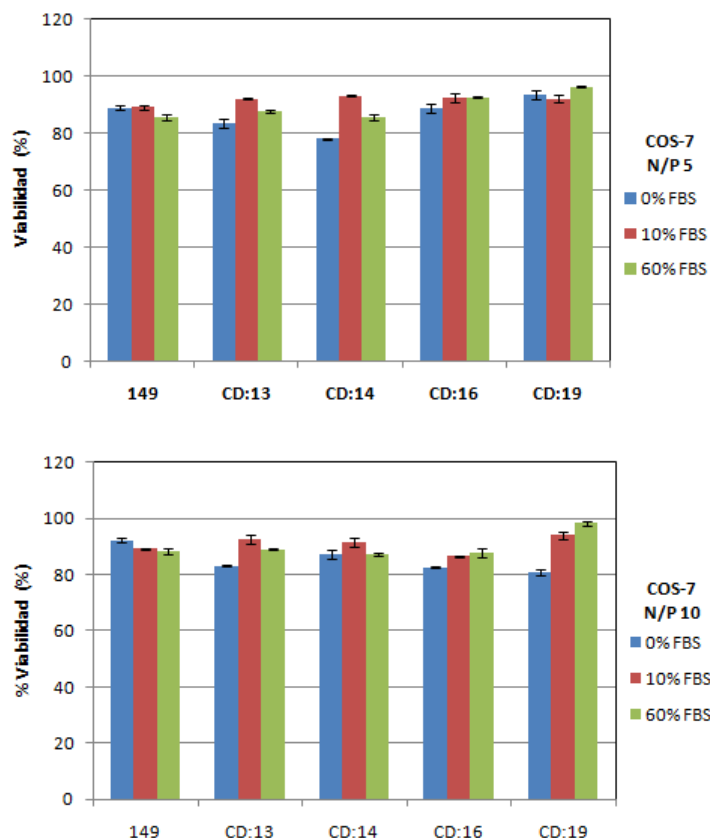


Figura 5.22. Viabilidad celular en células COS-7 de los complejos de ADN formulados con **149** y con los sistemas supramoleculares **148:13**, **148: 14**, **148: 16** y **148: 19**, a N/P 5 y 10, en ausencia y en presencia de FBS.

Los nanocomplejos formados por interacción entre el ADN plasmídico y los complejos supramoleculares de estequiometría 2:1 **148:13**, **148:14**, **148:16** y **148:19**, presentaron unos elevados niveles de viabilidad celular, próximos al 100% y en general superiores al 80% (Figura 5.22), tanto a N/P 5 como a N/P 10, mostrando un comportamiento similar al derivado de paCD **149**.

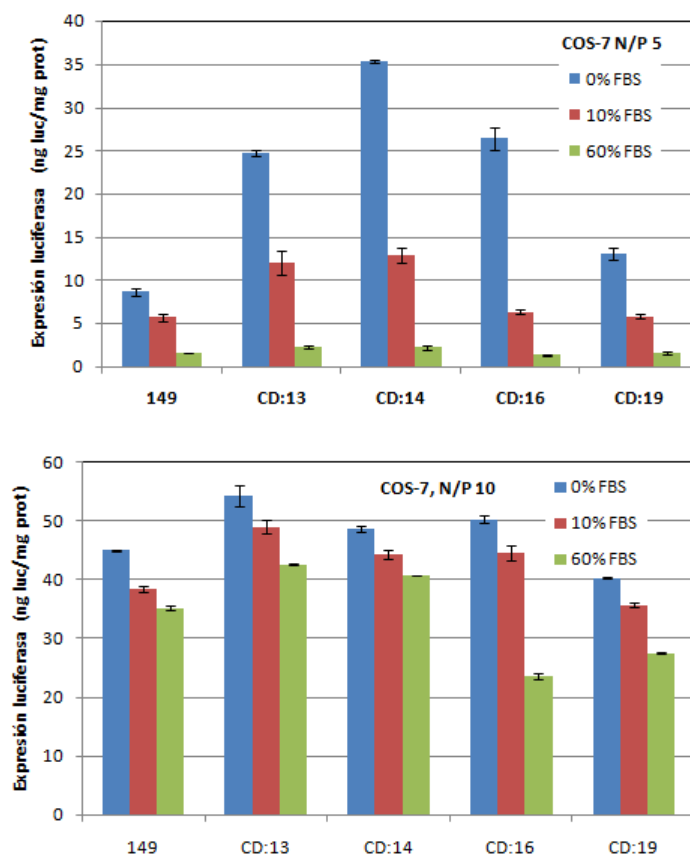


Figura 5.23. Eficacia de transfección en células COS-7 de los complejos de ADN formulados con **149** y con los sistemas supramoleculares **148:13**, **148: 14**, **148: 16** y **148: 19**, a N/P 5 y N/P 10, en ausencia y en presencia de FBS.

Los ensayos de transfección fueron igualmente satisfactorios (Figura 5.23). Se observó que las cuatro estructuras supramoleculares preparadas a partir de los derivados de bis-adamantano **13**, **14**, **16** y **19** transfectan mejor que el derivado de CD policatiónica anfifílica empleada de referencia, **149**, fundamentalmente con 0% y 10% de suero. Este hecho es especialmente relevante puesto que, los niveles de transfección alcanzados implican que los derivados preparados son vectores génicos altamente eficaces con un

coste sintético mucho menor al que requiere la obtención de ciclodextrinas funcionalizadas en las dos caras, como es el caso de **149**.

El aumento de la relación N/P supuso un aumento considerable de la eficacia de transfección, probablemente como consecuencia de una mejor condensación del ADN plasmídico cuando se emplean mayores cantidades de vector policatiónico, pero lo más importante es que esto ocurre sin que afecte a la toxicidad por que normalmente viene acompañada al aumento de concentración de vector policatiónico. El suero inhibe la transfección, y esa inhibición es muy acusada a relación N/P 5, pero a N/P 10 se mantuvieron unos elevados niveles de transfección incluso con 60% de suero, resultado de especial relevancia en vista a aplicaciones *in vivo*, pues existen numerosos vectores de genes descritos en la bibliografía que son altamente eficientes en ausencia de suero pero como consecuencia de su pérdida de actividad bajo condiciones biológicas son incapaces de promover la transfección en seres vivos.

A la vista de los excelentes resultados obtenidos en células COS-7, decidimos estudiar los derivados preparados en una línea celular de relevancia médica, células HepG2 de hepatoblastoma humano, para así evaluar el potencial de estos nuevos vectores en terapias contra el cáncer. Los ensayos se hicieron a N/P 5 y 10 y con cantidades variables de suero (0%, 10% y 60% FBS). A efectos comparativos, además del derivado policatiónico anfifílico de β CD, **149**, se empleó el vector polimérico policatiónico comercial polietilenimina (PEI), comúnmente empleado como referencia en ensayos de transfección. Todos los derivados estudiados mostraron niveles de viabilidad celular superiores al 90% bajo todas las condiciones estudiadas de valor de N/P y porcentaje de suero (Figura 5.24). Resulta especialmente importante el hecho de que los vectores preparados sean menos tóxicos que el polímero de referencia, PEI, considerado uno de los estándares en transfección génica.

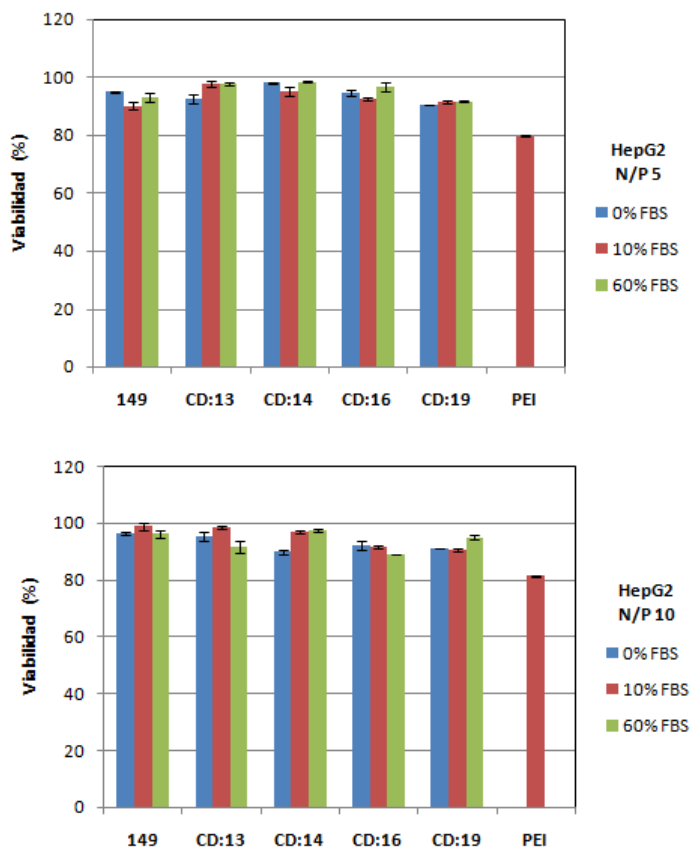


Figura 5.24. Viabilidad celular en células HepG2 de los complejos de ADN formulados con **149** y con los sistemas supramoleculares **148:13**, **148: 14**, **148: 16** y **148: 19**, a N/P 5 y 10, en ausencia y en presencia de FBS.

Los resultados de eficacia de transfección en células HepG2, que se muestran en la Figura 5.25, fueron incluso superiores, en la mayoría de casos, que en las células COS-7. Todos los derivados mostraron niveles de expresión de luciferasa muy por encima del vector policatónico de referencia, PEI, y del mismo orden (a N/P 10) o superiores (a N/P 5) que el derivado de CD **149**. La eficiencia de transfección no varía mucho al aumentar la relación N/P, lo que significa que las nanopartículas formadas a N/P 5 presentan las propiedades adecuadas para transfectar esta línea celular, y que un aumento de vector

policatiónico no se ve reflejado en una mejora considerable en las propiedades de transfección. El hecho de que los niveles máximos se alcancen a bajos niveles de N/P supone una ventaja desde el punto de vista comercial y toxicológico.

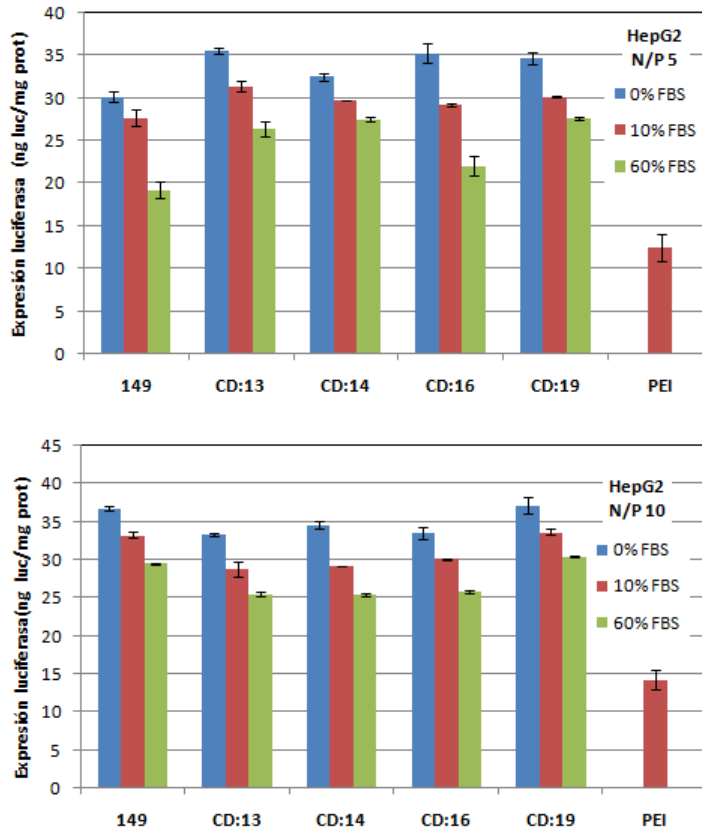


Figura 5.25. Eficacia de transfección en células HepG2 de los complejos de ADN formulados con **149** y con los sistemas supramoleculares **148:13**, **148: 14**, **148: 16** y **148: 19**, a N/P 5 y N/P 10, en ausencia y en presencia de FBS.

El efecto inhibitorio del suero no fue tan pronunciado como en el caso de las células COS-7, y se obtuvieron elevados niveles de transfección, por encima del control convencional bPEI, incluso con 60% de suero. Esto confirma que los compuestos preparados son especialmente adecuados para su empleo en ensayos *in vivo*.

5.3. Conclusiones.

Se han preparado una serie de nuevos vectores sintéticos basados en complejos ternarios entre dos moléculas de CD policatiónica no anfifílica y una molécula de derivado de bis-adamantano. Estos complejos supramoleculares, formados por la inclusión del fragmento de adamantano en la cavidad de la CD, como demuestran los estudios de RMN, son capaces de interactuar con el ADN y condensarlo de una manera eficaz para formar nanocomplejos donde el material génico queda protegido del medio externo, según indican los experimentos de electroforesis en gel de agarosa, de protección frente a nucleasas, DLS y cálculos teóricos por MM y DM. Los nanocomplejos transfectan células COS-7 y HepG2 con viabilidades celulares y niveles de transfección superiores al vector policatiónico de referencia, bPEI, y al derivado de CD policatiónico anfifílico **149**, que había mostrado hasta ahora los mejores resultados. Las propiedades superiores como transportadores de genes y su menor coste sintético hacen, de estos derivados, candidatos prometedores para su aplicación en ensayos *in vivo*, experimentos que se están llevando a cabo actualmente en colaboración con la Prof. C. Tros de Ilarduya.

Referencias

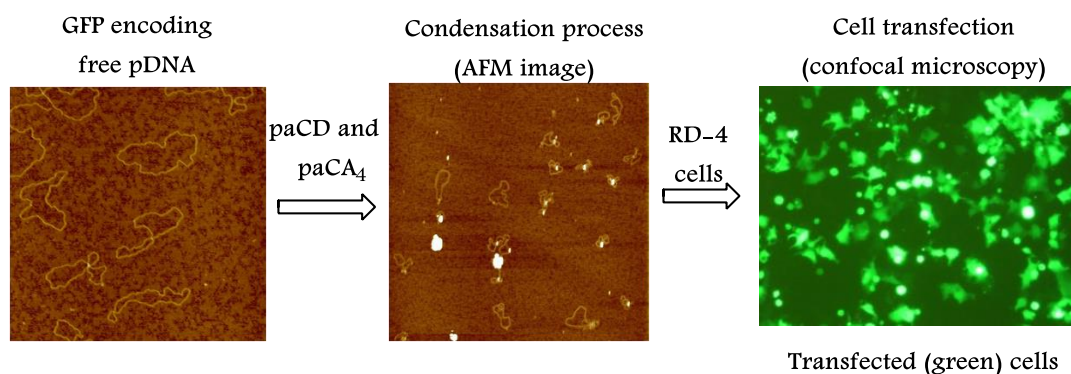
- ¹ M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875-1917.
- ² M. Gómez-García, J. M. Benito, D. Rodríguez-Lucena, J.-X. Yu, K. Chmusrki, C. Ortiz Mellet, R. Gutiérrez Gallego, A. Maestre, J. Defaye, J. M. García Fernández, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7970-7971.
- ³ G. Li, H. Tajima, T. Ohtani, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4539-4540.
- ⁴ H. Munch, J. S. Hansen, M. Pittelkow, J. B. Christensen, U. Boas, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3117-3119.
- ⁵ D. C. Turner, L. Brand, *Biochemistry* **1968**, *7*, 3381-3390.

-
- ⁶ a) Sybyl-X 2.0, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA; b) M. Clark, R. D. Cramer III, O. N. Van, *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 982-1012.
- ⁷ a) M. J. González-Álvarez, P. Balbuena, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13717-13729. b) M. J. González-Álvarez, J. Vicente, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 975-988.
- ⁸ T. Magnusson, R. Haasel, M. Schleef, E. Wagner, M. Ogris, *J. Gen Med.* **2011**, *13*, 382-391.
- ⁹ a) A. Díaz-Moscoso, L. Le Gourrirec, 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, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 12871-12888; b) A. Méndez-Ardoy, K. Urbiola, C. Aranda, C. Ortiz-Mellet, J. M. García Fernández, C. Tros de Ilarduya, *Nanomedicine* **2011**, *6*, 1697-1707.

Chapter 6

Comparative evaluation of self-assembled polycationic systems based on cyclodextrins and calixarenes as non viral gene vectors

Abstract: a new family of gene delivery systems based on monodisperse polycationic amphiphilic β -cyclodextrin (paCD) and calix[4]arene (paCA₄) derivatives has been synthesized. Amino-thiourea, amino-triazol, arginine and guanidine head groups have been installed in both scaffolds in order to assess the macrocycle effect in gene delivery properties and identify optimal candidates for specific therapeutical applications. GFP (Green Fluorescent Protein) encoding plasmid DNA condensation process has been followed by atomic force microscopy (AFM) and the nanocomplexes has been used to successfully transfect human Rhabdomyosarcoma (RD-4) cells, that could be observed by confocal microscopy after expressing GFP.



6. Comparative evaluation of self-assembled polycationic systems based on cyclodextrins and calixarenes as non viral gene vectors.

6.1. Introduction.

Cyclodextrins (CDs) and calixarenes (CAs) are suitable scaffolds for the generation of facial amphiphilicity through face-selective chemical functionalization. Notably, CD and CA polycationic amphiphilic derivatives can be conveniently built by installing segregated clusters of cationizable and hydrophobic groups at opposite rims in the macrocyclic cores. Both polycationic amphiphilic CDs (paCDs) and polycationic amphiphilic CAs (paCAs) have been shown to self organize in the presence of DNA to form nanocomplexes (CDplexes and calixplexes, respectively) capable of mediating transfection in several cell lines, generally with low toxicity profiles. The transfection efficiencies in each series varied as a function of the overall macromolecular architecture, especially on the nature of the multihead polycationic cluster. Thus, after evaluation of a broad collection of paCDs, our research group identified the C_7 -symmetrical β -cyclodextrin (β CD) derivative **149**, featuring a tetradecavalent dendritic display of aminothioureido branches at the primary positions and fourteen hexanoyl substituents at the secondary hydroxyls (Figure 6.1) as an optimal molecular vector for both *in vitro* and *in vivo* gene delivery.¹ As a matter of fact, aminoethylthiourea segments were encountered to be highly beneficial in paCD-based gene vector design, which was ascribed to the cooperative interplay of electrostatic and hydrogen bond interactions involving the corresponding ammonium and thiourea functionalities, respectively, with the phosphate groups in the oligonucleotide backbone.

In the paCA series, the research group of A. Casnati and F. Sansone (Univ. Parma, Italy) has recently reported the synthesis of polyarginine-calixarene conjugates as very efficient monodisperse gene vectors in a variety of cell lines, including the human Rhabdomyosarcoma (RD-4) cells, which present medical relevance and are difficult to be

transfected by established protocols and available formulations.² A representative of this family of compounds is the calix[4]arene (CA₄) derivative **150** (Figure 6.1), obtained by clustering arginine units onto the upper rim and hexylation of the phenolic OH groups at the lower rim of the cup-like CA₄ macrocycle in the cone conformation. The molecular design was inspired in the structure of arginine-rich peptides and oligoarginines that behave as cell-penetrating peptides (CPPs).

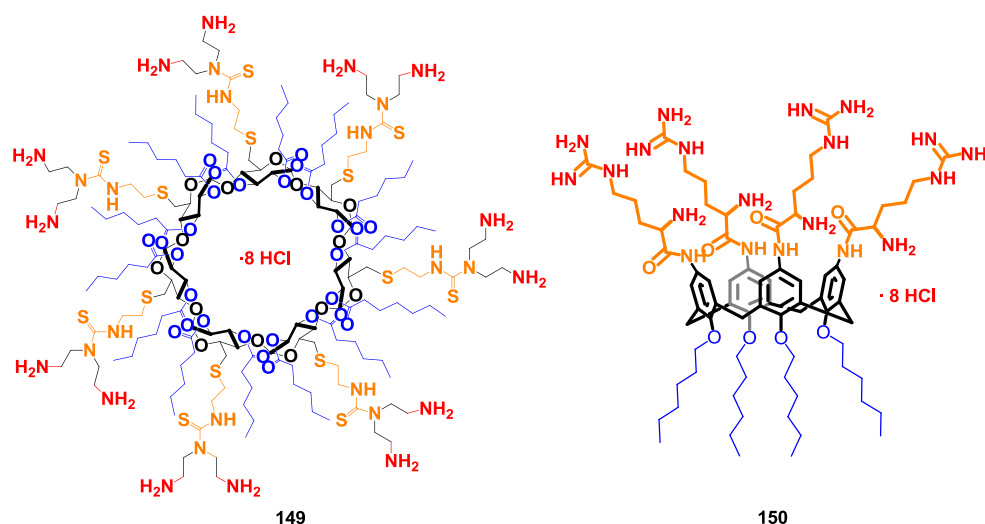


Figure 6.1. DNA synthetic vectors: aminothiurea βCD derivative (**149**) and arginino calix[4]arene derivative (**150**).

The ensemble of structure-transfection activity relationship studies previously reported with molecularly well-defined paCDs or paCAs by the above mentioned research groups were carried out in an independent manner. Different structural elements, experimental protocols and cell lines were used in each series, which prevents a direct comparison of their performance. In the context of the European COST action MultiGlycoNano, it seemed interesting to conduct a collaborative study in which the same structural elements would be incorporated into both the βCD and the CA₄ (cone conformation) scaffolds and the DNA complexation and cell transfection studies would be carried out in parallel. The aim of this project was to ascertain the influence of the

macrocyclic scaffold in the self-assembling properties of the polycationic facial amphiphiles and, eventually, foster the identification of optimal candidates for specific gene therapy applications. Towards this end, a new library of compounds has been now synthesized. Aminothiourea, guanidine, arginine, and triazol-arginine cationic heads with different presentation modes were considered (Figure 6.2), whereas the lipophilic domains have been maintained invariable and consist in fourteen hexanoyl ester groups for the CD derivatives and four hexyl ether groups for the calixarene partners. In general C₆ chains were previously found to provide the best results in both constructs, where the ester or ether nature of the linking functionality did not to affect significantly the hydrophilic-hydrophobic balance of the amphiphilies, a key aspect influencing their DNA complexing abilities.³

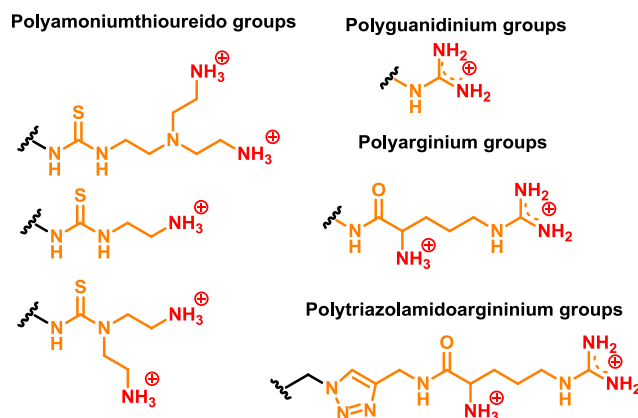


Figure 6.2. Polycationic functional groups for β CD and calix[4]arene polycationic amphiphilic derivatives.

We have generated in this manner two sublibraries of polycationic facial amphiphiles, each of them combining hexanoylated paCD and hexylated paCA pairs with the same type of cationic head elements (Figures 6.3. and 6.6). By comparing the DNA complexing properties and the *in vitro* transfection efficiencies for paCDs and paCAs within a sublibrary as well as paCDS or paCAs in different sublibraries we intended to ascertain the influence of the nature of the scaffold, the type, density and display mode of

the functional protonable groups, and the length and flexibility of the connecting tethers in their potential as gene delivery systems.

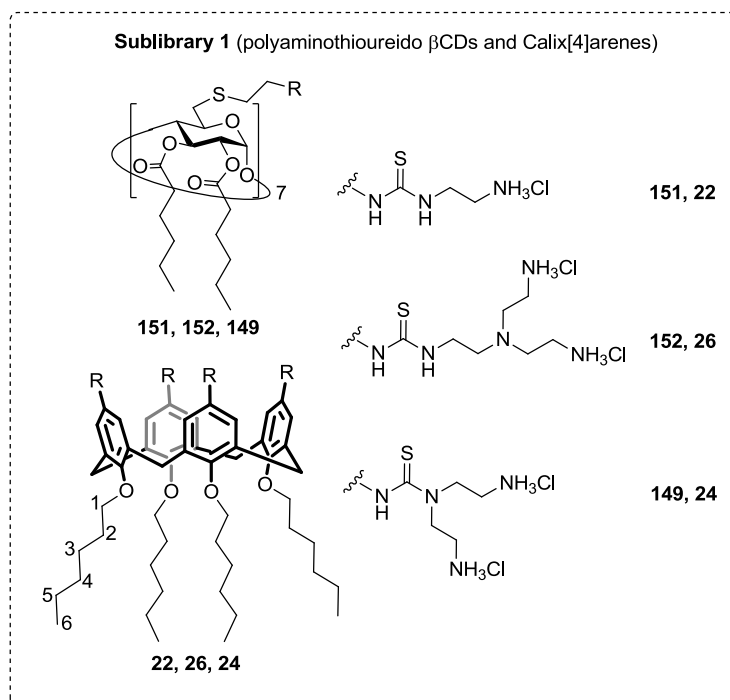


Figure 6.3. Chemical structures of polyaminothioureido β CDs (**151**, **152** and **149**) and calix[4]arenes (**22**, **26** and **24**).

The possibility of using formulations that incorporate dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) as a cationic lipid coadjuvant (Figure 6.3.) and the influence of serum in the transfection capabilities have been also investigated in primate kidney epithelial COS-7 cells and human Rabdosarcoma RD-4 cells. As positive controls, the cationic polymer branched polyethyleneimine (bPEI) and the cationic lipid formulation Lipofectamine®, a 3:1 mixture of 2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate (DOSPA) and DOPE⁴ were used (Figure 6.4).

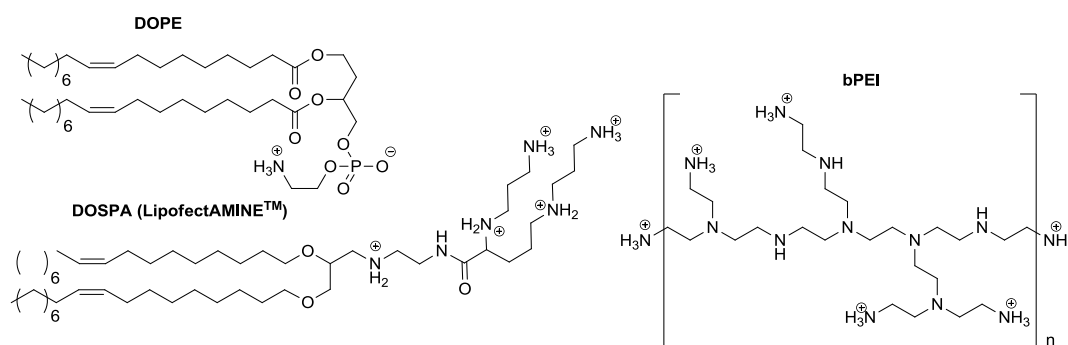
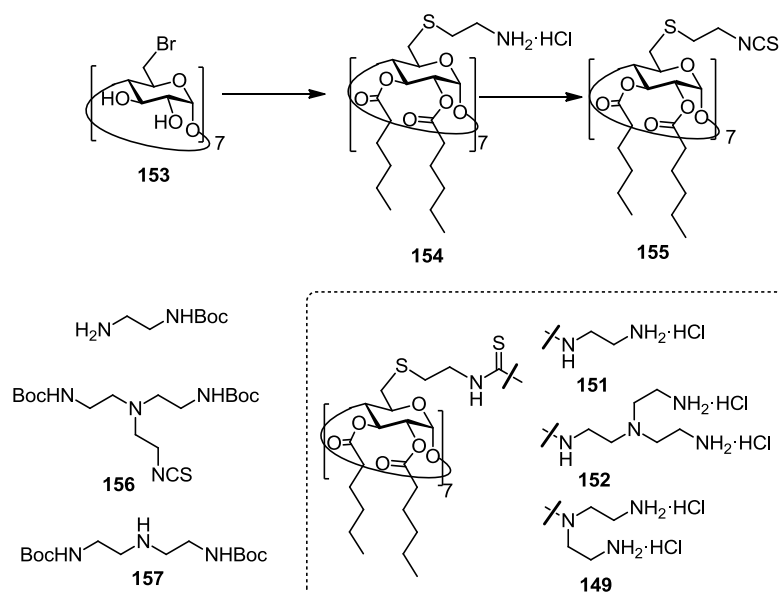


Figure 6.4. Structures of coadjuvant DOPE and the synthetic vectors used as reference in transfection assays: the cationic lipid DOSPA and the cationic polymer bPEI.

6.2. Results and discussion.

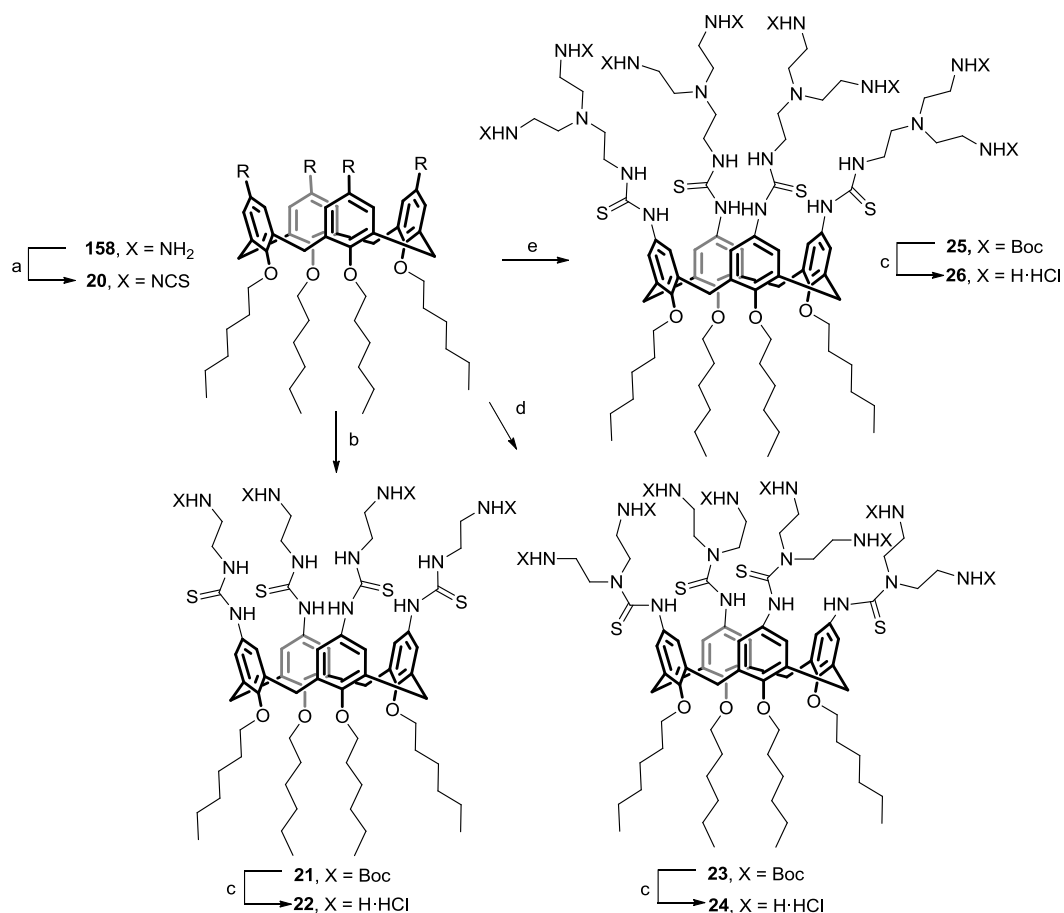
6.2.1. Synthesis of polycationic amphiphilic calixarenes and cyclodextrins.

The polyaminothioureido CDs (**151**, **152**, **149**) were prepared following the procedures previously described by our research group (Scheme 6.1.).¹ Briefly, they involve regioselective per-(C-6)-halogenation of commercial β CD (\rightarrow **153**) followed by hexanoylation of the secondary hydroxyl groups using hexanoic anhydride in DMF and *N,N*-dimethylaminopyridine (DMAP) as a non-nucleophilic base catalyst. Nucleophilic displacement with Boc-protected cysteamine and carbamate hydrolysis affords **154**, which can be transformed into **152** by reaction with di-Boc-protected 2-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)amino]ethyl isothiocyanate (**156**) and final deprotection. Alternatively, per-isothiocyanation of **154** and coupling of the resulting heptaisothiocyanate **155** with commercial 2-(*N*-*tert*-butoxycarbonylamino)ethylamine or bis[2-(*N*-*tert*-butoxycarbonylamino)ethylamine (**157**) and deprotection of the amino groups in the heptathiourea adduct provided **151** and **149**.



Scheme 6.1. Schematic representation of preparation of polyaminothioureido β CD derivatives **151**, **152** y **149**.

For the preparation of the calix[4]arenes representatives in the polyaminothioureido sublibrary, we have followed a semi-convergent procedure that likewise exploits the amine–isothiocyanate coupling reaction in the key multiconjugation step (Scheme 6.2.). The isothiocyanate-armed tetra-*O*-hexylated CA₄ derivative **20**, obtained in 74% yield by isothiocyanation of the tetraamine CA₄ derivative **158** with carbon disulfide/bis(*tert*-butyl) carbonate/DMAP⁵ was use as a pivotal precursor. Reaction with commercial mono-Boc-protected ethylenediamine, bis[2-(*N*-tert-butoxycarbonylamino)ethyl]amine (**159**) and di-Boc-protected 2-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)amino]ethylamine (**157**) (\rightarrow **21**, **23**, **25**), followed by acid-promoted hydrolysis of the carbamate groups, provided the target polyamines, which were isolated as hydrochloride salts **22**, **24** and **26** after freeze-drying from hydrochloric acid solutions.



Scheme 6.2. Synthesis of polyaminothioureido calix[4]arenes **24**, **26** and **22**. Reagents and conditions: a) i, CS₂, Et₃N, EtOH, rt, 2 h; ii, Boc₂O, DMAP, EtOH, 0 °C → rt, 2 h, 88%; b) NH₂CH₂CH₂NHBoc, Et₃N, DCM, rt, 12 h, quantitative; c) i, TFA-TES-DCM, 5 min, rt; ii, HCl, quantitative; d) NH(CH₂CH₂NHBoc)₂ **157**, Et₃N, DCM, rt, 12 h, quantitative; e) H₂NCH₂CH₂N(CH₂CH₂NHBoc)₂ **159**, Et₃N, DCM, rt, 12 h, quantitative.

NMR spectroscopy, ESIMS, and elemental microanalyses unequivocally demonstrated the structure and homogeneity of the three polyaminothioureido calixarene derivatives. The ¹H and ¹³C NMR spectra of the dendritic tetrathioureido calix[4]arene **26** (Figure 6.5), registered in CD₃OD, were consistent with the expected C₄-symmetric arrangement indicative of homogeneous substitution of the CA₄ core in the cone conformation.

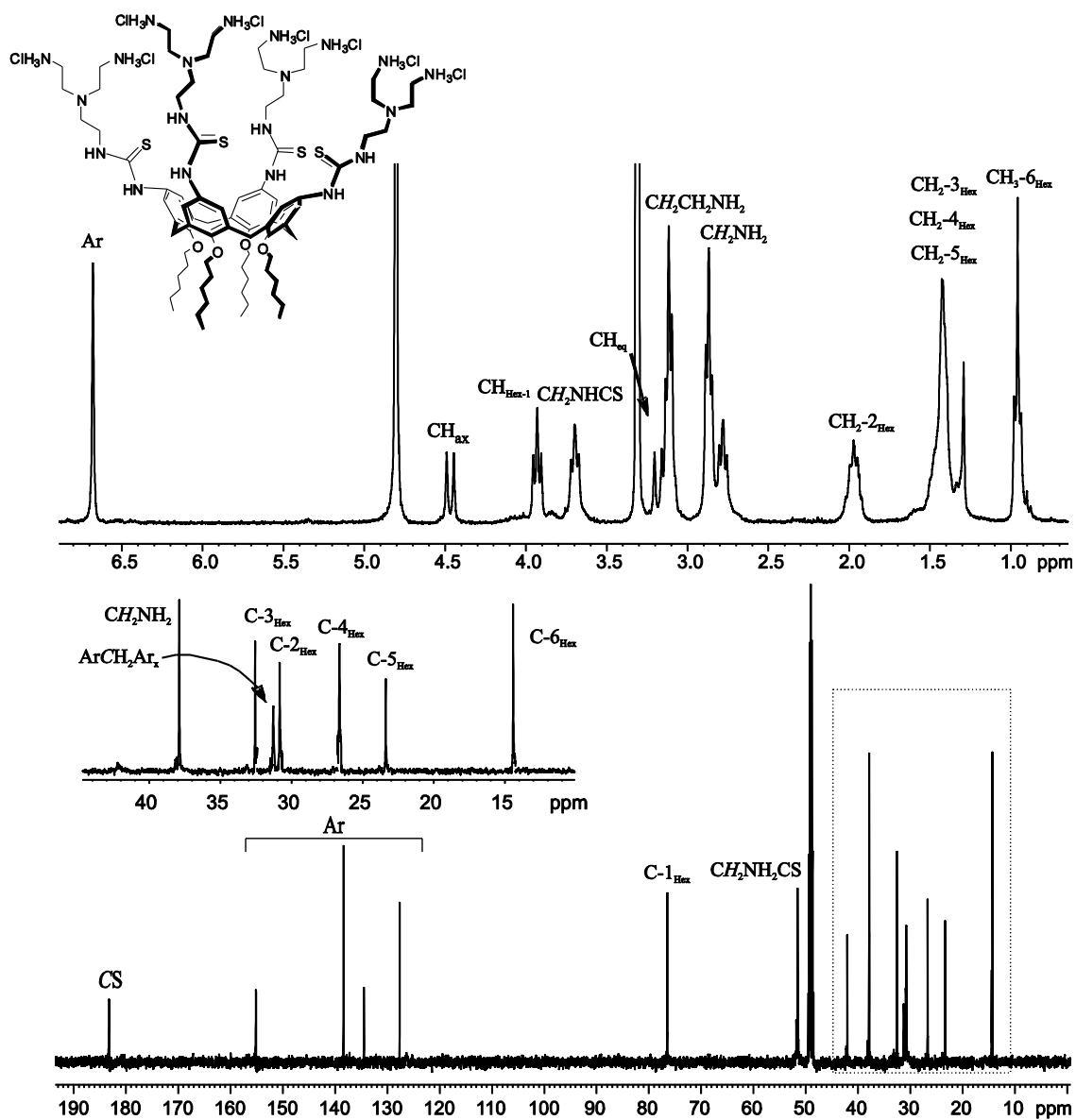


Figure 6.5. ^1H and ^{13}C NMR spectra (300 MHz, 125.7 MHz, CD_3OD) of compound 26.

The guanidinium group was included as cationic head element in this study (**28** and **35**; Figure 6.6) since it is known to strongly bind anionic substrates. Actually, it has been widely incorporated into synthetic receptors for this purpose. In addition, the ability of guanidinium-based polycations to penetrate cells and promote gene transfection has been also reported.⁶

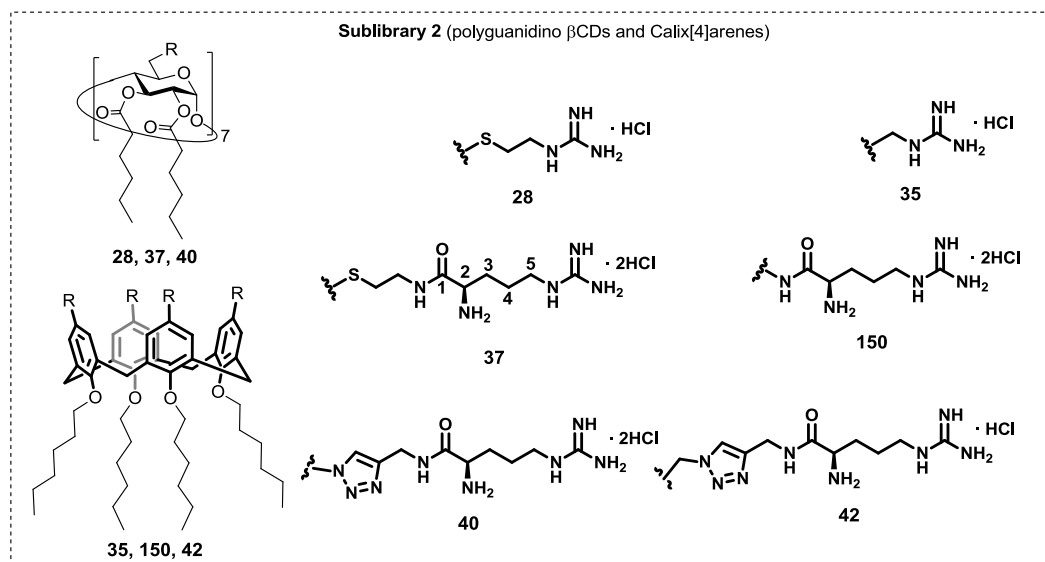
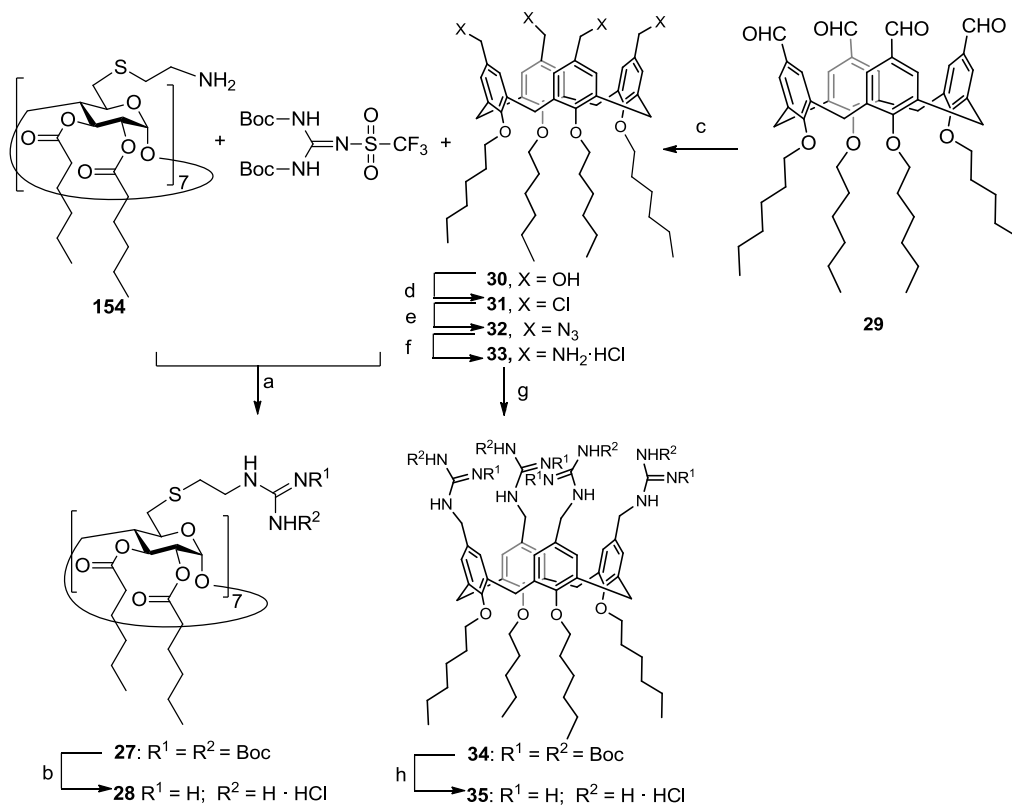


Figure 6.6. Structures of polyguanidino, arginine and triazol-arginino β CDs and calix[4]arenes.

The preparation of the paCD derivative **28**, with seven guanidinium groups at the primary rim and 14 hexanoyl chains at the secondary rim, was carried out by reacting the per-(C-6)-cysteaminyll β CD derivative (**154**) with *N-N'*-di-Boc-*N''*-tryfilguanidine in dichloromethane (\rightarrow **27**). Removal of the carbamate protecting groups gave the heptaguanidino paCD **28** in virtually quantitative yield (Scheme 6.3).

The synthesis of the tetraguanidino paCA analogue **35** involved reduction of the azido groups in **32** by catalytic hydrogenation to give the corresponding tetraamino intermediate **33**, which was guanidylated by triethylamine-catalysed reaction with the Boc-protected triflylguanidine reagent (\rightarrow **34**). Subsequently acid-catalysed deprotection

yielded the target CA₄-scaffolded cationic amphiphile **35** in excellent yield. The preparation of **32** was successfully accomplished by reduction of the tetraformylated hexylated calix[4]arene **29**, followed by direct chlorination of the primary hydroxyl groups (\rightarrow **31**), and nucleophilic substitution with sodium azide (\rightarrow **32**)



Scheme 6.3. Synthesis of polyguanidino β CD derivatives **28** and **35**. Reagents and conditions : a) Et₃N, DCM, rt, 12 h, quantitative; b) i. 1:1 TFA-DCM, rt, 3 h; ii. 0.1 M HCl, quantitative; c) NaBH₄, EtOH, 0°C \rightarrow rt, 18 h, 86% ; d) SOCl₂, DCM, 4 h, rt, 95% e) NaN₃, DMF, overnight, 40 °C, 95% ; f) H₂/Pd/C, 1:1, 1 M HCl, EtOH-EtOAc, 48 h, quantitative; e) Et₃N, DCM, rt, 48 h, 91%; f) TES, dioxane, 0.1 M HCl, rt, 24 h, quantitative.

The NMR spectra of both derivatives show one set of signals as expected for symmetrically functionalized amphiphilic macrocycles (see Figure 6.7).

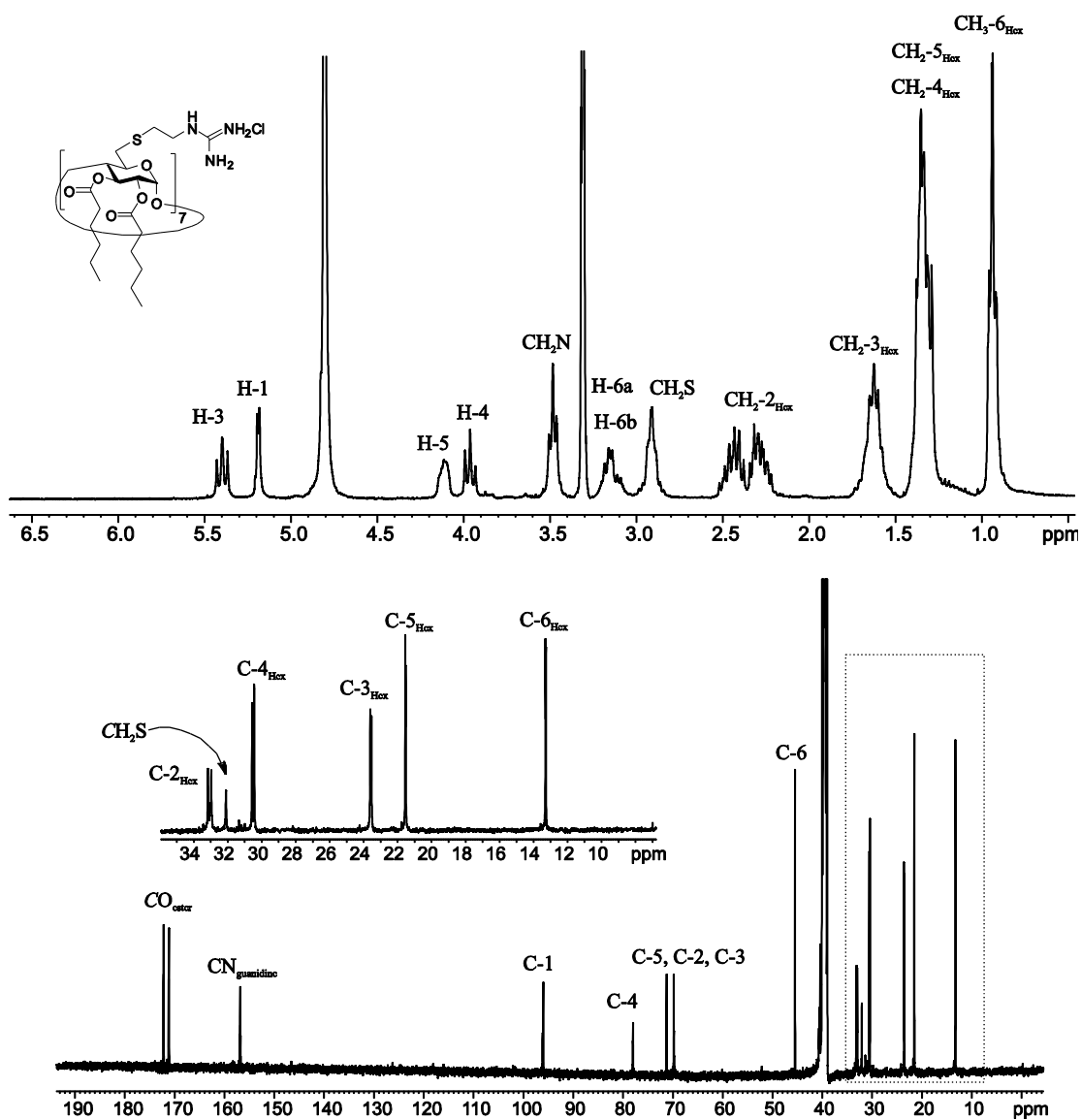
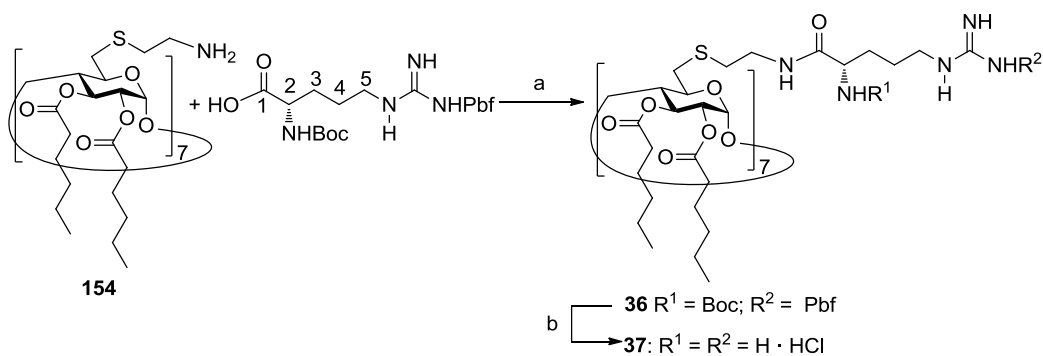


Figure 6.7. ^1H and ^{13}C NMR spectra (300 MHz, CD_3OD , 125.7 MHz, 323 K, DMSO-d_6) of 28.

Within guanidine derivatives, arginine substituents were found particularly suitable for gene vector design in the paCA series. For the incorporation of arginine

motifs at the primary rim of β CD, the per-(C6)-cysteaminyl derivative **154** was chosen as starting material, keeping in mind that the presence of the ethylene spacer between the nitrogen atom and the CD nucleus releases the steric constrain at the narrower primary rim and improves nucleophilicity of the amino groups. Amide coupling heptaconjugation reaction with commercial N_α -Boc- N_ω -Pbf-L-arginine and HBTU in dicloromethane afforded the corresponding peptide adduct **36** in 68% yield. Standard deprotection steps led to the free heptaarginino paCD **37**, isolated as the corresponding tetradecahydrochloride in quantitative yield (Scheme 6.4). The NMR spectra of the new compounds confirmed their symmetrical character and homogeneity (see Figure 6.8 for ^1H and ^{13}C NMR spectra of **37**). The corresponding calixarene counterpart (**150**) was prepared according the previously reported method by ².



Scheme 6.4. Synthesis of polyamidoarginine β CD derivative **37**. Reagents and conditions: a) HBTU, DIPEA, DCM, rt, 12 h, 68% ; b) i, 95:2.5:2.5 TFA-TIS- H_2O , rt, 1 h; ii, 0.1 M HCl, quantitative.

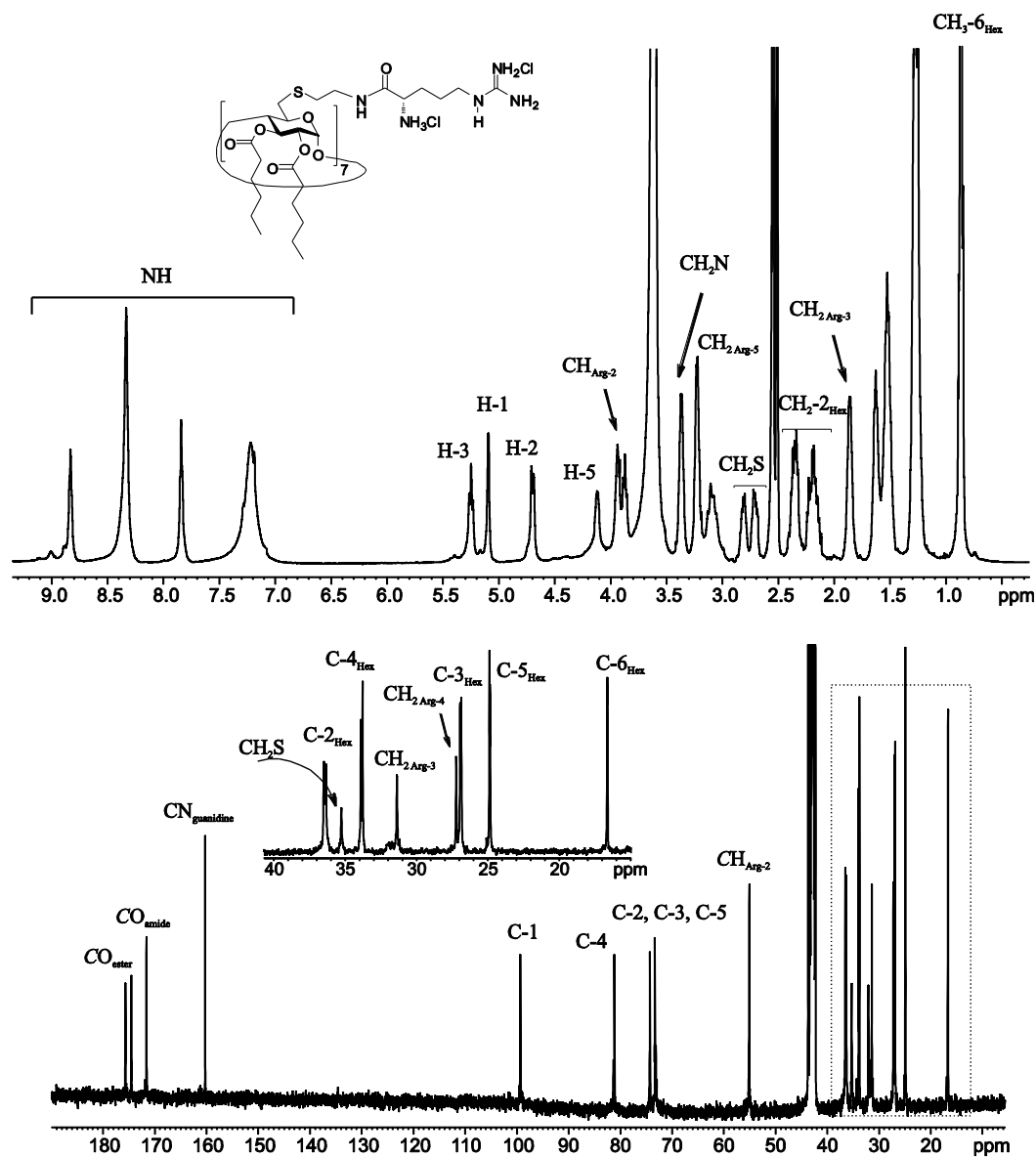
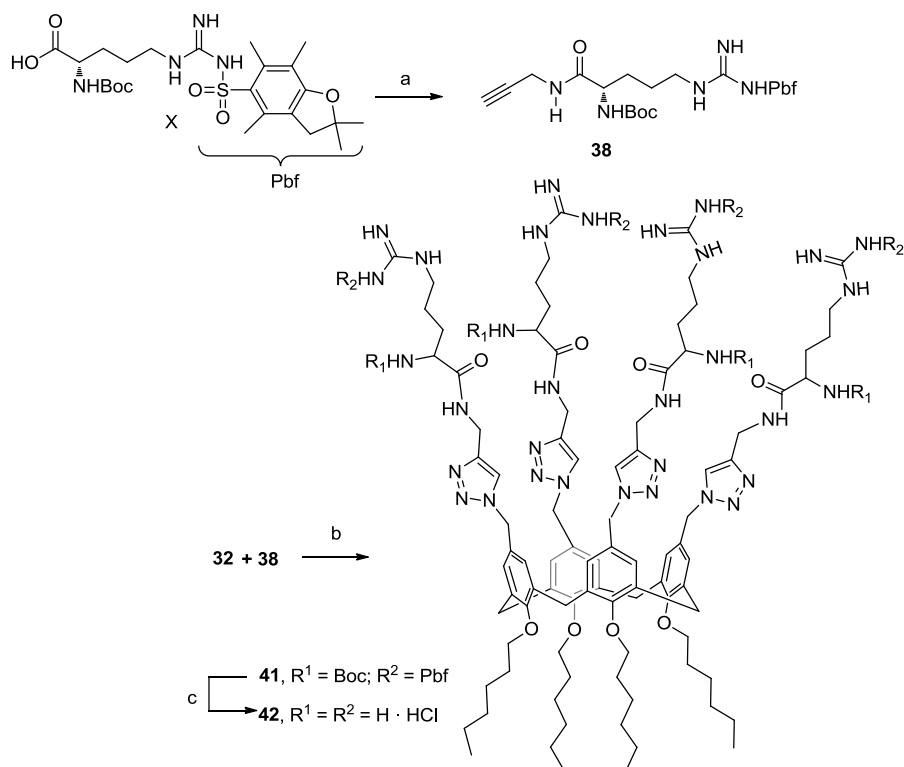


Figure 6.8. ^1H and ^{13}C NMR spectra (500 MHz, 125.7 MHz, 323 K DMSO- d_6) of 37.

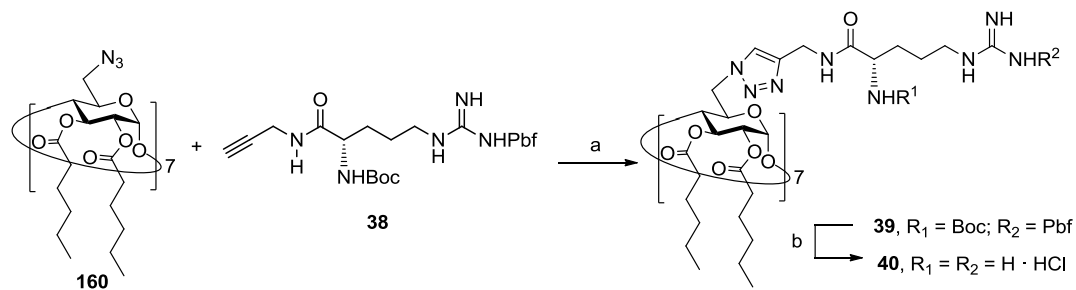
To evaluate the consequences of structural modifications in the spacer arm between the peripheral arginine groups and the macrocyclic core, we have also used the copper(I)-catalyzed Huisgen-Sharpley-Meldal 1,3-dipolar cycloaddition between alkynes and azides (CuAAC)⁷ as multiconjugation methodology, a currently well-established strategy in the glycoscience.⁸ Although the resulting triazole connector is considered as an isoster of the amide group, it imparts a higher rigidity, thereby influencing the conformational properties. Moreover the triazole moiety can also act as a hydrogen bonding acceptor, as a DNA intercalating moiety, or as an endosomal buffering unit (pK_a of triazole = 6), affecting stability, endosomal release and transfection efficiency of the resulting nanoplexes.

The CuAAC reaction between the tetraazido calixarene **32** and the propargylated derivative of N_α -Boc- N_ω -Pbf-L-arginine **38**, carried out in acetone under reflux with homogeneous catalysis, using copper(I) iodide/triethyl phosphite complex, gave the tetra-1,4-substituted 1,2,3-triazole derivative **41** in excellent yield (Scheme 6.5). Final Boc hydrolysis afforded the free paCA tetraarginine derivative as the corresponding octahydrochloride **42**. The ¹H NMR spectrum of this compound in CD₃OD at 298 K (Figure 6.9.) shows one set of sharp signals with the multiplicity expected for a symmetrically functionalized calix[4]arene in the cone conformation.

Reaction of heptazido β CD derivative **160** with **38** under similar conditions gave the Boc-protected triazole derivative **39** in quantitative yield. Hydrolysis of carbamate groups afforded the compound **40** having 14 amino groups (Scheme 6.6).



Scheme 6.5. Synthesis of polytriazolamidoargininecalix[4]arene **42**. Reagents and conditions: a) HBTU, DIPEA, propargylamine, DMF, rt, 15 h, 87%; b) $\text{CuI} \cdot \text{P}(\text{EtO})_3$, DIPEA, acetone, reflux, 24 h, 71%; c) i, 95:2.5:2.5 TFA-TIS- H_2O , rt, 1 h; ii, 0.1 M HCl, quantitative.



Scheme 6.6. Synthesis of polytriazolamidoarginine-CD **40**. Reagents and conditions: a) $\text{CuI} \cdot \text{P}(\text{EtO})_3$, DIPEA, acetone, reflux, 48 h, 99%; B) i, 95:2.5:2.5 TFA-TIS- H_2O , rt, 1 h; ii, 0.1 M HCl, quantitative.

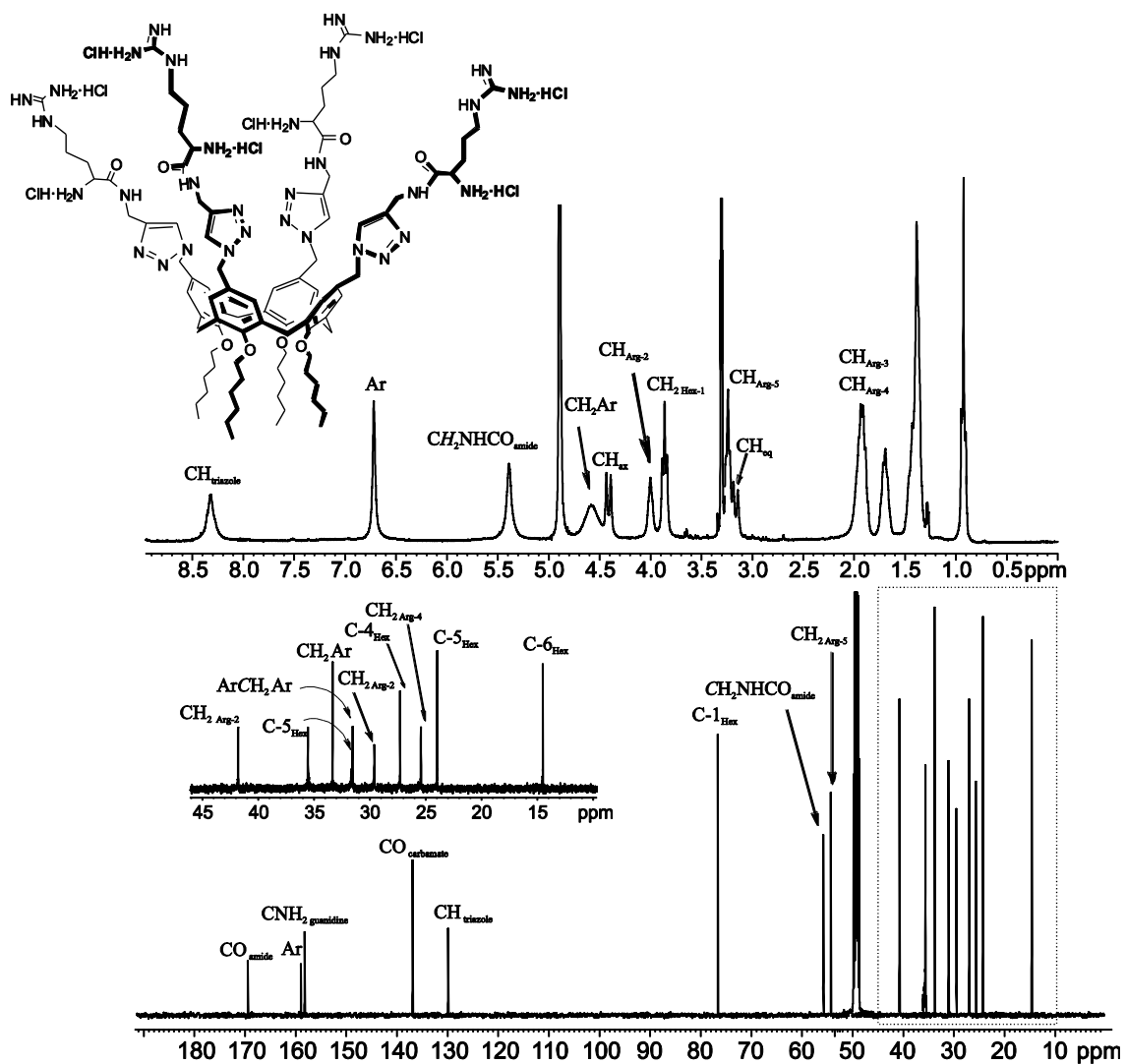


Figure 9.9. ^1H and ^{13}C NMR spectra (300 MHz, 75 MHz, CD_3OD) of 42.

6.2.2. pDNA complexation abilities of paCDs and pa CAs and characterization of the resulting nanocomplexes.

The ability of β CD- and CA₄-based polycationic systems to complex and protect DNA was first examined by electrophoresis mobility shift assays (EMSA) using GelRed™ (Biotium) as staining reagent and luciferase-encoding plasmid pDNA pTG11236 (pCMV-SV40-luciferase-SV40pA, 5739 base pairs), at N/P ratios 1, 2, 5, 10 and 20. The paCD or paCA derivative was added from 10, 20 or 50 mM stock solution (DMSO) to hamper premature aggregation processes and then diluted with the pDNA solution in a 20 mM HEPES buffer at pH 7.4. Retardation experiments (Figures 6.10 and 6.11) demonstrated that most of the tested derivatives were able to fully complex and protect pDNA at $N/P \geq 2$ as indicated by the absence of free mobile plasmid in the corresponding lanes. Only three compounds needed $N/P > 2$ for the complexation of DNA, namely the polyaminothiourea paCA **22**, the guanidium paCA derivative **35** and the polytriazolargininium paCA derivative **42**. It means that a higher concentration of cationizable groups is necessary in those cases, as compared with the rest of formulations, to fully neutralize the DNA charge and avoid Gel Red intercalation.

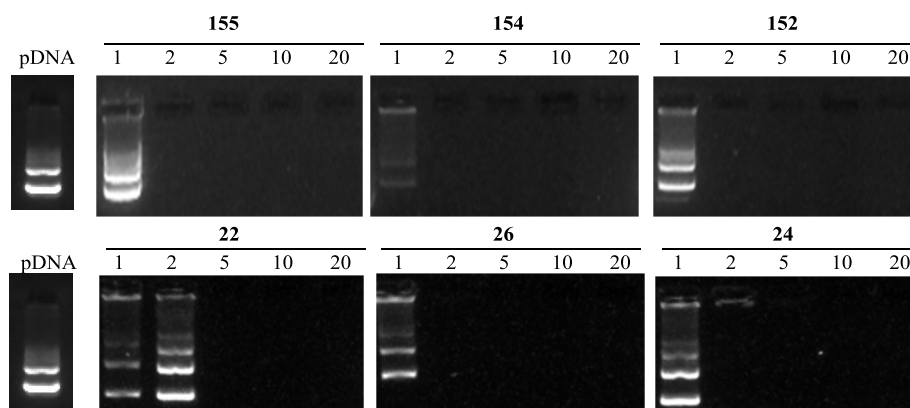


Figure 6.10. Protection of pDNA from ethidium bromide intercalation at different N/P ratios (1, 2, 5, 10 and 20) for complexes of polyaminothiourea derivatives. Naked pDNA is used for comparative purposes.

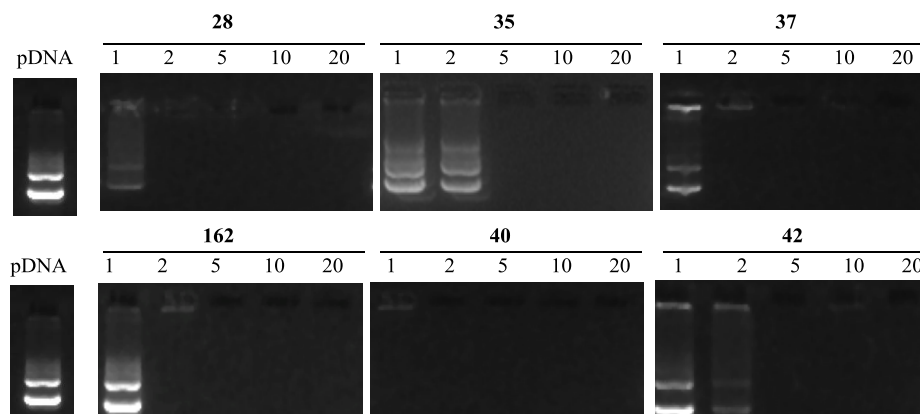


Figure 6.11. Protection of pDNA from ethidium bromide intercalation at different N/P ratios (1, 2, 5, 10 and 20) for complexes of polyguanidine derivatives. Naked pDNA is used for comparative purposes.

The complexes at N/P 5 and 10, for which pDNA is fully complexed in all cases, were also examined by dynamic light scattering (DLS) to determine average hydrodynamic size and by mixed-mode measurement-phase analysis light scattering (M3-PALS) to measure the ζ -potential (Tables 6.1 and 6.2). In most of cases, except for the guanidine derivatives **28** and **35** (which exhibit relative larger sizes), small nanoparticles with a low polydispersity and with average hydrodynamic diameters in the 80-120 nm range were obtained. Their positive ζ -potential values confirmed in all cases full coverage of the DNA chain by paCD or paCA units (Figure 6.12).

Table 6.1. Hydrodynamic sizes (nm) \pm SD and polydispersity index of complexes pDNA-polycationic amphiphilic derivatives.

Comp.	Size		PI	
	(nm) N/P 5		(nm) N/P 10	
151	113.9 \pm 1.0	0.21 \pm 0.02	97.8 \pm 2.1	0.21 \pm 0.01
152	109.3 \pm 1.6	0.20 \pm 0.01	81.2 \pm 0.7	0.21 \pm 0.01
149	108.6 \pm 2.2	0.22 \pm 0.02	85.89 \pm 2.2	0.20 \pm 0.01
22	121.6 \pm 3.0	0.27 \pm 0.01	92.74 \pm 0.4	0.16 \pm 0.03
26	123.1 \pm 3.3	0.40 \pm 0.02	87.35 \pm 0.7	0.32 \pm 0.01
24	117.7 \pm 1.3	0.30 \pm 0.01	93.07 \pm 1.2	0.24 \pm 0.01
28	157.8 \pm 3.4	0.23 \pm 0.02	92 \pm 3.7	0.34 \pm 0.01
35	174.1 \pm 6.4	0.42 \pm 0.06	116.6 \pm 5.7	0.33 \pm 0.05
37	109.3 \pm 0.8	0.26 \pm 0.02	82.6 \pm 3.9	0.27 \pm 0.04
150	87.6 \pm 0.3	0.23 \pm 0.01	81.2 \pm 0.4	0.23 \pm 0.02
40	112.4 \pm 1.1	0.25 \pm 0.01	83.8 \pm 3.6	0.37 \pm 0.03
42	84.5 \pm 0.8	0.24 \pm 0.01	95.5 \pm 0.7	0.34 \pm 0.01

Table 6.2. ζ Potential (mV) \pm SD of complexes pDNA-polycationic amphiphilic derivatives.

Compound	N/P 5	N/P 10
151	55.6 \pm 2.6	63.2 \pm 2.9
152	58.5 \pm 2.2	71.2 \pm 1.3
149	59.2 \pm 1.2	61 \pm 1.1
22	42.6 \pm 0.7	53.5 \pm 2.0
26	46.8 \pm 2.2	50 \pm 2.1
24	43.1 \pm 1.1	50.8 \pm 1.6
28	40.1 \pm 1.1	44.1 \pm 0.8
35	29.5 \pm 1.2	46.5 \pm 1.6
37	55.8 \pm 0.3	62.1 \pm 2.4
150	46.5 \pm 1.1	54.8 \pm 1.7
40	50.9 \pm 1.9	54.1 \pm 2.3
42	45.7 \pm 1.6	52.7 \pm 1.0

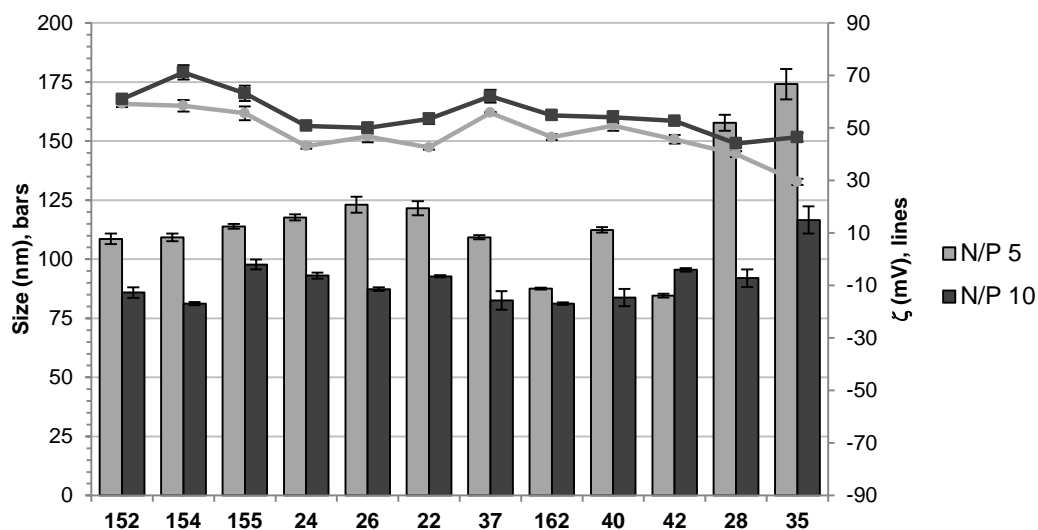


Figure 6.12. Hydrodynamic diameter (bars, nm) and ζ potential (lines, mV) of complexes pDNA – polycationic amphiphilic derivatives determined by DLS and M3-PALs analysis.

The TEM images of the nanocomplexes, formulated at N/P 10, further confirmed their relatively small size and their homogeneity (Fig. 6.14). CDplexes of **149** (Figure 6.14 A). show an ultra-thin structure revealing an alternate arrangement of high (dark) and low (light) electron density regions was observed. The dark regions account for the DNA chain, whereas the light regions probably correspond to bilayers of polycationic amphiphilic CDs. Similar nanoparticles were observed for thiourea calixarene derivatives **24** (Figure 6.13, B) and **22** (Figure 6.13, C).

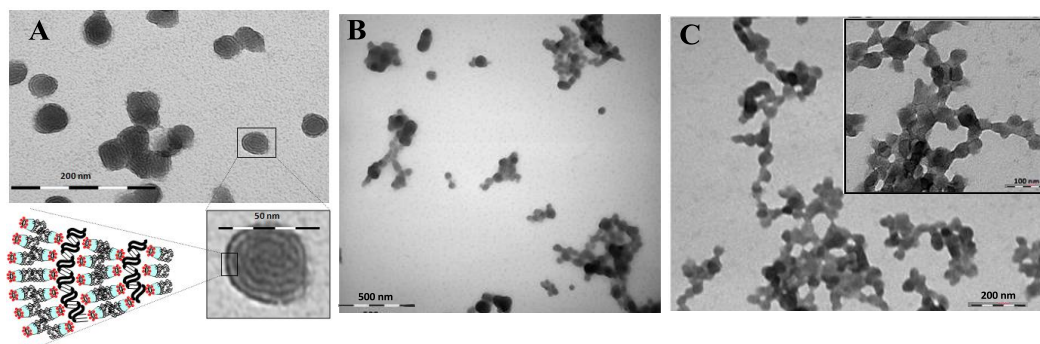


Figure 6.13. TEM images of: (A) **149**:pDNA, (B) **24**:pDNA and (C) **22**:pDNA complexes at N/P 10, 20 μ M.

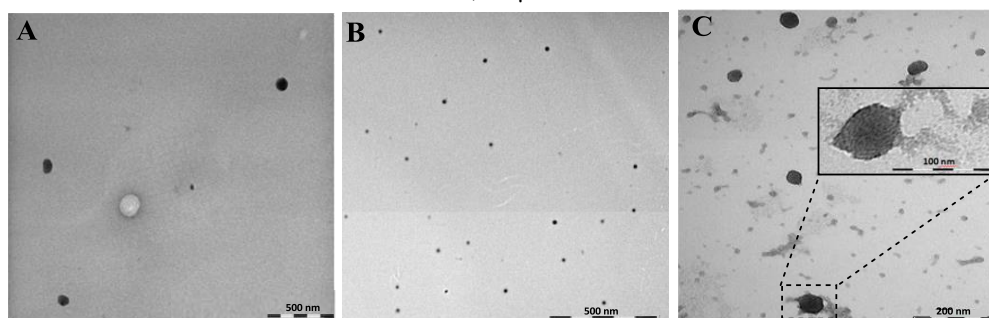


Figure 6.14. TEM images of: (A) **28**:pDNA, (B) **37**:pDNA and (C) **162**:pDNA complexes at N/P 10, 20 μ M.

Polyguanidine and polyarginine CD derivatives **28** and **37** were also able to condense pDNA to form homogeneous nanoparticles both in shape and size, as depicted in Figure 6.14 (A and B, respectively), where a lower microscopy magnification was used in order to show the distribution of CDplexes in the sample. In the case of polyarginine calixarene derivative, **150** (Figure 6.14, C), the snake-like ultrastructure suggest a supramolecular organization of calixplexes similar to CDplexes. Due to the higher electron density in the region of the aromatic rings in the CA₄ derivatives, it was more difficult to discriminate between polycationic vector and anionic chains of pDNA in TEM images of complexes of these macrocycles, whereas it was easier to observe the structural details for CD derivatives.

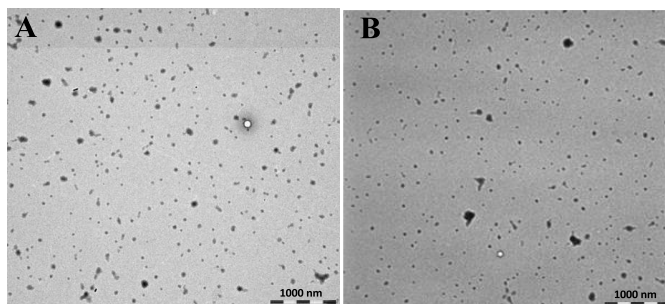


Figure 6.15. TEM images of: (A) **40**:pDNA, (B) **42**:pDNA.

TEM images of politriazolarginine derivatives **40** and **42** (Figure 6.15, A and B, respectively) demonstrated that these derivatives also condensate pDNA very efficiently.

During a stay in the laboratory of Prof. A. Casnati and Dr. F. Sansone at the University of Parma, we additionally conducted a study on the pDNA condensation abilities of the synthesized paCDs and paCAs by Atom Force Microscopy (AFM), in tapping mode on air, to confirm the structure of complexes with pDNA as well as to elucidate how pDNA complexation occurs (Figure 6.16). The plasmid EGFP-C1 (4731 bp) codifying for green fluorescent protein (GFP), was used for this purpose. Before formulation with polycationic amphiphilic derivatives, single plasmid DNA molecules were observed.

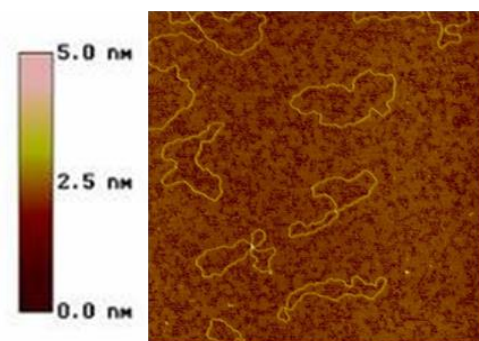


Figure 6.16. AFM images of EGFP-C1 (4731 bp) pDNA, 0.25 nM, 2x2 μm .

As shown in the AFM image collected in Figure 6.17, carried out on samples deposited on freshly cleaved ruby mica after drying under nitrogen, the paCD derivative **149** (A) as well as its calixarene homologous, **24** (B), promoted the formation of small condensates with 0.25 nM pDNA (pEGFP-C1) in deposition buffer (20 mM Hepes, 10 mM NaCl, 2 mM, MgCl₂, pH 7.4) confirming the evidence obtained by gel electrophoresis assays and TEM. In this images, the plasmid appears in highly condensed nanoparticles with average size of 100 nm diameter that exclude the formation of large aggregates.

In order to have information about complexation process, a low N/P ratio sample (N/P 0.5) was used to formulate pDNA with the polyaminothiourea calixarene derivative **22**. As expected, the AFM revealed that there is more free pDNA molecules together with globular species of similar shape and size that in comparison with other derivatives (Figure 6.17, C).

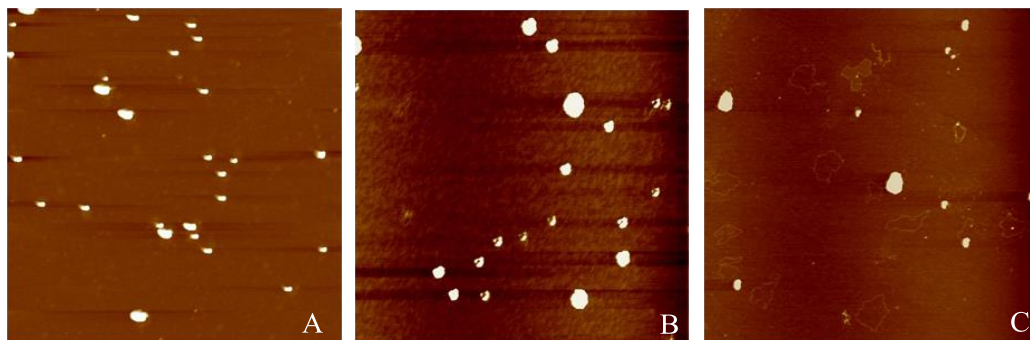


Figure 6.17. AFM images in tapping mode on air showing the effects induced on EGFP-C1 plasmid DNA folding by incubation with aminothioureidos derivatives: (A) pDNA: **149** complexes N/P 10, 1.7 μM , 5X5 μm ; (B) pDNA:**24** complexes, N/P 2, 0.3 μM , 5x5 μm . (C) pDNA:**22** complexes, N/P 0.5, 0.6 μM , 5x5 μm .

With the same purpose, we prepared complexes with pDNA and polyguanidine CD derivative **28** and its calixarene derivative homologous **35**, at N/P 0.5 and N/P 5 (Figure 6.18).

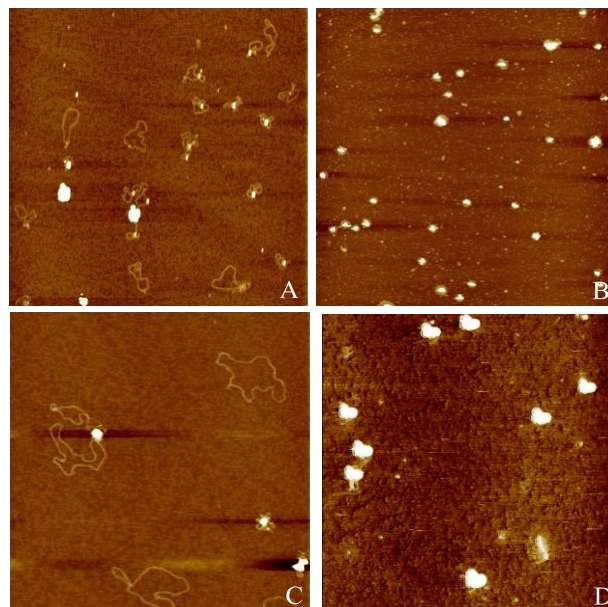


Figure 6.18. AFM images in tapping mode on air showing the effects induced on EGFP-C1 plasmid DNA folding by incubation with polyguanidino derivatives. pDNA:**28** complexes: (A) N/P 0.5, 0.17 μM , 5x5 μm ; (B) **28**, N/P 5, 1.69 μM , 5x5 μm . pDNA:**35** complexes: (C) N/P 0.5, 0.3 μM , 2x2 μm , (D) N/P 5, 2.96 μM , 5x5 μm .

At N/P 0.5 we were able to observe a snapshot of pDNA complexation process (Figure 6.18, A and C). In both cases, AFM showed pDNA filaments with different levels of condensation: free pDNA molecules, pDNA molecules where condensation was taking place and totally complexed pDNA. This demonstrates that the white spots correspond to complexes with pDNA. Moreover, it is possible to distinguish that aggregates contains only one pDNA filament, according with the size observed for the nanoparticles (lower than 100 nm). At higher N/P ratio (N/P 5), all the pDNA is forming small globular condensates that are bigger in the case of calixarene derivative (**35**, D) than in its CD homologous (**28**, B).

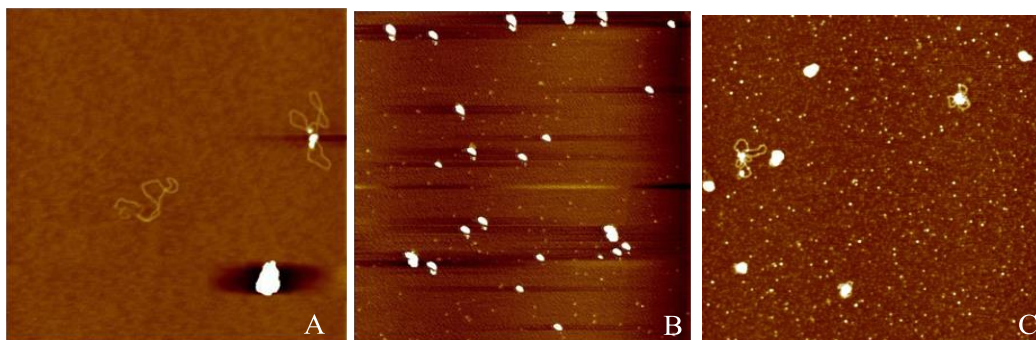


Figure 6.19. AFM images of: (A) pDNA:**37** complexes N/P 0.5, 0.084 μM , 2X2 μm ; (B) pDNA:**LGY56** complexes N/P 10, 1.69 μM , 5x5 μm ; (C) pDNA:**150** complexes N/P 2, 2 μM , 5x5 μm .

A similar situation is observed for the polyarginine CD derivative, **37**, when studying by AFM samples at N/P ratio of 0.5 (Figure 6.19, A) or N/P 10 (Figure 6.19, B). In the first case was possible to observe single filaments of pDNA during the complexation process as well as a nanoparticle where pDNA is fully condensed. For N/P 10, no free pDNA was observed and the homogeneous distribution of nanoparticles confirmed the evidence given by TEM experiments. The analogous polyarginine derivative in calixarene series, **150**, behaved in a similar way.

In summary, TEM and AFM studies demonstrated that all the derivatives are able to complex and condensate pDNA in a very efficient manner to give homogeneous nanoparticles with appropriate dimensions for cellular uptake.

6.2.3. Gene transfer capabilities towards COS-7 cell line.

In order to clarify if the pDNA condensation ability correlates with the transfection efficiency, we have next evaluated the gene transfection capabilities of CDplexes and calixplexes in the COS-7 cell line employing the luciferase encoding plasmid pTG11236 (pCMV-SV40-luciferase-SV40pA) formulated at N/P 5 and 10.

As discussed in the above paragraphs, in nanocomplexes formulated at N/P 5 and 10, pDNA is fully compacted and protected (see EMSA and ζ -potential studies) and well-defined nanoparticles are formed, as confirmed by DLS, TEM and AFM. We have already seen that complexes at higher N/P ratios are not able to improve performance and result in higher toxicity.^{1a} For comparative purposes, naked pDNA and polyplexes formulated with commercial branched polyethyleneimine (bPEI) were used as negative and positive controls, respectively. The suitability of the vectors for potential systemic applications was assessed by performing the experiments in the presence of 10% serum. The total amount of luciferase produced was referred to the total amount of produced proteins by untreated cells. Transfection efficiencies are thus presented as logarithm of picograms of luciferase respect to milligrams of total proteins.

Negative control experiments showed that when COS-7 cells are treated with naked luciferase encoding pDNA, a certain transfection level is detected. This is a consequence of pDNA internalization during cell division process. Much higher transfections levels were reached when pDNA was delivered in condensed form within CDplexes or calixplexes. All the paCD:pDNA and paCA:pDNA formulations, with three exceptions, showed higher transfection efficiency and cell viability than polyplexes formulated with bPEI at N/P 10 (the optimal N/P ratio for bPEI). That means that the synthesized derivatives are suitable candidates for gene delivery. Only the polyguanidinium derivatives **28** and **35** at N/P 10 and the polyaminothioureido **26** at N/P 10 with 10% serum exhibited less transfection levels than bPEI.

In general, transfection efficiencies at N/P 10 were higher as compared with N/P 5 formulations, probably as a result of a better pDNA complexation when increasing the polycationic vector concentration. Only the less efficient vectors, **28**, and **35**, showed the reverse behavior, probably because their poorer transfection capabilities are associated to higher toxicity that increases with the N/P ratio. Compound **150** showed a small decrease in luciferase expression at N/P 10 respect to N/P 5 in the presence of 10% serum, and **40** had no significant differences in transfection efficiency at different N/P ratios. In general, higher toxicity was observed for N/P 10 respect to N/P 5 formulations. In summary, increasing the N/P ratio has two counteracting effects: on one hand a decrease in cell viability, meaning a decrease in the number of cells that are able to be transfected and to express luciferase, and on the other hand an increase in cell transfection efficiency as a consequence of better DNA complexation and protection. In general, the second effect was more important and only in those vectors exhibiting a relatively high toxicity, i.e. **28** and **35**, a lower transfection levels when going from N/P 5 to N/P 10 was observed.

The presence of 10% serum was in general slightly detrimental for transfection mediated by CDplexes and calixplexes, but excepting for nanocomplexes formulated with **26**, **35** and **28**, the transfection efficiency remained higher as compared with data for bPEI polyplexes. Although serum proteins may inhibit cell transfection to some extent, this effect is counterbalanced by an enhancement in cell viability.

From data in Figure 6.20 we can assess the effect of different architectures of the aminothiourea head groups in the transfection properties of the corresponding pDNA complexes. In the paCD series, the transfection efficiency followed the trend **152** < **151** < **149**, with a ten-fold difference between **152** and **149** at N/P 5 (with or without serum). Differences were slightly smaller at N/P 10. The same trend was observed in the paCA series for N/P 10 formulations, that is **26** < **22** < **24**. In any case, the differences between the three vectors in the absence of serum were very small. The presence of serum was irrelevant in the case of **24** and **22**, but decreases the transfection efficacy in **26** calixplexes by one order of magnitude. The two-carbon distance between the primary

amino groups and the thiourea functionality is thus the optimal situation in this sublibrary and the transfection efficiency further improving when the amino groups are presented in a dendritic display.

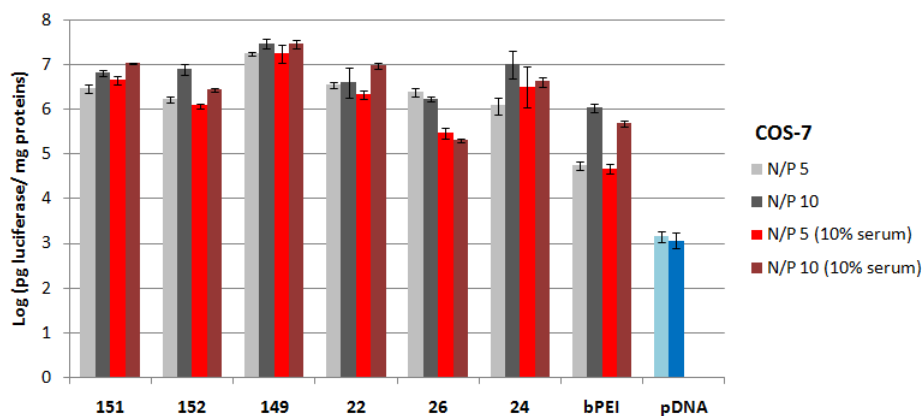


Figure 6.20. *In vitro* transfection efficiency in COS-7 cells for complexes of polyaminothioureido derivatives bPEI, at N/P 5 and 10, with or without 10% serum. pDNA was tested in absence (light blue) and presence (dark blue) of 10% serum.

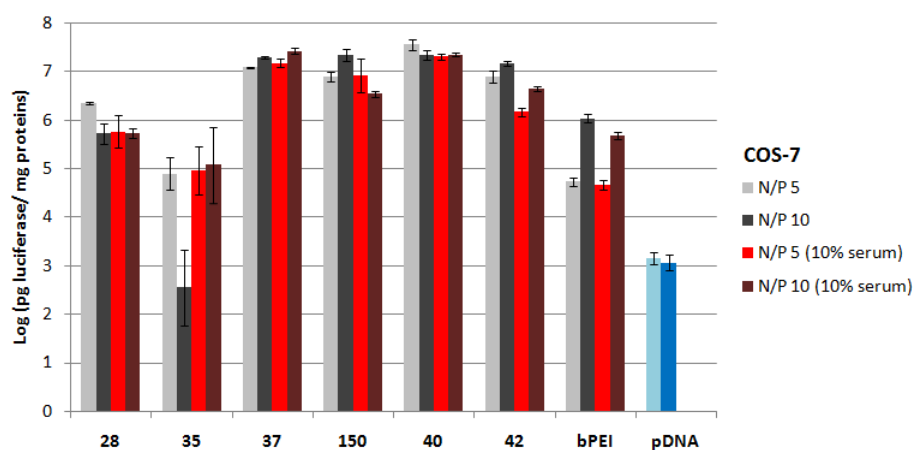


Figure 6.21. *In vitro* transfection efficiency in COS-7 cells for complexes of pDNA and polyguanidine derivatives and bPEI, at N/P 5 and 10, with or without 10% serum. pDNA was tested in absence (light blue) and presence (dark blue) of 10% serum.

Concerning the effect of the macrocyclic platform, direct comparison of homologous β CD and CA₄ derivatives reveals that the former generally exhibit higher transfection efficiencies and cell viabilities, with **149** being the better performing vector of this sublibrary in COS-7 cells. In any case, all the amphiphilic aminothioureas behaved better than bPEI and, excepting for **24** in the absence of serum, with much favorable toxicity profiles (Figure 6.22).

In the guanidine sublibrary, both polyaminoarginine derivatives **37** and **150**, with amide linking groups, showed excellent transfection capabilities (Figure 6.21) and low toxicity levels (Figure 6.23), comparable to that for **149**-formulated CDplexes. Nevertheless, the β CD derivative **37** was significantly less sensitive to the presence of serum than the CA₄ counterpart **150**. The presence of the triazol moiety instead of the amide linker in **40** and **42** did not affect significantly neither the transfection efficiency nor the relative sensitiveness to serum. The compounds having just the guanidine head group at the polycationic cluster, namely **28** and **35**, showed by far the lowest transfection efficiencies of all the synthesized compounds. Notably, in these cases, the transfection levels decreased on going from N/P 5 to N/P 10 in the absence of serum, even though pDNA compaction is more efficient when increasing the proportion of the vector as seen from the DLS-determined hydrodynamic diameters. The sharp difference in transfection properties between nanocomplex formulations based on guanidine and arginine derivatives could be ascribed to the presence of the less basic amino groups in the later. Whereas guanidine groups will be fully protonated at both the extracellular and the endosome pH window, the extra amine groups in polyarginine conjugates probably impart buffering capabilities to the corresponding nanoparticles, thereby facilitating endosome escape.

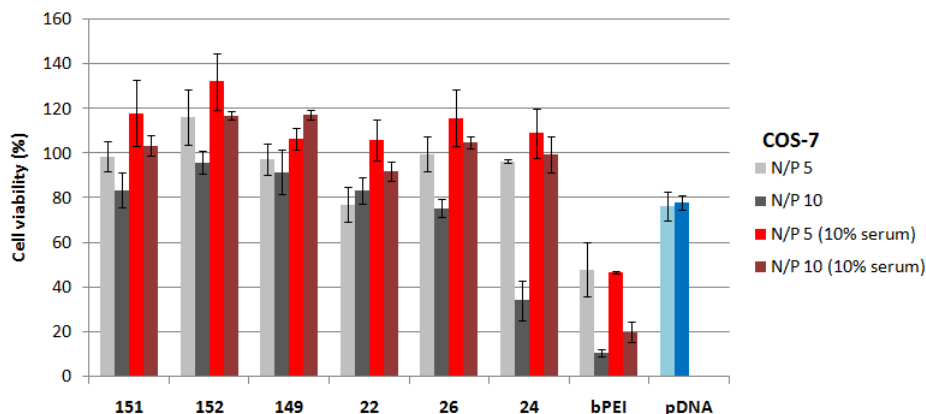


Figure 6.22. Cytotoxicity in COS-7 cells for complexes of polyaminothioureido derivatives and branched polyethylenetriamine (bPEI) and pDNA at N/P 5 and 10, with or without 10% serum. Plasmid DNA was tested in absence (light blue) and presence (dark blue) of 10% serum.

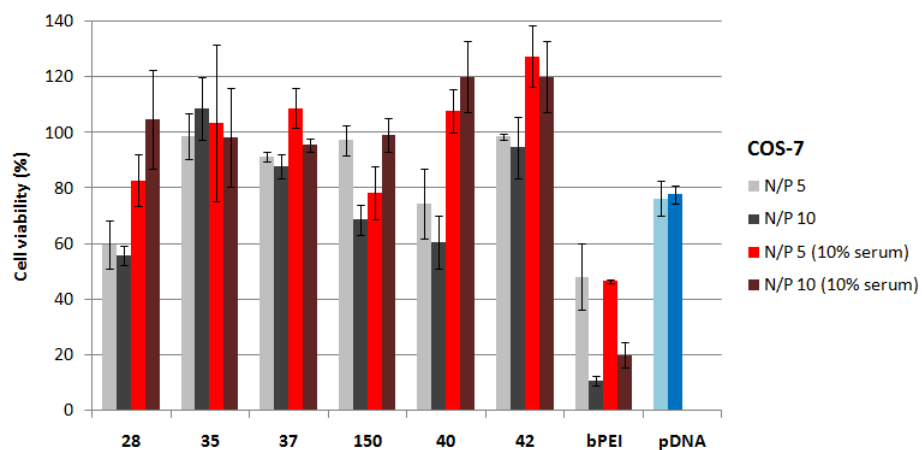


Figure 6.23. Cytotoxicity in COS-7 cells for complexes of pDNA and polyguanidine derivatives and branched polyethylenetriamine (PEI), at N/P 5 and 10, with or without 10% serum. Plasmid DNA was tested in absence (light blue) and presence (dark blue) of 10% serum.

6.2.4. Gene transfer capabilities towards human Rhabdomyosarcoma (RD-4) cell line.

The gene transfer efficiency of nanocomplexes has been also evaluated using human Rhabdomyosarcoma RD-4 cells, a kind of cancer cells of connective tissues, in collaboration with Prof. A. G. Donofrio (University of Parma), in the absence of serum. The difficulties of the treatment and the impossibility, in many cases, of removal of the tumor, make this cell line of medical relevance for gene therapy.⁹ Moreover, it is one of the most difficult cell lines to transfect. Even minimal levels of gene transfection could be an important achievement in the field of synthetic vectors.

For this *in vitro* evaluation experiments, a pDNA containing the gene encoding for green fluorescent protein (GFP, plasmid DNA pEGFP-C1, 4731 bp) was used. The expression of GFP has been monitored by fluorescence microscopy, since GFP exhibits green fluorescence (λ excitation 509 nm) when exposed to light in the blue-UV range (λ emission 395 nm, 475 nm), allowing to detect cells where transfection and protein expression have been successful. For comparative purposes, commercial Lipofectamine® (LTX) and branched polyethyleneimine (bPEI) were used as positive controls. Parallel experiments have been also performed in the presence of DOPE, a commonly used transfection adjuvant.¹⁰ Cells treated only with pDNA and DOPE were used as negative control (Figures 6.24 and 6.25).

Toxicity studies were accomplished previous to transfection assays through MTT cell viability experiments. The reagent 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) is reduced by NAD(P)H-dependent oxidoreductase enzymes to its formazan derivative, an insoluble and purple compound used in a colorimetric assay to determine the number of living cells. In order to have direct comparable data, this assay was carried out both in RD-4 and COS-7 cells (Figures 6.26 and 6.27). Cell viability was, as expected, significantly higher in the cancer cell line, which actually might be an advantage in cancer therapy.

Cell viability assays were carried out at different concentrations of the polycationic amphiphilic compounds, and the highest concentration involving the lowest cytotoxicity was chosen to perform the transfection assays (2.5–10 μM). Transfection efficiency was determined as percentage of transfected cells respect to all the living cells, so that transfection results at different concentrations can be compared.

Most of the nanocomplexes formulated with paCDs or paCAs led to GFP expression in the RD-4 cell line, but only two of them, namely the dendritic aminothiourea βCD derivative **149** and the arginine CA_4 derivative **162**, performed better than the references LXT and PEI. In the opposite site, the guanidine-CD derivative, **28**, and the lineal aminothiourea compounds (**151** and **22**) showed no or negligible GFP expression.

The effect of the adjuvant DOPE (added from 2 mM ethanol solution at 1:2 ligand-DOPE molar ratio) was found to depend on the transfection efficiency of the vector alone. Thus, addition of DOPE was detrimental for derivatives that perform well, with transfection efficiencies over 20%, whereas it increased GFP expression for the less efficient compounds. The only exception was **24**, which showed similar transfection levels with or without DOPE. It is important to note that transfection levels of DOPE when used without polycationic vector are near to zero.

When comparing the homologous βCD and CA_4 compounds with the highest transfection performance in RD-4 cells in the aminothiourea sublibrary, **149** and **24**, respectively, the former is substantially better, whereas the reverse situation is encountered for in the guanidine sublibrary when comparing **28** and **35**. Overall, the scenario is qualitatively similar to that encountered in COS-7 cell, but differences are much more pronounced. The main differences are found for the vectors with the linear aminothiourea group, **22** and **151**, which showed a much lower efficiency than the dendritic analogues in RD-4 as compared with COS-7 cells. In RD-4 cells a higher cationic density seems a prerequisite to warrant significant transfection capabilities in this series.

In the case of arginine-based vectors, replacement of the amide segment by the triazol moiety was detrimental in the RD-4 cell line, the decrease in transfection efficiency being particularly significant in the paCA series (37 versus 40). As observed for COS-7 cells, the interplay of guanidine and amino groups is critical to warrant good transfection properties.

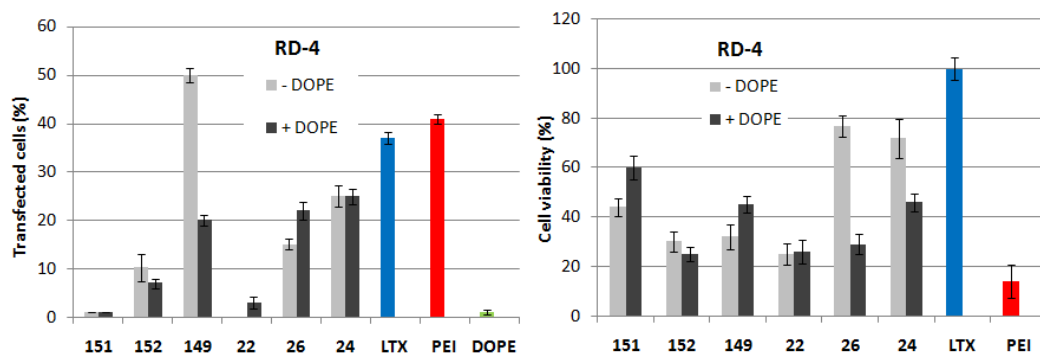


Figure 6.24. *In vitro* transfection efficiency and cell viability in RD-4 cells for complexes of polyaminothioureido derivatives with and without DOPE, Lipofectamine (LTX), branched polyethyleneimine (bPEI) and DOPE.

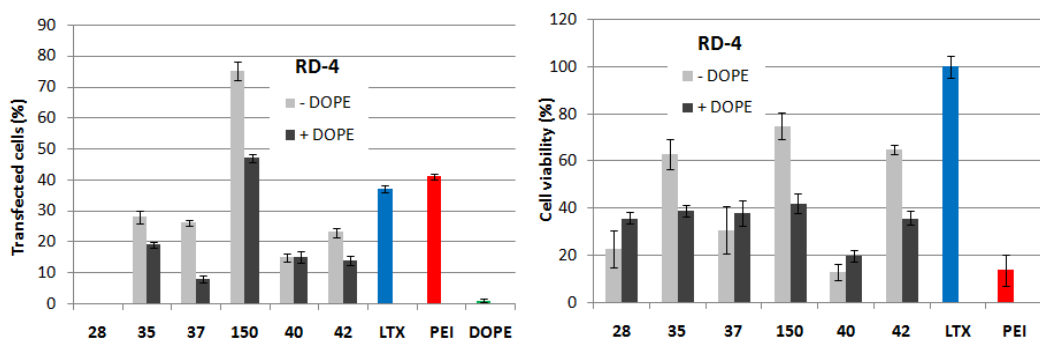


Figure 6.25. *In vitro* transfection efficiency and cell viability in RD-4 cells for complexes of polyguanidinium derivatives with and without DOPE, Lipofectamine (LTX), branched polyethyleneimine (bPEI) and DOPE.

To confirm the results obtained by luminescence assays, transfection efficiency was also determined in COS-7 cells using the GFP encoding plasmid and monitoring by fluorescence microscopy. Percentage of transfected cells referred to total living cells is

represented in Figure 6.26 and 6.27. Concentrations that gave the lowest toxicity levels were used. PEI and LTX were used as positive controls. Results agree with those obtained for luminescence assays.

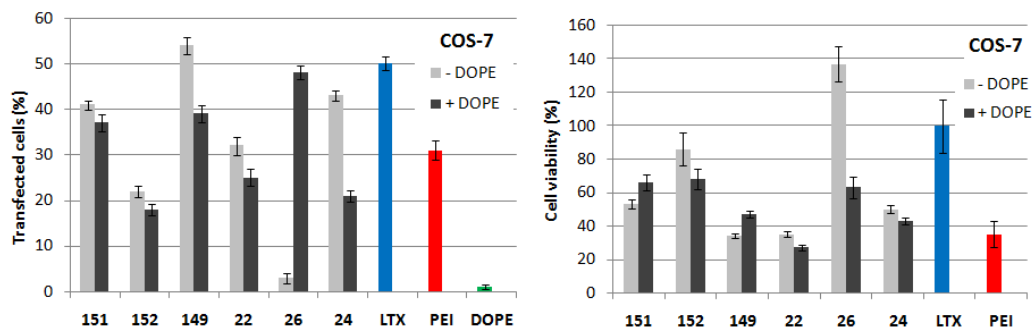


Figure 6.26. *In vitro* transfection efficiency and cell viability in COS-7 cells for complexes of polycationic derivatives with and without DOPE, Lipofectamine (LTX), branched polyethyleneimine (bPEI) and DOPE.

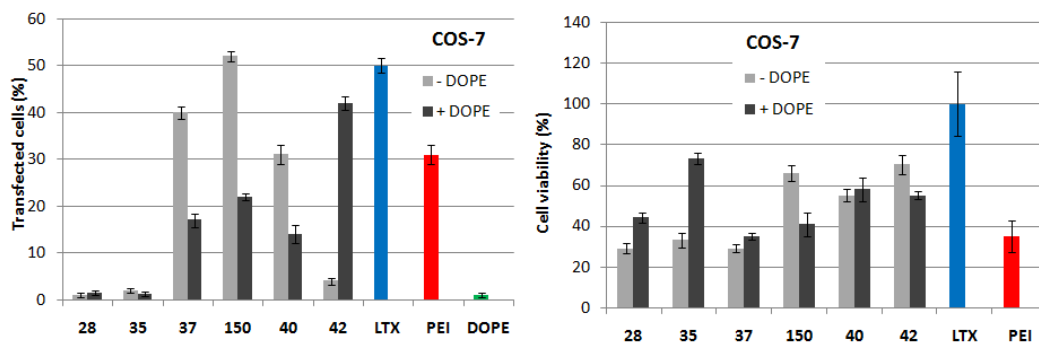


Figure 6.27. *In vitro* transfection efficiency and cell viability in COS-7 cells for complexes of polyguanidinium derivatives with and without DOPE, Lipofectamine (LTX), branched polyethyleneimine (bPEI) and DOPE.

Some of the images of transfected cells expressing the Green Fluorescent Protein, obtained by fluorescence microscopy, are shown in Figures 6.28 and 6.29.

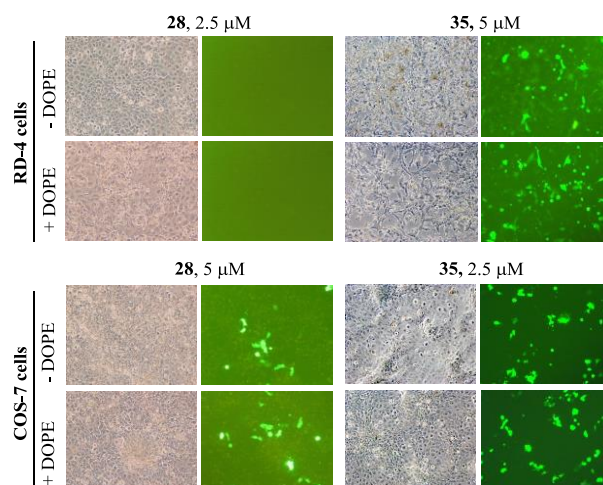


Figure 6.28. Images obtained by fluorescence microscopy of human RD-4 cells (top) and COS-7 cells (bottom) transfected (in green) upon treatment (at 48 h) with EGFP-C1 pDNA 1 nM formulated with guanidine derivatives (**28**, **35**). Images obtained by optical microscopy are also showed.

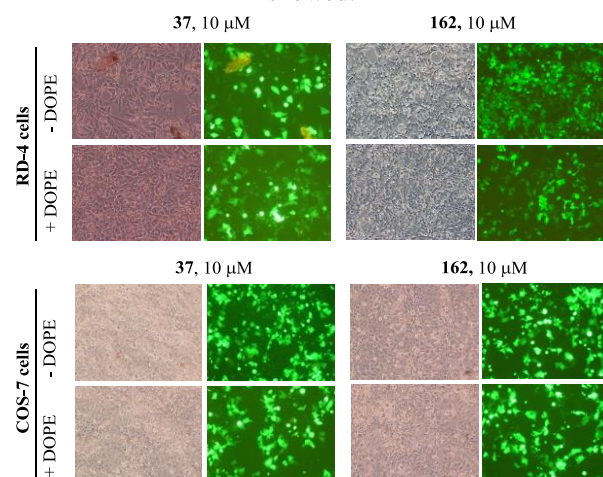


Figure 6.29. Images obtained by fluorescence microscopy of human RD-4 cells (top) and COS-7 cells (bottom) transfected (in green) upon treatment (at 48 h) with EGFP-C1 pDNA 1 nM formulated with amido-arginine CDs derivatives (**37**, **150**). Images obtained by optical microscopy are also showed.

6.3. Conclusions.

The ensemble of results highlight the potential of monodisperse gene vectors in combination with diversity oriented strategies to optimize nucleic acid complexation and delivery properties. This process is cell dependent and requires fine tuning of the structural elements in order to make compatible full compaction and protection of the gene material with cell internalization, endosome escape, complex dissociation and nucleus entering. Previous studies in the CD series supported that in the case of β CD internalization, endosome escape was favored by interactions of the cyclooligosaccharide cavity with membrane components such as cholesterol. This may explain the slightly better transfection properties as compared with CA_4 homologues in COS-7 cell. The key parameter governing transfection efficiency for a given cell type becomes then complex stability, which depends essentially on the cationic head group architecture and the hydrophilic-hydrophobic balance. The presence of hydrogen bond donor functionalities and charged groups was found optimal for this purpose. Whereas the guanidine groups possesses both faculties, its permanent charged character seems to be detrimental for transfection, probably because the lack of buffering capabilities.

Transfection efficiency with CDplexes has also been found to depend strongly on the cell internalization route, which is expected to be strongly cell-dependent. Thus, some endocytosis mechanisms (e.g. caveolin-mediated endocytosis) were found to be productive while others (e.g. clathrin-mediated endocytosis) were not. This may explain the differences observed when comparing the β CD and the CA_4 series in the RD-4 or the COS-7 cells. Further biophysical studies with both types of compounds should through some light in this question and will certainly help to improve the molecular design.

Referencias

- ¹ a) A. Díaz-Moscoso, L. Le Gourrirec, 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, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 12871-12888. b) A. Méndez-Ardoy, K. Urbiola, C. Aranda, C. Ortiz-Mellet, J. M. García-Fernández, C. Tros de Ilarduya, *Nanomedicine* **2011**, *6*, 1697-1707.
- ² V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donofrio, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1721-1728.
- ³ A. Méndez-Ardoy, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, F. Santoyo-González, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5882-5894.
- ⁴ D. A. Balazs, W. T. Godbey, *J. Drug Deliv.* **2011**, Article ID 326497
- ⁵ H. Munch, J. S. Hansen, M. Pittelkow, J. B. Christensena, U. Boas, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3117-3119.
- ⁶ a) F. Sansone, M. Dudic, G. Donofrio, C. Rivetti, L. Baldini, A. Casnati, S. Cellai, R. Ungaro, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14528-14536. b) V. Bagnacani, F. Sansone, G. Donofrio, L. Baldini, A. Casnati, R. Ungaro, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3953-3956.
- ⁷ References related to CuAAC coupling reactions in CDs: (a) S. Srinivasachari, T. M. Reineke, *Biomaterials*, **2009**, *30*, 928-938. (b) J. M. Bryson, W. -J. Chu, J- H. Lee, T. M. Reineke, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 1505-1509. (c) M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Pérez-Balderas, F. Hernández-Mateos, M. D. Girón-González, N. Sevillano-Tripero, R. Salto-González, F. Santoyo-González, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2291-2301. (d) R. J. Pieters, D. T. S. Rijkers, R. M. Liskamp, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1181-1190.
- ⁸ C. Ortiz Mellet, A. Méndez-Ardoy, J. M. García Fernández. Click Multivalent Glycomaterials: Glycoclusters, Glycodendrimers, Glycopolymers, Hybrid Glycomaterials and Glycosurfaces. In *Click Chemistry in Glycoscience: New Developments and*

Strategies, eds. Z. J. Witzcak and R. Bielski, Wiley-VCH, New Jersey, (2013), 143-182. ISBN: 978-1-118-27533-7.

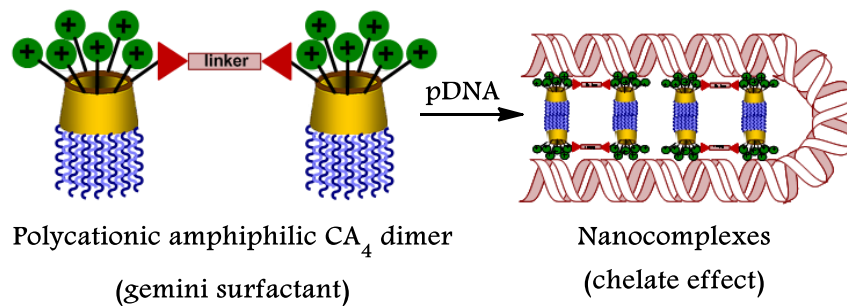
⁹ a) L- Zhao, M. Minsi, D. Corinne, G. Kirsch, *Cancer cell* **2013**, *24*, 689-691. b) C. Zhao, C. Yang, S. Yang, G. Shuhua, Y. Gao, J. Wang, *International Journal of Oncology* **2013**, *43*, 1253-1259.

¹⁰ a) L. Wasungu, D. Hoekstra, *J. Controlled Release* **2006**, *116*, 255-264. b) H. Farhood, N. Serbina, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1235*, 289-295.

Capítulo 7

Síntesis de calixarenos policationicos anfifílicos diméricos.

Abstract. gemini surfactants exhibit enhanced transfection properties respect their corresponding monomers. This is a result of a chelate effect together with the decrease of the critical micelar concentracion (cmc) that lead to smaller effective concentration for therapeutic purposes and, therefore, less toxicity levels. Here we report a highly efficient synthetic method of polycationic amphiphilic dimeric calix[4]arene (CA₄) derivatives consisting of two units of hexylated-CA₄ linked by a hexamethylene spacer. This strategy is expected to optimize the gene delivery abilities of monodisperse vectors based on multivalent calixarene and cyclodextrin scaffolds.



7. Calixarenos policationicos anfifílicos diméricos

7.1. Antecedentes bibliográficos.

Los derivados de ciclodextrinas y calixarenos policationicos anfifílicos han demostrado ser excelentes vectores sintéticos de ácidos nucleicos en los que la anfifilicidad facial, la disposición multivalente y el ajuste fino hidrofilia-hidrofobia juegan un papel fundamental. Su eficiencia de transfección y su baja toxicidad los sitúan en una posición de privilegio en el campo del transporte de genes. Además, su carácter monodisperso les otorga una ventaja fundamental respecto a los derivados poliméricos.

Si bien estos derivados presentan una estructura macrocíclica en la que se incorporan grupos funcionales catiónicos y cadenas lipófilas separados en el espacio, otra aproximación en la que se pueden conseguir estas propiedades, sin perder la monodispersidad molecular, se basa en los llamados “surfactantes gemelos”, término acuñado por Menger y Littau en 1991.^{1,2} Se trata de una clase de moléculas anfifílicas que contienen dos grupos polares (con carga positiva, negativa o neutra) y dos cadenas alifáticas, unidas por un espaciador rígido o flexible de longitud variable (Figura 7.1).³ Se caracterizan porque sus propiedades surfactantes son muy superiores a las de los correspondientes monómeros que los constituyen. Su capacidad de reducir la tensión superficial del agua es entre 10 y 100 veces superior a la de los surfactantes convencionales y presentan una concentración micelar crítica (c.m.c.) que suele ser un orden de magnitud menor que los correspondientes monómeros constituyentes. El impacto económico de estas propiedades se ha visto reflejado en el crecimiento del número de aplicaciones de los surfactantes gemelos,⁴ fundamentalmente en la industria de detergentes,⁵ acabado de textiles,⁶ inhibidores de la corrosión y pinturas,⁷ desarrollo catalizadores micelares,⁸ preparación de zeolitas mesoporosas⁹ y preparación de agentes antimicrobianos.¹⁰ Los bajos valores de c.m.c de los surfactantes gemelos posibilita la

disminución de la concentración efectiva en aplicaciones tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual supone una importante ventaja para su empleo como transportadores de genes.¹¹

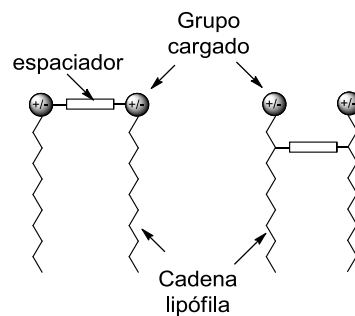


Figura 7.1. Representación esquemática de la estructura de los surfactantes gemelos.

Su estructura singular y la posibilidad de modificaciones estructurales en cada una de las unidades constituyentes, así como en el espaciador, ofrece un amplio abanico de oportunidades para modular su capacidad de complejación y encapsulación de carga específica y controlada.^{12, 13} Kirby y colaboradores han evaluado veinte modelos estructurales diferentes y han llevado a cabo estudios de estructura-actividad para identificar las características necesarias para conseguir una actividad de transfección óptima. Los sistemas que mostraron mejores resultados fueron dímeros de cisteína, de espermina, de ácidos carboxílicos y de aminas simétricas (Figura 7.2). Estos derivados presentan una parte hidrófoba constituida por cadenas de ácidos grasos naturales y los grupos polares son oligopéptidos basados en aminoácidos naturales, aunque algunos de los vectores más efectivos fueron derivados de carbohidratos.³

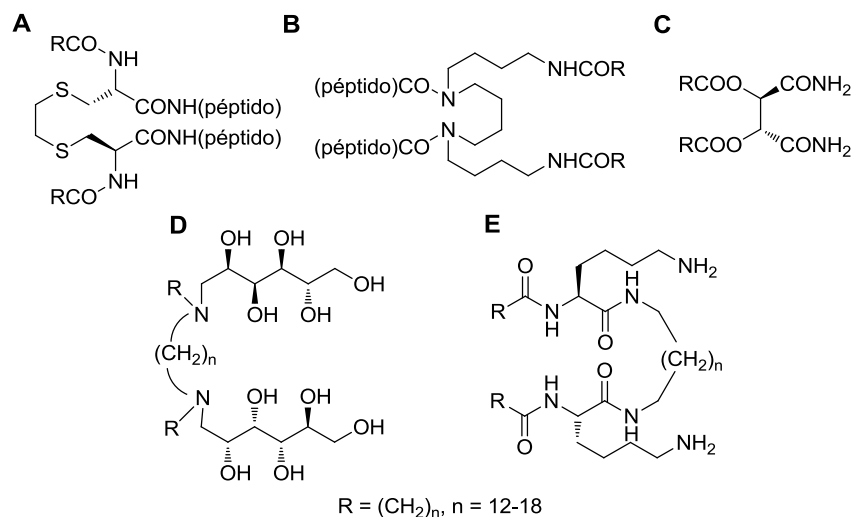


Figura 7.2. Surfactantes gemelos derivados de cisteína (A), espermina (B), ácidos dicarboxílicos (C), carbohidratos (D) y diaminas (E).

Un estudio reciente ha demostrado que la adición de dímeros anfifílicos derivados de piridinas a formulaciones de lípidos catiónicos reduce la carga positiva necesaria para compactar totalmente el ADN, mostrando una eficiencia de transfección muy superior respecto a los preparaciones que carecían de surfactantes gemelos (Figura 7.3).¹⁴

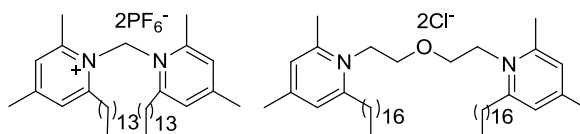


Figura 7.3. Surfactantes gemelos derivados de piridina.

Aicart y colaboradores han estudiado la influencia de la longitud del espaciador de surfactantes gemelos derivados de hexadecil dimetil amonio.¹⁵ Se observó que los dímeros con espaciadores cortos (de dos y cinco metilenos) presentaron mayores eficiencias de transfección que aquéllos con espaciadores más largo (Figura 7.4).

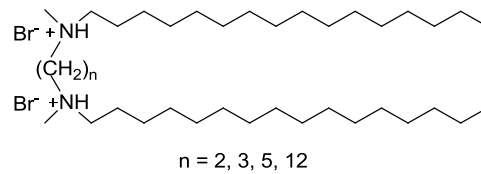


Figura 7.4. Surfactantes gemelos derivados de hexadecil dimetil amonio.

Se ha observado que la incorporación de sustituyentes imino en el espaciador de los surfactantes gemelos implica mejora en las propiedades de transfección.¹⁶ Así, el bromuro de 1,9-bis-(dodecil)-1,1,9,9-tetrametil-5-imino-1,9-nonanodiamonio (Figura 7.5) presentó una eficiencia de transfección nueve veces superior respecto al derivado que carece que grupo imino. Se observaron variaciones de tamaño y potencial ζ de los complejos con ADN que dependían del pH, propiedad atribuída al grupo imino. Estos cambios en la estructura de la nanopartícula probablemente están asociados a la liberación del material génico y, por tanto, a su mejora en las propiedades de transfección.

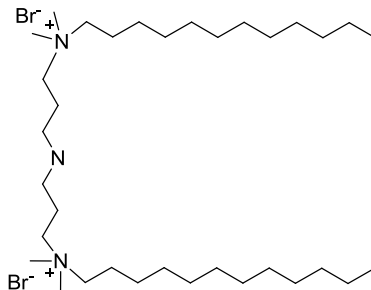


Figura 7.5. Surfactantes gemelos con espaciadores de tipo imina.

También se han descrito lípidos catiónicos diméricos derivados de colesterol cuyas propiedades como vectores de genes fueron superiores a las de sus correspondientes monómeros (Figura 7.6).¹⁷ En presencia de suero se observó una disminución drástica de la eficiencia de transfección de los derivados monoméricos mientras que los compuestos con estructura de tipo surfactantes gemelos mantuvieron sus niveles de transfección de ADN.

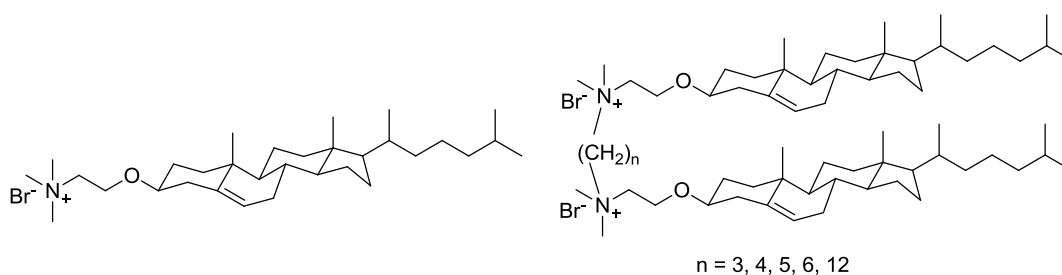


Figura 7.6. Surfactantes gemelos derivados del colesterol.

Cabe destacar el agente de transfección comercial NeoPhectin®, que es un dímero catiónico derivado de cardiolipina, un lípido natural, capaz de promover la transfección de ADN y de siARN tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 7.7).¹⁸

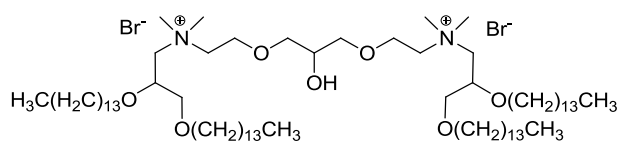


Figura 7.7. NeoPhectin®, surfactante gemelo basado en cardiolipina.

Los ejemplos de surfactantes gemelos cuyas unidades constituyentes sean plataformas multivalentes son más escasos. No obstante, se ha descrito la preparación de sistemas multicalixareno capaces de reforzar las interacciones cooperativas entre las unidades de calixareno policatiónicos anfifílicos y el ADN.¹⁹ Así, el tetrámero de

calixareno **161** es capaz de promover la transfección, a diferencia de su monómero **161** (Figura 7.8).

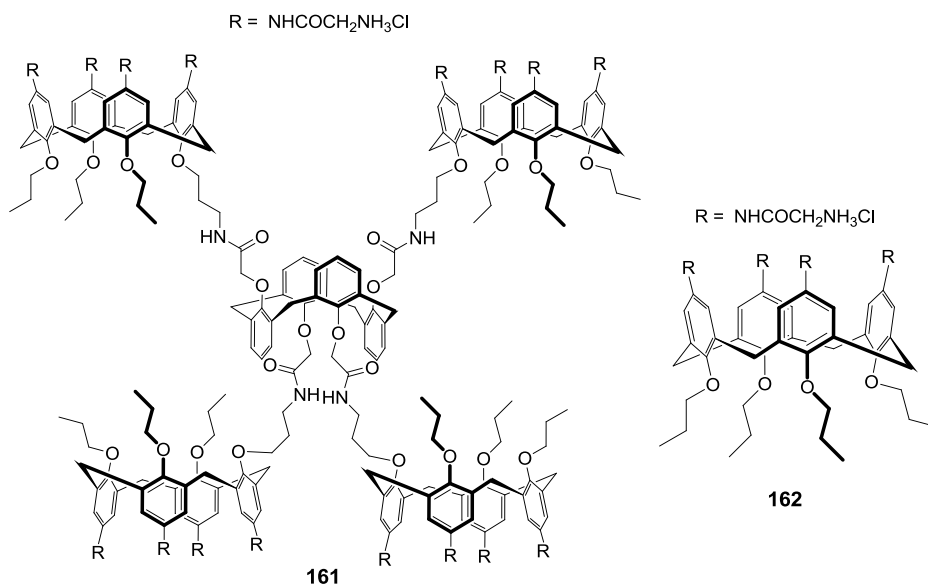
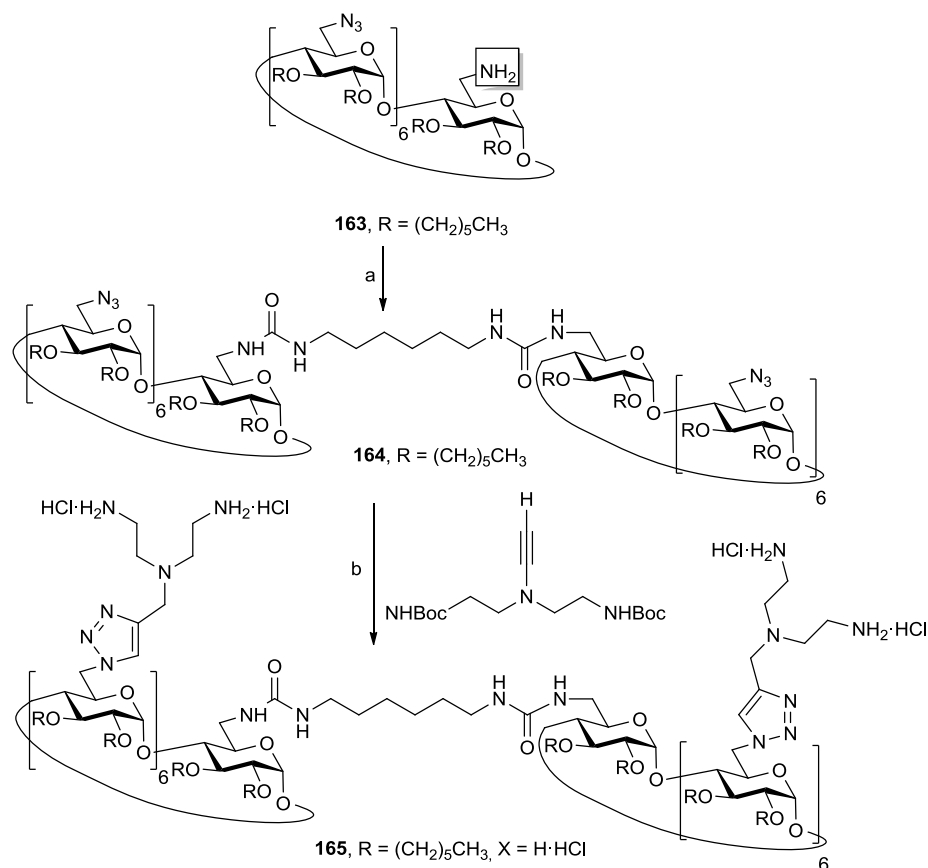


Figura 7.8. Derivado de calixareno policatiónico anfifílico y sistema multicalixareno.

En nuestro grupo de investigación se ha descrito la preparación de derivados de β -ciclodextrinas policatiónicas anfifílicas homodiméricas con estructura de surfactantes gemelos. Su preparación hace uso de un método de funcionalización selectiva de una poliazida, en concreto la mono-reducción de uno de los siete grupos azida de derivados de per-(C-6)azido- β -CD que presentan grupos alquílicos de cadena larga en la cara secundaria del macrociclo.



Esquema 7.1. Preparación de los homodímeros de CDs polianiónicas. Reactivos y condiciones: a) $\text{OCN}(\text{CH}_2)_2\text{NCO}$, Et_3N , DCM , 12 h, 93-74%; b) i. $\text{CuI} \cdot \text{P}(\text{EtO})_3$, DIPEA , ${}^t\text{BuOH-H}_2\text{O}$ 6:1, reflujo, 12 h, 89% ; ii. TFA-DCM 1:1, 2 h, 99%.

Para ello se empleó el sistema 1,3-propanoditiol/ NaBH_4 en isopropanol,^{20,21} que permitió acceder al derivado de βCD que presentan un grupo amino y seis grupos azida en la cara primaria (**163**), las cuales constituyen unidades de base muy adecuadas para el desarrollo de sistemas homodiméricos. Esta estrategia ha sido aplicada por nuestro grupo en casos más sencillos³ y permite simplificar enormemente la síntesis. Recientemente hemos puesto a punto una versión en fase sólida de monorreducción de azidas.⁴ La posterior reacción de acoplamiento con 1,6-hexametilendiisocianato (\rightarrow **164**) en combinación con

metodologías de tipo “click” chemistry condujo a la estructura *gém*ini deseada (→ 165, Esquema 7.1).

Resultados preliminares no publicados han mostrado que, los derivados obtenidos, con estructura de tipo surfactante gemelo, presentan propiedades de complejación, compactación, protección y transfección de ADN superiores a los correspondientes monómeros de paCD, probablemente gracias a un efecto de tipo quelato (Figura 7.9).

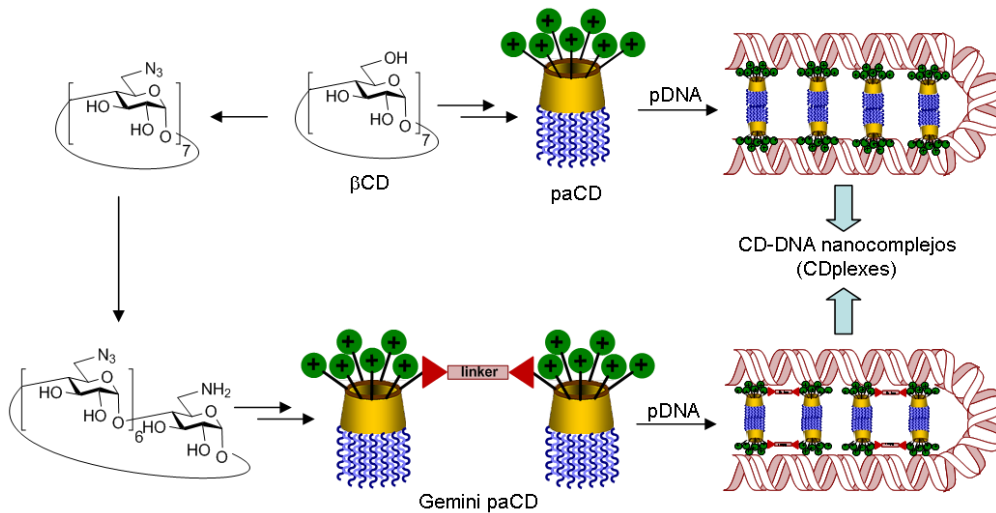


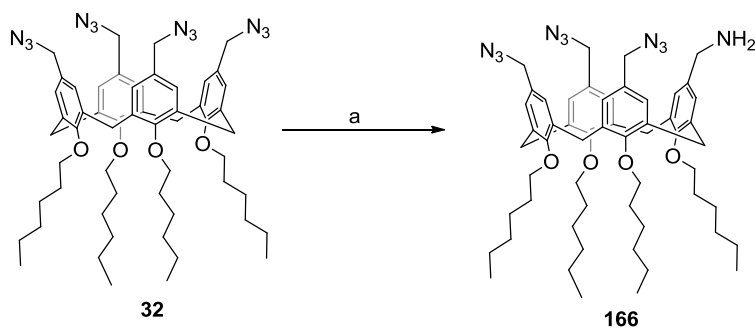
Figura 7.9. Representación esquemática de los derivados de paCD monoméricos y diméricos tipo “gém”ini” y de su ordenamiento en bicapas en presencia de un ácido nucleico.

En base a estos resultados nos hemos propuesto la preparación de dímeros policatiónicos anfifílicos derivados de ciclodextrinas y calixarenos. Ambos han demostrado ser excelentes plataformas para la preparación de sistemas anfifílicos, de modo que los dos tipos de macrociclos podrían emplearse en la preparación de sistemas diméricos con estructura basada en los surfactantes gemelos, en la que un espaciador sirva para conectar dos unidades de CDs y/o calixarenos policatiónicos y anfifílicos.

7.2. Resultados y discusión.

7.2.1. Síntesis de derivados de calixarenos anfifílicos diméricos.

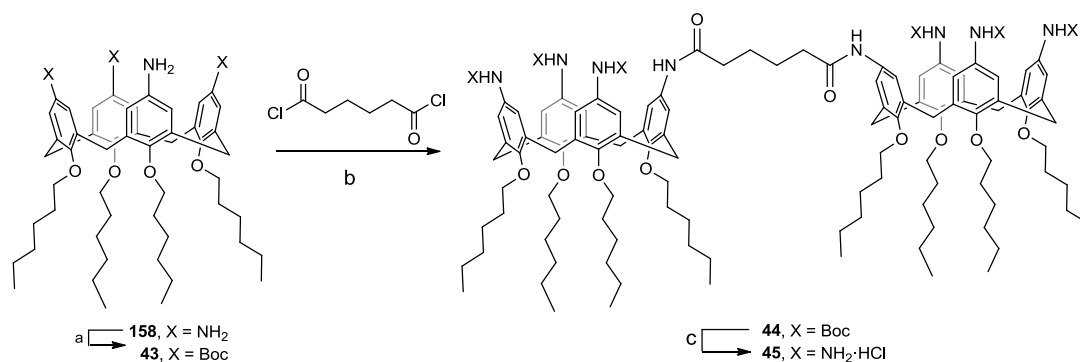
La preparación de dímeros de calixareno requiere la desimetrización de los derivados alquilados de calix[4]areno, que implica la funcionalización selectiva de una de las unidades aromáticas del macrociclo. En primer lugar implementamos la metodología de monorreducción de poliazidas previamente utilizada con éxito en derivados de CDs. El tratamiento de la tetra-azida de calixareno, **32**, con propanoditiol y NaBH₄ condujo a la correspondiente monoamina **166** adecuada para la preparación de sistemas de calixarenos diméricos (Esquema 7.2).



Esquema 7.2. Monorreducción de una poliazida de calixareno. Reactivos y condiciones: a) 1,3-propanoditiol, NaBH₄, DMF, ta, 24 h, 17%.

Este método permite seguir una estrategia sintética similar a la que condujo a los derivados anfifílicos diméricos. Sin embargo, aunque el compuesto de partida se pueda recuperar durante la purificación del producto, el bajo rendimiento obtenido junto con el relativamente elevado número de etapas que requiere la preparación de la tetraazida **32**, nos planteamos el empleo de un método de funcionalización selectiva que permitiera el acceso a monoaminas de calixareno con un rendimiento mayor y que, además, utilizase como compuesto de partida derivados asequibles en pocas etapas. Con este objetivo nos

planteamos la protección de tres de los cuatro grupos amino del derivado **158** (que se obtiene en cuatro etapas a partir de calix[4]areno con un rendimiento global del 80%) mediante el empleo de di-*tert*-butildicarbonato (**158** → **43**, Esquema 7.3). El control de los equivalentes de reactivo empleado, así como de la temperatura y de las concentraciones usadas, permitió obtener el derivado **43** con un 54% de rendimiento. El posterior acoplamiento de tipo amida empleando cloruro de adipóilo (**43** → **44**) condujo al dímero de calixareno que presenta un espaciador de seis átomos de carbono. La desprotección de los seis grupos amina en condiciones ácidas seguido de liofilización con HCl aq. llevó a la obtención del dímero de calixareno anfifílico **45**, que presenta dos unidades macrocíclicas idénticas, cada una de las cuales tiene tres grupos amino y cuatro cadenas de hexilo.



Esquema 7.3. Preparación de los dímeros de calixarenos homodiméricos. Reactivos y condiciones: a) Boc₂O, DCM, 0°C → t.a., 12 h, 54%; b) DMAP, DIPEA, DCM, t.a., 12 h, 92%; c) i. DCM-TFA 1:1, t.a., 12 h, cuant. ii. HCl 0.1 M.

El derivado **45** no sólo presenta interés en sí mismo por tratarse de un surfactante gemelo cuyo comportamiento puede compararse con el derivado monomérico **158** sino que, además, resulta ser un intermedio sintético muy adecuado para la modificación de los grupos catiónicos situados en la cara superior y así poder llevar a cabo estudios de estructura-actividad.

Todos los dímeros se obtuvieron con excelentes rendimientos. Sus estructuras se confirmaron por espectrometría de masas, ^1H RMN y análisis elemental. En la Figura 7.10 se muestra el espectro de masas del derivado **44**, donde aparecen los picos correspondientes a $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$.

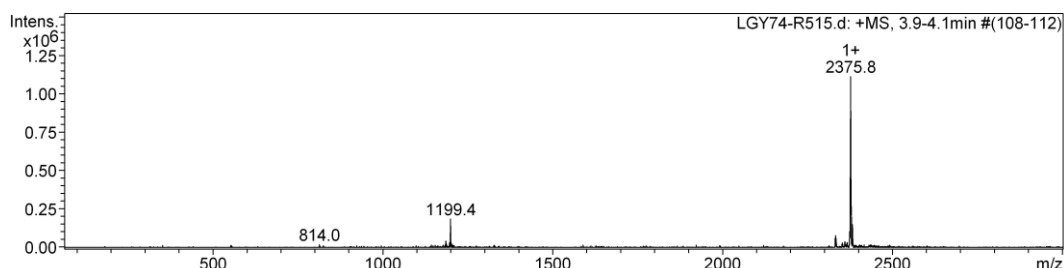


Figura 7.10. Espectro de masas en modo ESI del compuesto **44**.

3. Conclusiones.

Se ha puesto a punto una síntesis eficiente de derivados de calix[4]areno con estructura tipo *gemin*i, que son muy adecuados para la preparación de compuestos anfifílicos policatiónicos diméricos. El hexaisotiocianato **48** puede emplearse para la preparación de dímeros funcionalizados con seis grupos catiónicos de tipo tiourea a partir de su acoplamiento con las correspondientes aminas, mientras que la hexazida **47** puede acoplarse con distintos derivados de alquino mediante una reacción de CuAAC para dar compuestos con seis anillos de triazol. Esto permitirá hacer estudios de complejación de ADN y de eficacia de transfección de los compuestos obtenidos. Así mismo, la comparación de las propiedades de los surfactantes gemelos con los correspondientes calixarenos monoméricos constituyentes y con las ciclodextrinas monoméricas y diméricas conducirá a la identificación de estructuras óptimas de vectores sintéticos de material génico. Este trabajo se está desarrollando actualmente en nuestro grupo de investigación.

Referencias

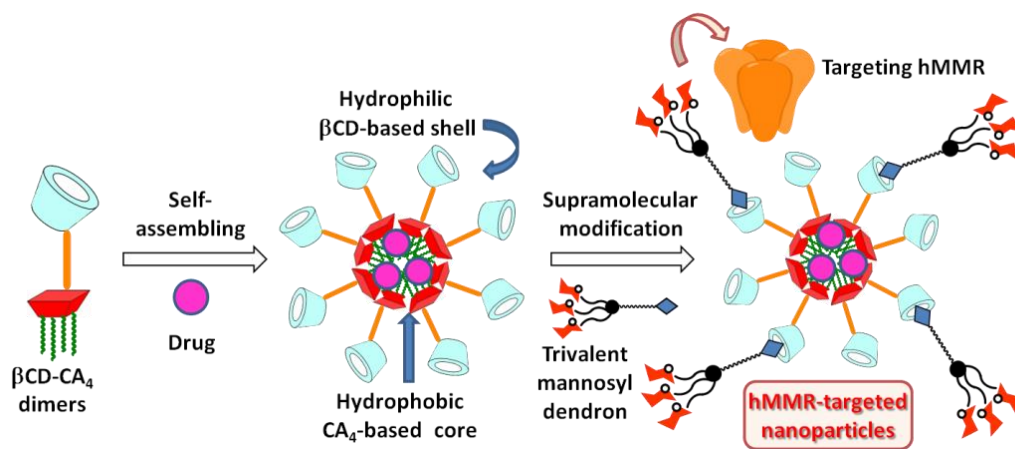
- ¹ F. M. Menger, J. S. Keiper, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1906-1920.
- ² (a) F. M. Menger, C. A. Littau, C. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *113*, 1451-1452; (b) Han, Y.; Wang, Y. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 1939-1956.
- ³ A. J. Kirby, P. Camilleri, J. B. F. N. Engberts, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, O. S. Derman, M. Bergsma, P. C. Bell, M. L. Fielden, C. L. García Rodríguez, P. Gudat, A. Kremer, C. McGregor, C. Perrin, G. Ronsin, M. C. P. van Eijk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1448– 1457.
- ⁴ N. Kumar, R. Tyagi, *J. Dispersion Sci. Technol* **2014**, *35*, 205–214.
- ⁵ M. J. Rosen, D. J. Tracy, *J. Surfact. Detergents* **1998**, *4*, 547-554.
- ⁶ a) Y. P. Zhu, A. Masuyama, Y. Kobata, Y. Nakatsuji, M. Okahara, M. J. Rosen, *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *158*, 40; b) T.S. Choi, Y. Shimizu, H. Shirai, K. Hamada, *Dyes Pigments* **2001**, *48*, 217.
- ⁷ C. C. Esposio, *Coatings World* **2002**, *3*, 50.
- ⁸ L. Guang Qiu, A. J. Xie, Y. H. Shen, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2005**, *260*, 251.
- ⁹ M. Bnjelloun, P. V. D. Voort, P. Cool, O. Collart, E. F. Vansant, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 127.
- ¹⁰ T. S. Kim, T. Kida, Y. Nakatsuji, T. Hirao, I. Ikeda, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 907.
- ¹¹ (a) A. J. Kirby, P. Camilleri, J. B. F. N. Engberts, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, O. Söderman, M. Bergsma, P. C. Bell, M. L. Fielden, C. L. García Rodríguez, P. Guédat, A. Kremer, C. McGregor, C. Perrin, G. Ronsin, M. C. P. van Eijk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1448-1457; (b) C. Bombelli, L. Giansanti, P. Luciani, G. Mancini, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 171- 183.
- ¹² A. A. Yaroslavov, O. Y. Udalykh, S. Melik-Nubarov, V. A. Kabanov, Y. A. Ermakov, V. A. Azov, F. M. Menger, *Chem. Eur. J.* **2001**, 4835-4843.

-
- ¹³ R. Zana, *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *248*, 203-220.
- ¹⁴ a) V. D. Sharma, J. Lees, N. E. Hoffman, E. Brailoiu, M. Madesh, S. L. Wunder, M. A. Ilies, *Mol. Pharmaceutics* **2014**, *11*, 545–559; b) V. D. Sharma, E. O. Aifuwa, P. A. Heiney, M. A. Ilies, *Biomaterials* **2013**, *34*, 6906-6921.
- ¹⁵ M. Muñoz-Úbeda, S. K. Misra, A. L. Barrán-Berdón, S. Datta, C. Aicart-Ramos, P. Castro-Hartmann, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya, E. Aicart, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3926–3937.
- ¹⁶ S. D. Wettig, I. Badea, M. Donkuru, R. E. Verrall, M. Foldvari, *J. Gene Med.* **2007**, *9*, 649 – 658.
- ¹⁷ a) A. Bajaj, P. Kondiah, S. Bhattacharya, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2432-2442; b) J. Biswas, S. K. Mishra, P. Kondaiah, S. Bhattacharya, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 4600-4613.
- ¹⁸ P. Y. Chien, J. Wang, D. Carbonaro, S. Lei, B. Milerr, S. Sheikh, S. M. Ali, M. U. Ahmad, I. Ahmad, *Cancer Gene Ther.* **2005**, *12*, 321-328.
- ¹⁹ R. Lalor, J. L. DiGesso, A. Mueller, S. E. Matthews, *Chem. Commun.* **2007**, 4907-4909.
- ²⁰ J. Katajisto, T. Karskela, P. Heinonen, H. Lönnberg, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7995-8001.
- ²¹ (a) D. Rodríguez-Lucena, C. Ortiz Mellet, C. Jaime, K. K. Burusco, J. M. García Fernández, Benito, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2997-3008. (b) D. Rodríguez-Lucena, J. M. Benito, E. Álvarez, C. Jaime, J. Pérez-Mirón, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2003**, *73*, 2967-2979.

Capítulo 8

Nanotransportadores de medicamentos biorreconocibles mediante autoensamblaje de heterodímeros calixareno–ciclodextrina anfifílicos

Abstract. neutral amphiphilic heterodimers consisting of a hydrophobic calix[4]arene moiety and a hydrophilic β -cyclodextrin head have been synthesized. They are able to self-assemble in water to form nanoparticles with a lipophilic calixarene-based core and a hydrophilic CD-based external shell. Their potential in nanomedicine is illustrated by their capacity to encapsulate and provide sustained release of the anxiolytic Diazepam and the anticancer drug docetaxel and undergo surface post-modification with glycoligands to target the human macrophage mannose receptor.



8. Nanotransportadores de medicamentos biorreconocibles mediante autoensamblaje de heterodímeros calixareno-ciclodextrina anfífilicos.

8.1. Antecedentes bibliográficos.

El éxito de la administración de agentes terapéuticos depende, en muchos casos, del desarrollo de sistemas de transporte de fármacos capaces de mejorar la biodisponibilidad de principios activos insolubles o biodegradables y de evitar efectos secundarios mediante un transporte dirigido a receptores específicos.^{1,2,3} La propiedad que presentan los derivados de ciclodextrinas⁴ y calixarenos⁵ para encapsular una gran variedad de moléculas orgánicas, así como su capacidad para formar nanopartículas y vesículas con una mayor capacidad de carga, los sitúan en una posición de privilegio en el campo de los sistemas transportadores de fármacos.⁶ Se trata de compuestos monodispersos, comercialmente accesibles, biocompatibles,⁷ que pueden ser funcionalizados regioselectivamente.⁸ Además, ambos macrociclos presentan polaridades complementarias por lo que la preparación de sistemas nanomoleculares que combinen sus diferentes características es de interés fundamental en biotecnología y medicina.⁹

Existen ejemplos previamente descritos acerca del uso de calixarenos funcionalizados con unidades de ciclodextrina, como los derivados fluorescentes preparados por Reinhoudt y colaboradores¹⁰ para la determinación de analitos neutros en medio acuoso, con estructura de dímeros formados por unidades de β CD y calixarenos anfífilicos funcionalizados con una sonda fluorescente (**169**). Estos derivados forman sistemas nanoparticulares consistentes en agregados en forma de fibra en las que la cavidad de la CD se encuentra uniformemente ocupada con la sonda fluorescente debido a fenómenos de inclusión intermolecular (Figura 8.1, A).

Otros autores han preparado productos de acoplamiento β CD-CA₄, por acoplamiento de la mono-6-etilendiamina-6-desoxi- β CD con un derivado de

calix[4]areno modificado con un grupo formilo (**170**), capaces de adsorber azul de metileno desde un medio acuoso (Figura 8.1, B).

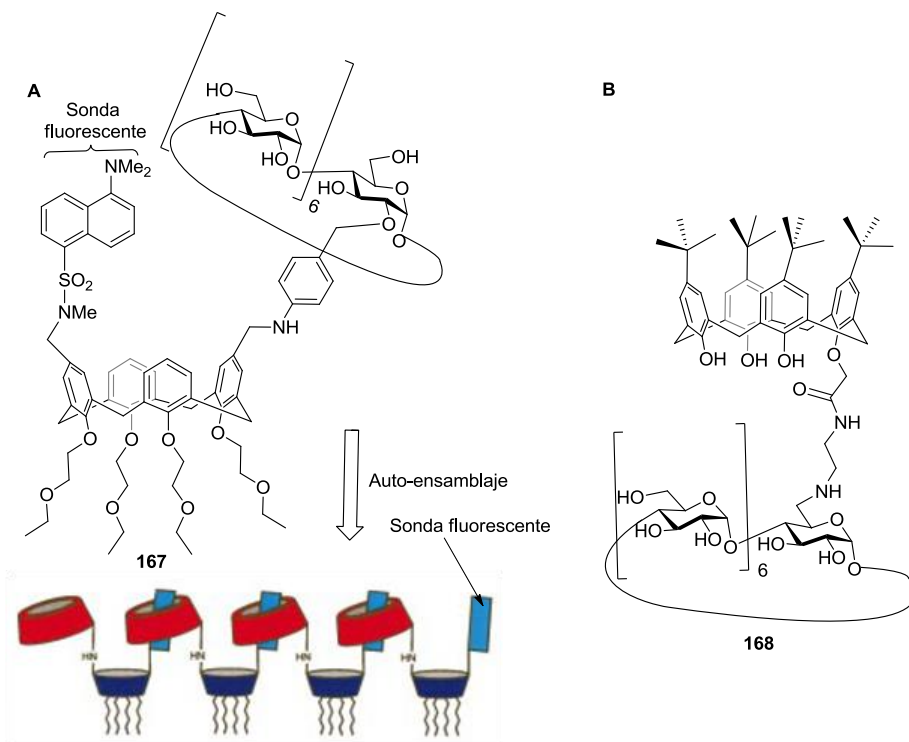


Figura 8.1. Ejemplos de estructuras de conjugados CA₄-βCD: A. Sistemas preparados por Reinhoudt y col. y representación esquemática de la estructura de los agregados que forman. B. Sistemas de encapsulación de azul de metileno.

A la vista de estos antecedentes nos propusimos, en colaboración con los Prof. A. Casnati y F. Sansone de la Universidad de Parma (Italia), la preparación de nanopartículas consistentes en un núcleo formado por unidades hidrofóbicas de calix[4]arenos (CA₄) y una corona externa hidrofílica con unidades de β-ciclodextrina (βCD), formadas por auto-ensamblado en medio acuoso de heterodímeros anfífilicos CA₄-βCD. La plataforma de CA₄, funcionalizada con cadenas grasas en la cara más estrecha de su conformación de cono, proporciona una matriz lipídica desde la que puede

liberarse de manera controlada un fármaco, y la presencia de unidades de β CD en la superficie permitiría la solubilización en agua de la nanopartícula así como la post-modificación a través de interacciones supramoleculares de tipo receptor-huésped para la incorporación de epítomos para la vectorización.¹¹ (Figura 8.2).

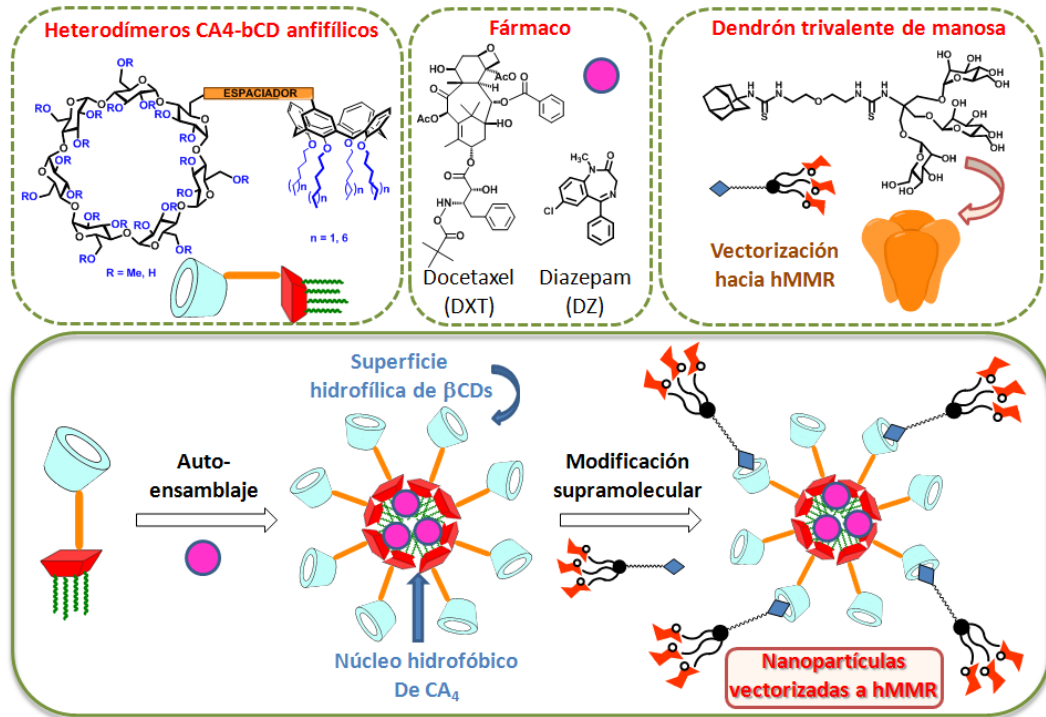


Figura 8.2. Representación de las estructuras de los heterodímeros CA₄-β-CD y de los procesos de auto-ensamblado en agua para formar nanopartículas y de modificación supramolecular para la vectorización a receptores biológicos.

Para confirmar la hipótesis se han escogido, como fármacos, el diazepam, una benzodiazepina con propiedades ansiolíticas, y el docetaxel (DXT), un agente antimetabólico usado en el cáncer de páncreas, mama, pulmón y cuello.¹² Como agente de vectorización se ha empleado un dendrón de adamantano-manopiranosilo que proporciona afinidad hacia el receptor de manosa localizado en la membrana celular de

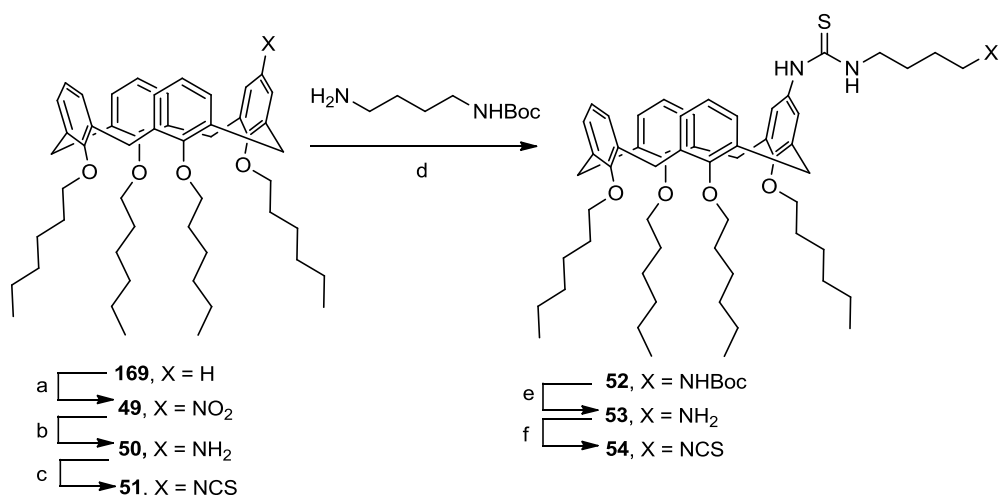
macrófagos humanos (hMMR, *human Mannose Macrophage Receptor*).¹³ El prototipo de heterodímero diseñado presenta una geometría concebida para evitar fenómenos de auto-inclusión. Cabe esperar un ordenamiento compacto que evite la formación de oligómeros monodimensionales y origine nanopartículas esféricas cuya fuerza impulsora sean las interacciones hidrofóbicas entre los fragmentos de calixareno.

8.2. Resultados y Discusión

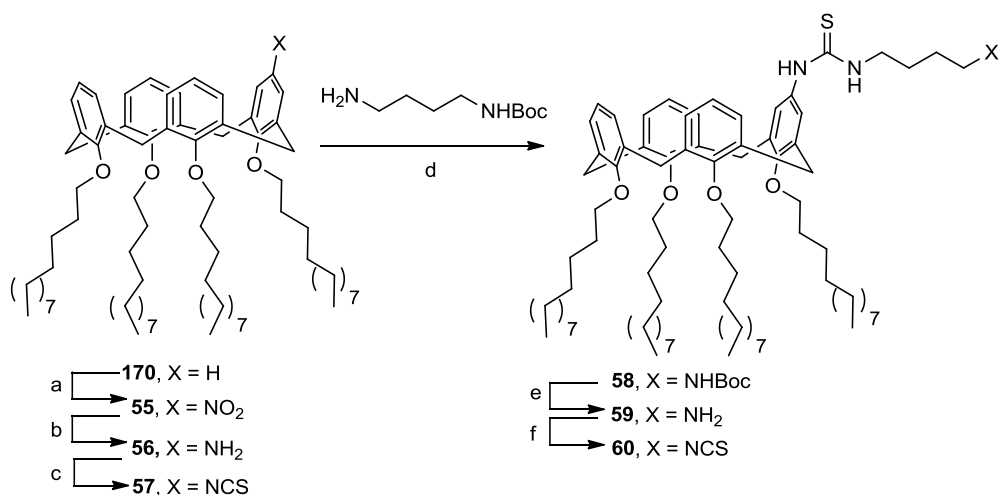
8.2.1. Síntesis de heterodímeros CA₄-βCD.

Con el objetivo de llevar a cabo estudios de la relación estructura-actividad, se han diseñado heterodímeros de CA₄-βCD con diferentes modificaciones que pueden afectar a sus propiedades supramoleculares: la longitud de la cadena alquílica en la unidad hidrófoba de calixareno (hexilo o dodecilo), la naturaleza de los grupos funcionales en el fragmento de ciclodextrina (hidroxilo o metilo) y la longitud del espaciador que conecta los dos macrociclos. Los heterodímeros se prepararon siguiendo una estrategia convergente. Para ello se llevó a cabo el acoplamiento entre unidades de calix[4]areno, funcionalizados con un grupo isotiocianato, y mono-aminas derivadas de la β-ciclodextrina mediante la reacción de formación de tiourea, lo que requiere métodos de funcionalización selectiva de ambas plataformas.

La etapa clave en la síntesis de derivados de CA₄ monosustituidos de manera asimétrica es la mononitración de los correspondientes éteres tetra-hexilado (**169**→**49**)¹⁴ y dodecilado¹⁵ (**170**→ **49**), que tiene lugar con rendimientos de 75-76%, por tratamiento con HNO₃ concentrado en una mezcla de diclorometano y ácido acético glacial. Las etapas posteriores de reducción a las correspondientes aminas (→ **50** y **56**), isotiocianación (→ **51** y **57**), acoplamiento con butilendiamina mono-Boc-protégida (→ **52** y **58**), hidrólisis del grupo carbamato (→ **53** y **59**) e isotiocianación (→ **54** y **60**), transcurrieron con excelentes rendimientos (Esquemas 8.1. y 8.2.).



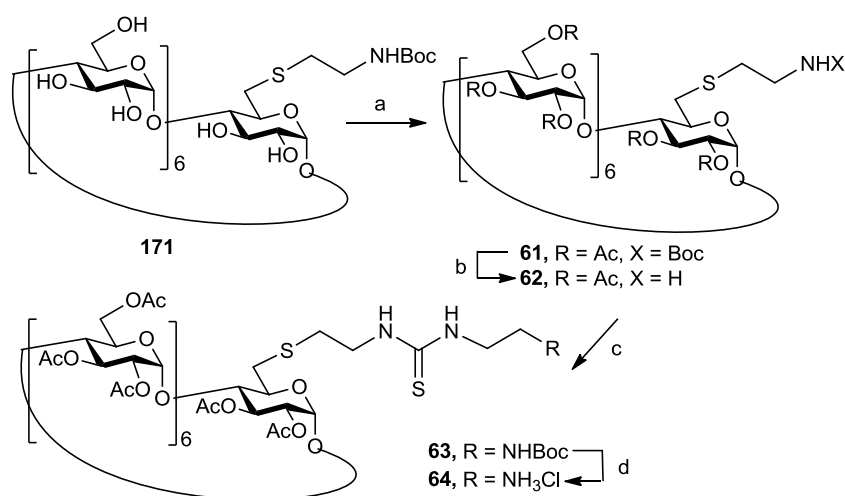
Esquema 8.1. Preparación de los derivados de CA₄ *O*-hexilados. Reactivos y condiciones: (a) HNO₃, AcOH, DCM, t.a., 40 min., 76%; (b) H₂N-H₂N·H₂O, Pd/C, EtOH, reflujo, 6 h, 93%; (c) CSCI₂, Et₃N, tolueno, t.a., 5 h, 90%; (d) Et₃N, DCM, t.a., 16 h, 99%; (e) i. 1:10 TFA-DCM, t.a., 1 h, 99%, ii. HCl aq. (f) i. CS₂, Et₃N, EtOH, t.a., 2 h, ii. Boc₂O, DMAP, EtOH, 0 °C → t.a., 2 h, 99%.



Esquema 8.2. Preparación de los derivados de CA₄ *O*-dodecilados. Reactivos y condiciones: (a) HNO₃, AcOH, DCM, t.a., 40 min., 75%; (b) H₂N-H₂N·H₂O, Pd/C, EtOH, reflujo, 16 h, 97%; (c) CSCI₂, tolueno, t.a., 16 h, 92%; (d) Et₃N, DCM, t.a., 16 h, 99%; (e) 1:1 TFA-DCM, t.a., 1 h, 99%; (f) i. CS₂, Et₃N, EtOH, t.a., 2 h, ii. Boc₂O, DMAP, EtOH, 0 °C → t.a., 2 h, 93%.

La preparación de los derivados de β CD selectivamente funcionalizados con un grupo amino se llevó a cabo a partir del derivado 6^L-etiltio-6^L-desoxi- β CD (**171**).^{13b} La acetilación de los grupos hidroxilo libres (\rightarrow **61**) seguida de hidrólisis ácida del grupo carbamato con ácido trifluoroacético, condujo al derivado **62**, que presenta un espaciador corto entre el grupo amino y el macrociclo.

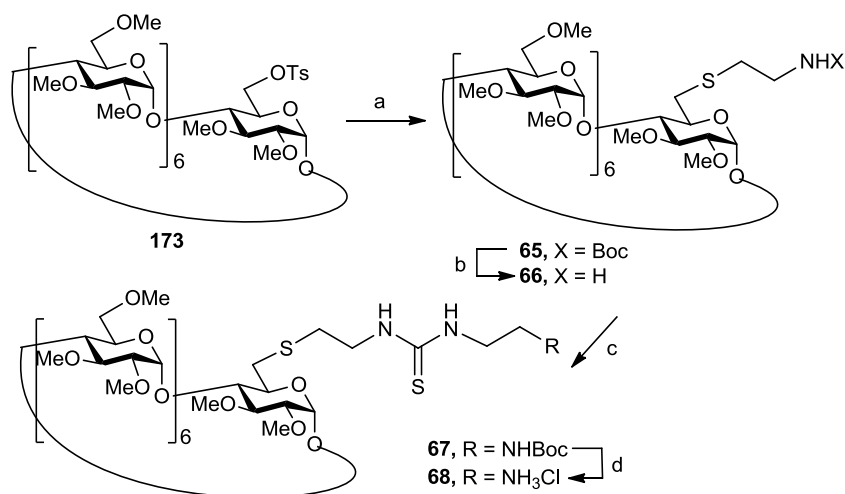
El acoplamiento de **62** con 4-(*tert*-butoxicarbonilamino)etilisotiocianato **172**¹⁶ (\rightarrow **63**) y la posterior hidrólisis ácida del carbamato, permitió el acceso al derivado **64**, que presenta una mayor distancia entre el grupo amino y el núcleo de β CD que su homólogo **62** (Esquema 8.3).



Esquema 8.3. Preparación de las β CD per-acetiladas **62** y **64**. Reactivos y condiciones: (a) Ac_2O -Py, DMAP, $0^\circ C \rightarrow$ t.a., 16 h, 75%; (b) 1:1 TFA-DCM, 1 h, t.a., 90%; (c) $NCS(CH_2)_2NHBoc$, Et_3N , DCM, t.a., 16 h, 91%; (d) 1:1 TFA-DCM, t.a., 2 h, 99%.

Los derivados de β CD metiladas se obtuvieron con muy buenos rendimientos a partir del derivado mono-*O*-6-tosilado permetilado, **173**.¹⁷ El desplazamiento nucleofílico del grupo *p*-toluensulfonilo por 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etanotiol (cisteamina-Boc) en presencia de carbonato de cesio (\rightarrow **65**), seguido de hidrólisis ácida del carbamato, dió lugar al compuesto **65**. Su acoplamiento con 4-(*tert*-butoxicarbonilamino)-

etilisotiocianato (\rightarrow **67**) y posterior desprotección selectiva del carbamato condujo a **68** (Esquema 8.4.).

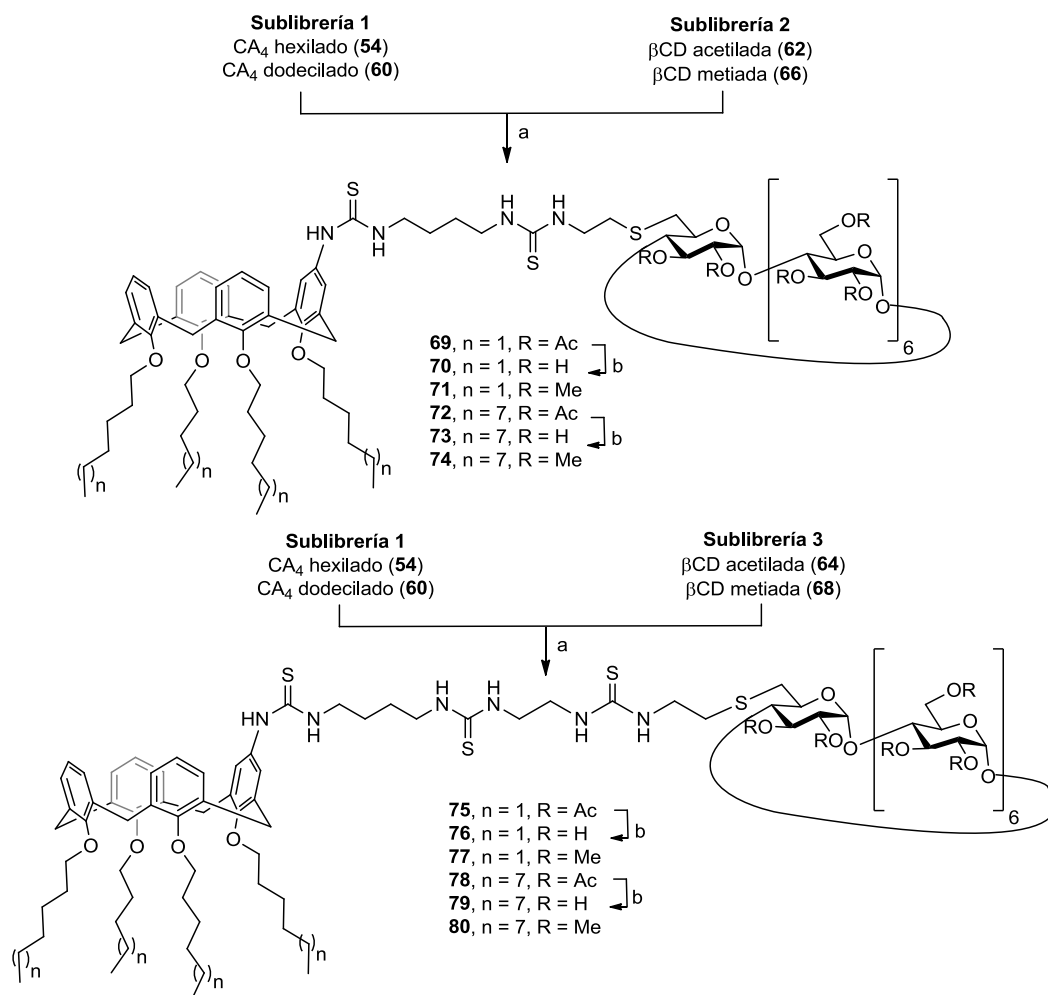


Esquema 8.4. Preparación de las β CD permitiladas **66** y **68**. Reactivos y condiciones: (a) HS(CH₂)₂NHBoc, Cs₂CO₃, DMF, 70 °C, 24 h, 97%; (b) 1:1 TFA-DCM, 2 h, 95%; (c) SCN(CH₂)₂NHBoc, Et₃N, DCM, t.a., 16 h, 93%; (d) 1:1 TFA-DCM, t.a., 2 h, 99%.

Por último, la combinación de las unidades hidrófobas de CA₄ (**54** y **60**) con los derivados hidrofílicos de β CD (**62**, **64**, **66** y **68**) permitió el acceso a un conjunto de heterodímeros que presentan diferencias estructurales en ambos macrociclos y en el espaciador que los une (Esquema 8.5).

El acoplamiento entre los mono-isotiocianato-CA₄ hexilado (**54**) y dodecilado (**60**) y los derivados de mono-amina- β CD acetilada (**62**) y metilada (**64**) en diclorometano y Et₃N, condujo a los heterodímeros **69**, **71**, **72** y **74**.¹⁸ La desacetilación, utilizando el procedimiento de Zemplén, de los derivados **69** y **72**, permitió aislar los dímeros **70** y **73** que presentan los grupos hidroxilo libres en la unidad de β CD (Esquema 8.5). Una secuencia de reacciones análoga permitió acceder a la serie de derivados **75**, **77**, **78** y **80**, que incorporan un espaciador con dos funciones tiourea y de mayor longitud que sus homólogos correspondientes. Todos los productos se obtuvieron con excelentes

rendimientos (87-95%). Su estructura se confirmó por espectroscopía de RMN, espectrometría de masas (ESIMS) y análisis elemental. En la Figura 8.3 se muestran los espectros de RMN de **77**, que presenta cadenas de hexilo, β CD metilada y espaciador largo. Los espectros de los derivados de β CD acetilados, como **69**, presentan una mayor resolución de señales de carbohidrato y calixareno (Figura 8.4).



Esquema 8.5. Preparación de los heterodímeros CA₄- β CD anfifílicos neutros. Reactivos y condiciones; (a) Et₃N, DCM, t.a., 16 h, 87-95%; (b) NaOMe, MeOH, ta, 16 h, 99%.

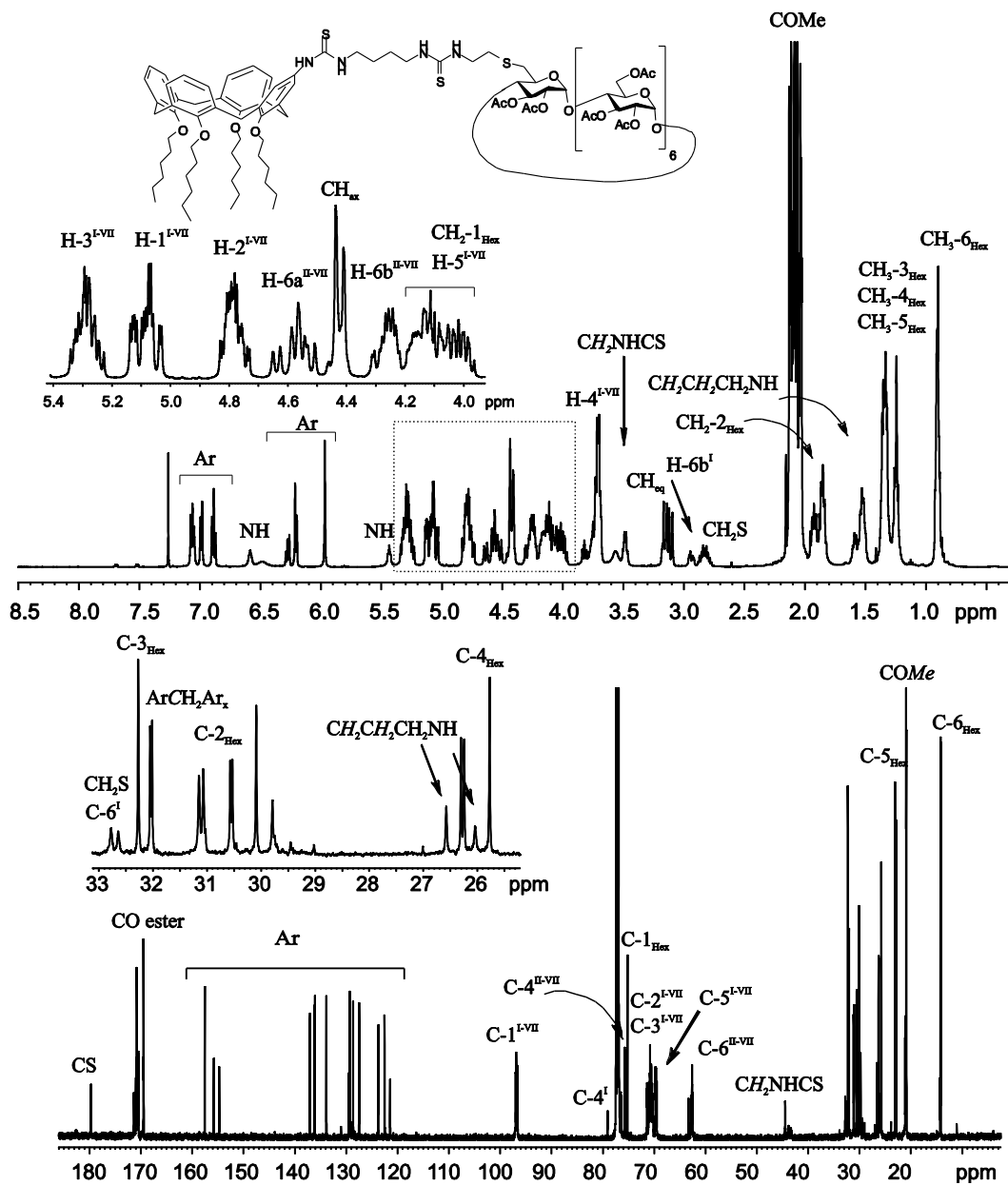


Figura 8.4. Espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN (400 MHz, 100.6 MHz, CDCl_3) de **69**.

8.2.2. Caracterización de las nanopartículas formadas por autoensamblado de los heterodímeros de CA₄-βCDs mediante DLS y AFM.

A continuación hemos llevado a cabo un estudio de la capacidad de autoorganización de los heterodímeros anfífilicos CA₄-βCDs para formar nanopartículas en medio acuoso. Para ello se prepararon nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) blancas (sin carga) utilizando el método de nanoprecipitación previamente descrito para la preparación de nanopartículas a partir de ciclodextrinas.¹⁹ Para la obtención de nanoesferas se añade, gota a gota, una disolución del derivado anfífilico en un disolvente orgánico miscible con agua (acetona o metanol) sobre una disolución acuosa de agua MilliQ que contiene una pequeña cantidad de un surfactante hidrofílico no iónico (*Polysorbate 80*, polioxietilensorbitan monooleato, 2 mg·mL⁻¹), bajo condiciones de agitación (300 rpm) y temperatura (25 °C) controladas. Posteriormente se evapora el disolvente orgánico a 36 °C hasta obtener una suspensión coloidal. En el caso de nanocápsulas, se incorpora un aceite aceptado para uso farmacológico (*Labrafac*[®] *Lipophile WL1349*, una mezcla de triglicéridos derivados de los ácidos caprílico y cáprico, 2 mg·mL⁻¹) y un surfactante hidrofóbico no iónico (*Span*[®] *80*, sorbitán monooleato, 2 mg·mL⁻¹) en la fase orgánica conjuntamente con el dímero anfífilico. La característica que diferencia a las nanocápsulas de las nanoesferas es la presencia de dicho aceite en el núcleo hidrófobo de las primeras.

Las formulaciones resultantes se estudiaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) y M3-PALS. En la Tabla 8.1. (Esp. = espaciador, R y n hacen referencia a los sustituyentes de los dos macrociclos, ver Esquema 8.5) se muestran los diámetros hidrodinámicos y los índices de polidispersidad (PI, *Polydispersity Index*) obtenidos para las nanoesferas y nanocápsulas preparadas. En todos los casos se observaron distribuciones unimodales de tamaños nanométricos que además fueron estables durante más de 30 días, a temperatura ambiente y a 37 °C.

Se observó que, en todos los casos, las nanoesferas presentan diámetros hidrodinámicos mayores que sus correspondientes nanocápsulas. Esto se debe, probablemente, a que los heterodímeros adquieren una mayor capacidad de auto-organización y compactación en torno a los triglicéridos presentes en las formulaciones de nanocápsulas. Además, el surfactante no iónico utilizado en la preparación de las nanocápsulas favorece la dispersión de los agregados. Los valores de potencial ζ (Tabla 8.2) confirman esta hipótesis, pues la mayor densidad de carga que presentan las nanocápsulas les confiere una menor tendencia de agregación.

Las características estructurales de los dímeros afectó de forma considerable a sus propiedades de auto-organización en agua (Figura 8.5). Todos los derivados con grupos metilo en la unidad de la β CD (**71**, **74**, **77**, **80**) formaron nanopartículas con diámetros hidrodinámicos, índices de polidispersidad y valores de potencial ζ inferiores a las de sus homólogos hidroxilados (**70**, **73**, **76**, **79**), lo que puede asociarse a la menor solubilidad de los derivados que presentan grupos hidroxilo libres como consecuencia de la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares. Los derivados de calixareno hexilado ($n = 1$, **71**, **77**, **70**, **76**) dieron lugar a nanoesferas y nanocápsulas de menores tamaño, PI y potencial ζ que sus análogos dodecilados ($n = 7$, **74**, **80**, **73**, **79**). Por último, las nanopartículas obtenidas a partir de los heterodímeros con espaciador corto (**71**, **74**, **70**, **73**) presentaron unos valores de tamaño, PI y potencial ζ menores que los correspondientes dímeros con espaciador largo (**77**, **80**, **76**, **79**). Estos resultados indican que la metilación de los grupos hidroxilo de la β CD así como la presencia de espaciadores y de cadenas alquílicas más cortas en la unidad hidrófoba (hexilo frente a dodecilo) favorecen la compactación de las nanoesferas y nanocápsulas, dando lugar a poblaciones más homogéneas con potenciales ζ inferiores (mayor densidad superficial de carga negativa).

Tabla 8.1. Diámetros hidrodinámicos (nm) e índices de polidispersidad (PI) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) blancas preparadas a partir de los heterodímeros CA₄-βCD.

R	Esp.	n	Comp.	Tamaño (nm) ± SD (NS)	PI ± SD (NS)	Tamaño (nm) ± SD (NC)	PI ± SD (NC)
Me	Corto	1	71	129.2 ± 1.4	0.041 ± 0.003	120.4 ± 0.7	0.217 ± 0.011
Me	Corto	7	74	189.0 ± 0.8	0.054 ± 0.004	152.6 ± 0.8	0.256 ± 0.021
Me	Largo	1	77	224.8 ± 9.7	0.100 ± 0.008	129.4 ± 1.0	0.234 ± 0.006
Me	Largo	7	80	429.7 ± 3.7	0.487 ± 0.030	186.0 ± 1.6	0.325 ± 0.016
H	Corto	1	70	234.9 ± 0.3	0.361 ± 0.010	245.3 ± 1.7	0.144 ± 0.019
H	Corto	7	73	263.7 ± 0.4	0.290 ± 0.011	257.9 ± 2.3	0.179 ± 0.218
H	Largo	1	76	420.2 ± 14.4	0.270 ± 0.011	343.7 ± 2.7	0.177 ± 0.029
H	Largo	7	79	500 ± 16.7	0.401 ± 0.080	354.6 ± 0.2	0.170 ± 0.043

Tabla 8.2. Potencial ζ (mV) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) blancas preparadas a partir de los heterodímeros CA₄-βCD.

R	Esp.	n	Comp.	ζ (mV) ±SD (NS)	ζ (mV) (NC)
Me	Corto	1	71	-31.2 ± 1.8	-37.0 ± 1.6
Me	Corto	7	74	-14.2 ± 0.1	-35.0 ± 0.9
Me	Largo	1	77	-19.4 ± 0.1	-22.1 ± 0.4
Me	Largo	7	80	-9.2 ± 0.5	-20.5 ± 0.3
H	Corto	1	70	-17.3 ± 0.01	-20.6 ± 0.4
H	Corto	7	73	-12.4 ± 0.1	-13.7 ± 0.7
H	Largo	1	76	-9.5 ± 0.04	-11.5 ± 0.1
H	Largo	7	79	-3.3 ± 0.01	-5.5 ± 0.01

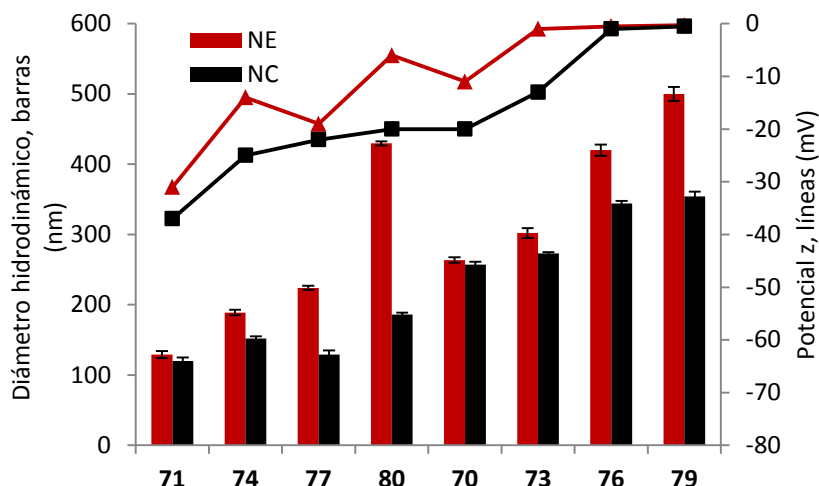


Figura 8.5. Diámetros hidrodinámicos (nm) y potenciales ζ (mV) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) blancas preparadas a partir de los heterodímeros CA₄- β CD.

Los experimentos de microscopía de fuerza atómica (AFM) confirmaron la formación de nanopartículas esféricas, con tamaño y formas homogéneas. En la Figura 8.6 se muestran las imágenes obtenidas para las nanoesferas de los derivados **71** y **74**, para los que se determinó un tamaño medio de 100 nm. Los valores de diámetro hidrodinámico consideran la partícula junto con su esfera de hidratación, lo que explica los tamaños superiores registrados mediante DLS.

En algunos casos, se obtuvo una estructura ultrafina (Figura 8.7), sugiriendo que estos sistemas están compuestos por entidades aún más pequeñas de unos 22-25 nm, las nanoesferas o nanocápsulas que agregan para dar sistemas de alrededor de 100 nm. Asumiendo una forma cónica de las moléculas y un ordenamiento compacto hexagonal en el que se ocupe el 90% de la nanopartícula, se puede estimar, mediante consideraciones geométricas,²⁰ un número de alrededor de 17-25 moléculas por cada nanopartícula. No se observó un aplanamiento de las partículas después de tiempos prolongados de secado, lo que descarta una estructura de tipo vesícula y apoya, por tanto, una estructura de tipo nanoesfera lipídica sólida.

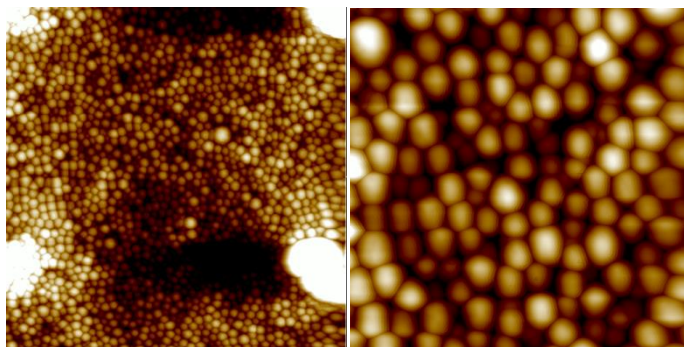


Figura 8.6. Imágenes de AFM de las nanoesferas preparadas por autoensamblado de **74** (izquierda, 5 x 5 μm; derecha, 1.5 x 1.5 μm).

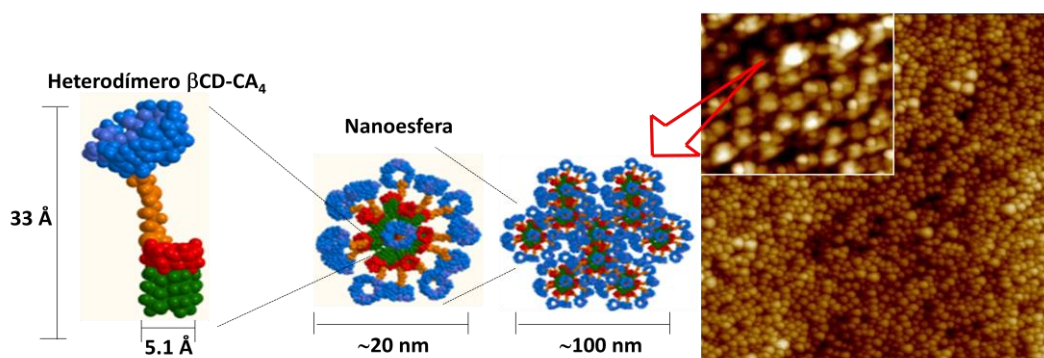


Figura 8.7. Imágenes de AFM (5 x 5 μm) de las nanoesferas preparadas por autoensamblado de **71**, estructura fina (0.7 x 0.7 μm) y representación esquemática de los agregados, las nanoesferas y modelo molecular 3D del heterodímero.

8.2.3. Estudios de encapsulación y cinética de liberación de diazepam y docetaxel.

Con objeto de evaluar la aptitud de las nanoesferas y de las nanocápsulas como transportadores de fármacos, se llevaron a cabo estudios de encapsulación y liberación controlada de diazepam (DZ; Diacepin, Valium o metilbenzodiazepinona; Figura 8.4.), una benzodiazepina utilizada como ansiolítico y relajante muscular.

La nanoprecipitación de los heterodímeros en presencia de DZ dio lugar a nanoestructuras con diámetros hidrodinámicos y potenciales ζ que fueron, en general, menores que los que mostraron las nanopartículas sin carga (Tablas 8.3 y 8.4). Esto indica

que la presencia del fármaco induce a un ordenamiento, de los derivados anfifílicos en torno a las moléculas de diazepam, más eficiente y compacto, lo que conlleva a una menor tendencia a formar agregados. Las relaciones estructura-actividad (tamaño y potencial ζ) para los sistemas que contienen Diazepam fueron las mismas que se observaron para las nanopartículas no cargadas (Figura 8.9). No obstante, al contrario de lo que sucedía en ausencia de DZ, las nanoesferas cargadas mostraron diámetros hidrodinámicos superiores a las correspondientes nanoesferas cargadas, lo que está de acuerdo con la hipótesis de una ocupación más eficiente del espacio: en las nanoesferas blancas no se consigue una total compactación, y al formular las nanocápsulas, la presencia de triglicéridos en la matriz hidrófoba favorece una condensación más eficiente; cuando hay Diazepam en el medio, las nanoesferas cargadas ya presentan una ocupación del espacio optimizada y, al incorporar el aceite en el núcleo de las nanocápsulas cargadas, el diámetro de las mismas tiene que aumentar para permitir el alojamiento del mismo.

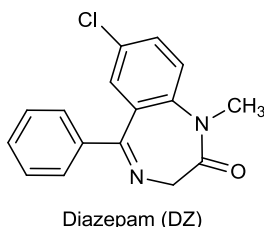


Figura 8.8. Estructura del fármaco Diazepam .

Tabla 8.3. Diámetros hidrodinámicos (nm) e índices de polidispersidad (PI) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) cargadas con DZ, preparadas a partir de los heterodímeros CA₄-βCD.

R	Esp.	n	Comp.	Tamaño (nm) ± SD (NS)	PI ± SD (NS)	Tamaño (nm) ± SD (NC)	PI ± SD (NC)
Me	Corto	1	71	18.2 ± 0.1	0.234 ± 0.019	189.7 ± 2.0	0.213 ± 0.024
Me	Corto	7	74	24.0 ± 0.1	0.158 ± 0.013	190.8 ± 2.5	0.164 ± 0.027
Me	Largo	1	77	28.7 ± 0.1	0.259 ± 0.019	187.0 ± 5.2	0.183 ± 0.016
Me	Largo	7	80	30.8 ± 2.1	0.112 ± 0.010	216.6 ± 3.4	0.230 ± 0.036
H	Corto	1	70	201.4 ± 16.2	0.080 ± 0.010	228.0 ± 2.6	0.122 ± 0.021
H	Corto	7	73	283.9 ± 0.6	0.259 ± 0.080	305.4 ± 4.5	0.185 ± 0.015
H	Largo	1	76	361.6 ± 29.6	0.211 ± 0.012	398.4 ± 8.6	0.348 ± 0.053
H	Largo	7	79	380.9 ± 20.2	0.056 ± 0.009	396.8 ± 14.1	0.336 ± 0.055

Tabla 8.4. Potencial ζ (mV) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) cargadas con DZ, preparadas a partir de los heterodímeros CA₄- β CD.

R	Esp.	n	Comp.	ζ (mV) \pm SD (NS)	ζ (mV) \pm SD (NC)
Me	Corto	1	71	-26.7 \pm 0.9	-30.6 \pm 0.9
Me	Corto	7	74	-22.0 \pm 1.7	-34.6 \pm 0.9
Me	Largo	1	77	-15.6 \pm 1.2	-21.7 \pm 1.2
Me	Largo	7	80	-6.5 \pm 0.5	-19.5 \pm 0.7
H	Corto	1	70	-13.4 \pm 0.5	-18.1 \pm 0.5
H	Corto	7	73	-10.8 \pm 0.1	-11.8 \pm 1.0
H	Largo	1	76	-6.0 \pm 0.8	-8.9 \pm 0.6
H	Largo	7	79	-1.2 \pm 0.3	-0.5 \pm 1.3

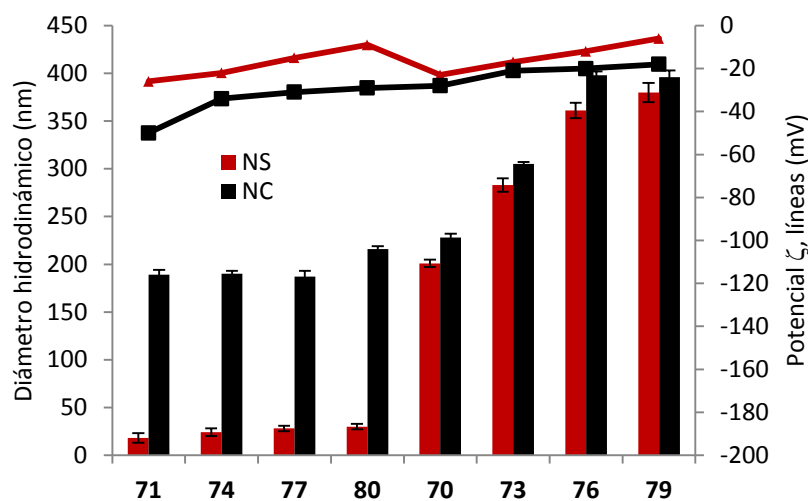


Figura 8.9. Diámetros hidrodinámicos (nm) y potenciales ζ (mV) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) cargadas con DZ, preparadas a partir de los heterodímeros CA₄- β CD.

Los valores de rendimiento de encapsulación del fármaco (relación entre la cantidad de Diazepam presente en las nanopartículas y la introducida inicialmente) se determinaron tras centrifugación de las muestras (5000 rpm, 15 min.) para eliminar el exceso de DZ no encapsulado y posterior liofilización, disolución en metanol y

cuantificación mediante espectrofotometría de absorción (máx. de absorción de DZ $\lambda = 230$ nm). En todos los casos se obtuvieron excelentes valores de encapsulación, en un intervalo entre el 83 y el 94% (Tabla 8.5). La mayor eficiencia de las nanocápsulas puede explicarse porque la matriz lipídica de las primeras ayuda a la disolución del fármaco en el núcleo de la nanopartícula.

Tabla 8.5. Rendimiento de encapsulación de DZ (%) de las nanoesferas (NS) y las nanocápsulas (NC) preparadas a partir de los heterodímeros CA₄- β CD.

R	Esp.	n	Comp.	Encapsulación	Encapsulación
				DZ \pm SD (% , NS)	DZ \pm SD (% , NC)
Me	Corto	1	71	89 \pm 3	99 \pm 1
Me	Corto	7	74	83 \pm 2	88 \pm 2
Me	Largo	1	77	93 \pm 2	98 \pm 1
Me	Largo	7	80	85 \pm 3	87 \pm 1
H	Corto	1	70	94 \pm 2	99 \pm 3
H	Corto	7	73	91 \pm 4	99 \pm 1
H	Largo	1	76	91 \pm 2	98 \pm 3
H	Largo	7	79	90 \pm 4	95 \pm 2

La cinética de liberación de DZ se llevó a cabo por diálisis de la suspensión acuosa de nanopartículas cargadas frente a tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Saline Buffer*), en condiciones fisiológicas (pH 7.4, 37 °C), y se monitorizó por espectrofotometría UV a 230 nm (Figuras 8.10 y 8.11).

Se observaron perfiles de liberación hiperbólicos en todos los casos, pero con cinéticas muy diferentes para las distintas formulaciones; mientras que en el caso de las nanoesferas la liberación es rápida, observándose un 100% de liberación de fármaco en menos de 10 horas, en el caso de las nanocápsulas se requieren un tiempo bastante mayor para una liberación completa (alrededor de 48 horas), por lo que este sistema podría utilizarse para la liberación controlada del ansiolítico en un período de tiempo prolongado. Las diferencias pueden explicarse en base a la constante de reparto del fármaco entre la fase acuosa externa y la fase hidrófoba del interior de la nanopartícula, pues la mayor afinidad por la matriz oleosa de las nanocápsulas conduce a una menor velocidad de

difusión hacia el medio acuoso. Se han descrito comportamientos similares para la encapsulación del diazepam y otros fármacos no polares en nanosistemas anfífilicos basado en CDs.²¹

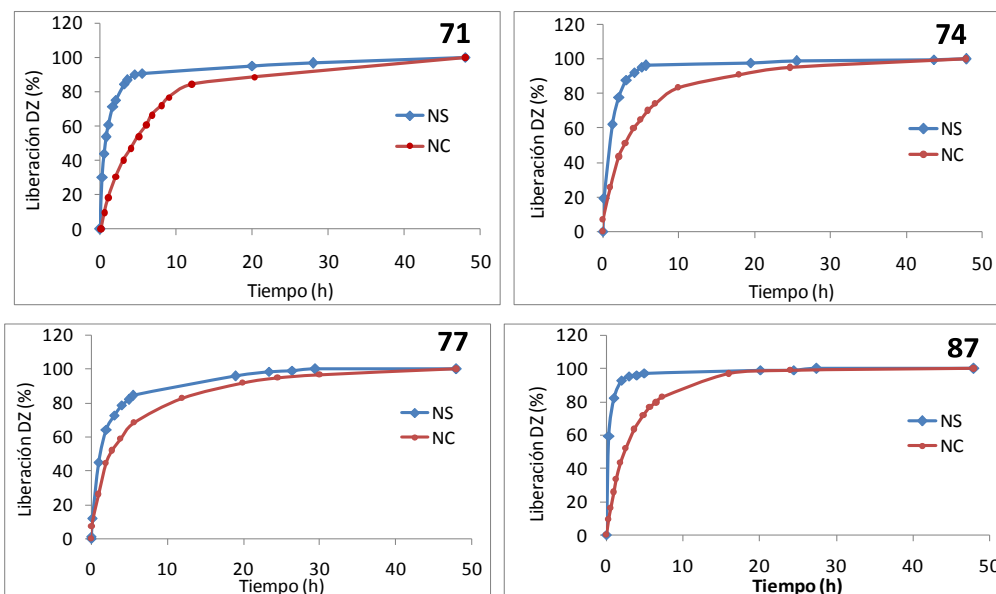


Figura 8.10. Perfiles de liberación de DZ a partir de nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) formuladas con los heterodímeros metilados **71**, **74**, **77** y **80**, en PBS (pH 7.4), a 37 °C.

La velocidad de liberación del fármaco también se vio influenciada por las características estructurales de los heterodímeros. Así, se observaron perfiles de liberación más lentos para los derivados metilados, hexilados y con espaciador corto que para sus respectivos análogos hidroxilados, dodecilados y con espaciador largo, lo que puede explicarse en base al nivel de compactación determinado por DLS: los dímeros con menores diámetros hidrodinámicos presentan un empaquetamiento de encapsulación más compacto, y esto conduce a un liberación del fármaco más lenta .

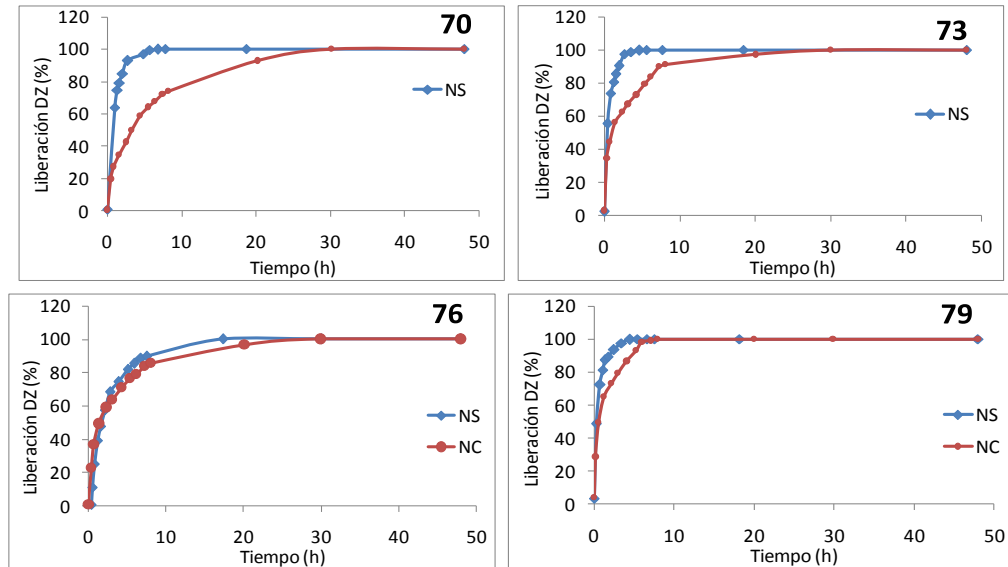


Figura 8.11. Perfiles de liberación de DZ a partir de nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) formuladas con los heterodímeros hidroxilados **70**, **73**, **76** y **79**, en PBS (pH 7.4), a 37 °C.

Los ensayos de liberación con Diazepam han demostrado la capacidad que tienen los derivados preparados para encapsular un fármaco hidrofóbico de manera eficiente y liberarlo de manera controlada en el tiempo. Estos estudios preliminares nos permitieron seleccionar los mejores candidatos para emplearlos en el transporte del agente anticanceroso docetaxel (DXT, Figura 8.12), aquéllos que presentan perfiles de liberación más controlados en el tiempo. Se escogieron tres dímeros con espaciador corto: el derivado de β CD metiladas y CA₄ hexilado, **71**, y sus análogos dodecilado (**74**) e hidroxilado (**70**).

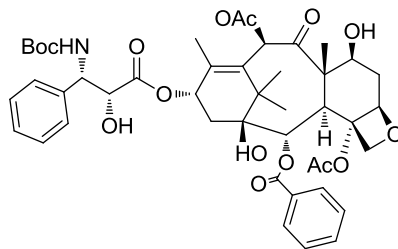


Figura 8.12. Estructura del fármaco docetaxel (DXT).

La nanoprecipitación de los heterodímeros **74**, **71** y **70** en presencia de DXT dió lugar a nanoesferas y nanocápsulas estables en agua durante más de 30 días, a temperatura ambiente y a 37 °C, con diámetros hidrodinámicos, índices de polidispersidad y potenciales ζ (Tablas 8.6 y 8.7) similares a los obtenidos para los sistemas cargados con DZ, lo que corrobora el efecto de las características estructurales y del procedimiento de nanoprecipitación (en forma de NS o NC) sobre las propiedades de auto-asociación y encapsulación de los heterodímeros. Se obtuvieron elevados rendimientos de encapsulación de DXT, entre 87 y 99 % (Tabla 8.8).

Tabla 8.6. Diámetros hidrodinámicos (nm) e índices de polidispersidad (PI) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) cargadas con DXT, preparadas a partir de los heterodímeros **71**, **74** y **70**.

R	Esp.	n	Comp.	Tamaño (nm) ± SD (NS)	PI ± SD (NS)	Tamaño (nm) ± SD (NC)	PI ± SD (NC)
Me	Corto	1	71	19.8 ± 0.9	0.131 ± 0.019	209.4 ± 4.4	0.154 ± 0.012
Me	Corto	7	74	35.1 ± 0.3	0.183 ± 0.011	267.4 ± 2.3	0.179 ± 0.021
H	Corto	1	70	258.0 ± 2.3	0.154 ± 0.018	307.3 ± 3.6	0.109 ± 0.032

Tabla 8.7. Potencial ζ (mV) de las nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) cargadas con TXT, preparadas a partir de los heterodímeros CA₄- β CD **71**, **74** y **70**.

R	Esp.	n	Comp.	ζ (mV) ±SD (NS)	ζ (mV) ±SD (NC)
Me	Corto	1	71	-12.7 ± 0.4	-19.9 ± 0.8
Me	Corto	7	74	-13.3 ± 0.7	-16.4 ± 0.9
H	Corto	1	70	-11.7 ± 0.5	-15.3 ± 0.7

Tabla 8.8. Rendimiento de encapsulación de DXT (%) de las nanoesferas (NS) y las nanocápsulas (NC), preparadas a partir de los heterodímeros CA₄- β CD **71**, **74** y **70**.

R	Esp.	n	Comp.	Encapsulación DZ ± SD (%), NS)	Encapsulación DZ ±SD (%), NC)
Me	Corto	1	71	95 ± 3	99 ± 1
Me	Corto	7	74	93 ± 2	98 ± 2
H	Corto	1	70	87 ± 2	96 ± 3

Los tres derivados presentaron una liberación de docetaxel controlada en el tiempo (Figura 8.13). Se reprodujeron las tendencias estructurales inferidas a partir de los

estudios previos con DZ, pero con una cinética más lenta, especialmente en el caso del derivado **71**. Esto sugiere una mayor afinidad del DXT por el núcleo hidrófobo de las nanopartículas, compatible con su baja polaridad.

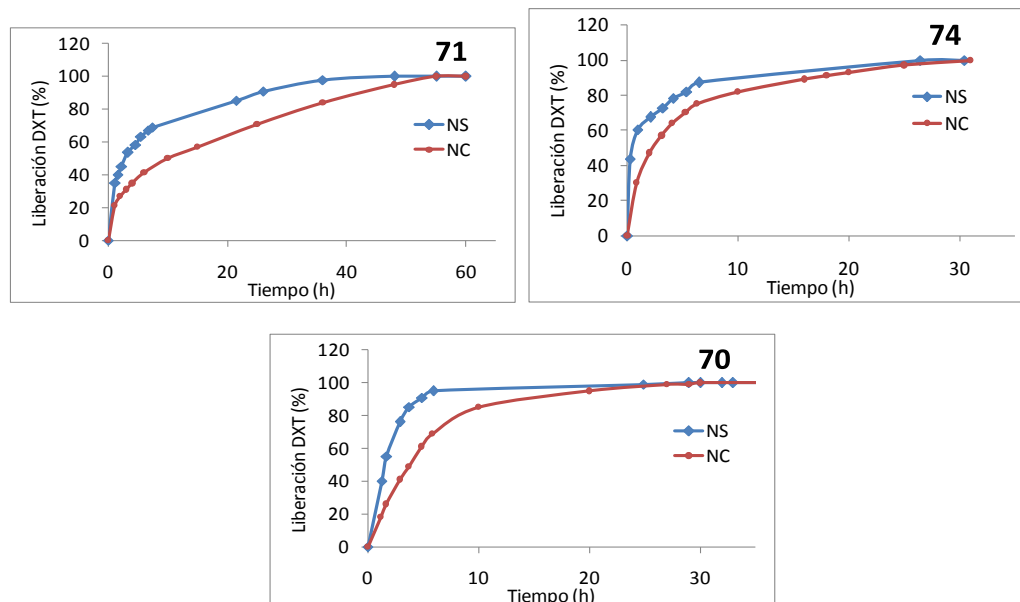


Figura 8.13. Perfiles de liberación de DXT a partir de nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC) formuladas con los heterodímeros de espaciador corto **71**, **74** y **70**, en PBS (pH 7.4), a 37 °C.

Las menores velocidades de liberación del fármaco se tradujo en una mayor diferenciación de perfiles como consecuencia de las diferencias estructurales de los heterodímeros. Como ejemplo ilustrativo, en la Figura 8.14 se muestra la comparación de las cinéticas de liberación obtenidas para nanoesferas de los derivados **71** y **74**, análogos estructurales que se presentan cadenas de hexilo y dodecilo, respectivamente, lo que confirma la relación existente entre el nivel de compactación de las nanopartículas y su capacidad para liberar sustancias hidrofóbicas.

Todos los perfiles muestran una liberación inicial muy rápida seguida de un proceso de liberación lenta controlada durante períodos de 30 a 50 horas, hecho que se observa para el DZ y es más acentuado en el caso de DXT (Figura 8.14). Estos resultados

apuntan a que el fármaco se encapsula en las nanoesferas y nanocápsulas en dos compartimentos diferentes, el núcleo hidrofóbico constituido por las unidades de calixarenos y las cavidades de las ciclodextrinas que se encuentran en la superficie externa de las nanopartículas, cuya liberación es más rápida en comparación con la difusión desde el interior lipofílico (Figura 8.14).

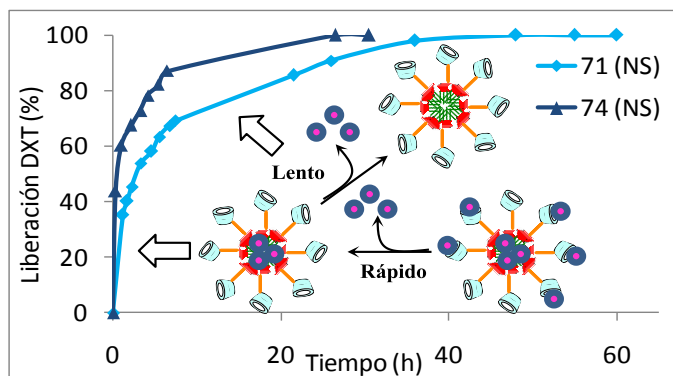


Figura 8.14. Perfiles de liberación de DXT a partir de nanoesferas (NS) y nanocápsulas (NC), formuladas con los heterodímeros **71** y **74**, en PBS (pH 7.4), a 37 °C, y representación esquemática de los modos de encapsulación y liberación del DXT.

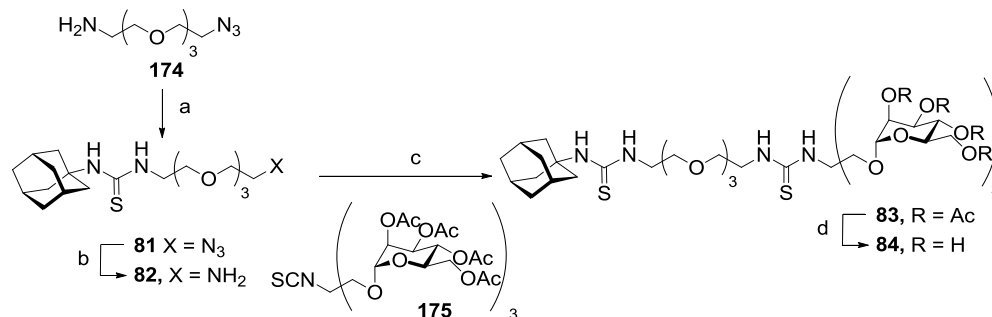
Las diferencias observadas en el potencial ζ de las nanopartículas blancas y cargadas es acorde con la modificación de la superficie de las nanopartículas al ser cargadas con DZ y DXT. Por ejemplo, para el derivado **71** se observó una variación de -31 mV, en ausencia de fármaco, a -27 y -13 mV en presencia de DZ y DXT, respectivamente, apoyando la disposición de una proporción del fármaco en la capa externa.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto cómo puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco eligiendo convenientemente el heterodímero de partida.

8.2.4. Incorporación supramolecular de ligandos manosilados. Estudios de reconocimiento por receptores de macrófagos (hMMR).

La preparación de nanotransportadores para el transporte de fármacos a tejidos concretos requiere la incorporación de elementos de biorreconocimiento, ya sea mediante enlaces covalentes o por vía supramolecular. Para explorar esta segunda posibilidad se ha preparado un conjugado de adamantano con unidades de α -D-manopiranosas, en concreto el derivado trivalente **84** (Esquema 8.6). La idea es aprovechar la alta afinidad de fragmento de adamantano por la cavidad de la β CD para anclar las unidades glucídicas sobre la superficie de las nanopartículas.²⁰ El espaciador hidrófilo de tetraetilenglicol debe contribuir a la solubilidad del sistema y, una vez sobre la nanopartícula, permitir el acceso de los sustituyentes manosilados a fenómenos de reconocimiento molecular con receptores específicos de interés terapéutico como, por ejemplo, una lectina humana que se sobre-expresa en células tumorales, como el receptor de manosa de macrófagos humano, hMMR.

Para la preparación del compuesto **84** se partió de 1-adamantil isotiocianato comercial, cuya reacción de acoplamiento con α -amino- ω -azidotetra(etilenglicol) (**174**),²² se llevó a cabo en DMF usando trietilamina como catalizador. La reacción se prolongó durante tres días y condujo al aducto de tiourea **81**, que se redujo con 1,3-propanoditiol para dar la amina **82** con un 65% de rendimiento. Posteriormente, la adición nucleofílica del grupo amino de **80** al isotiocianato **175**,¹³ proporcionó el conjugado acetilado **83** que se transformó en el correspondiente derivado desprotegido **84** mediante desacetilación convencional (Esquema 8.6).



Esquema 8.6. Preparación del conjugado de adamantano-manosa **82**. Reactivos y condiciones: (a) 1-Adamantil isotiocianato, Et₃N, DMF, t.a. 72 h, 53%; (b) 1,3-propanoditiol, Et₃N, MeOH, t.a., 16 h, 65%; (c) NaHCO₃, acetona-H₂O 5:1, t.a., 16 h, 92%; (d) MeONa, MeOH, t.a., 2-4 h. 99%.

Se seleccionaron las nanoesferas obtenidas a partir de los dímeros **71** y **74** para llevar a cabo la modificación supramolecular con el derivado **84**. La incorporación del glicoligando **84** a las superficies de las nanopartículas (añadido en 10, 30 y 60% en base molar respecto a los heterodímeros **71** y **74**), fue monitorizado por el aumento del diámetro hidrodinámico, de alrededor de 10 nm, y del potencial ζ (en torno a + 4 mV), para las formulaciones con 30 y 60% de ligando, pues las preparaciones de 10% de **84** no presentaron cambios detectables por DLS (Tabla 8.9). Las modificaciones de las propiedades superficiales de las nanopartículas está de acuerdo con un anclaje del ligando a la capa externa de las mismas, originando una estructura de tipo glicocalix-corona.

Tabla 8.9. Diámetros hidrodinámicos (nm), índices de polidispersidad y potenciales ζ (mV) de nanoesferas (NS) blancas a partir de **71** y **74** con un 30 y 60% del glicoligando **84**.

R	Esp.	n	Sistema NS	Tamaño (nm) \pm SD	PI \pm SD	Potencial ζ (mV) \pm SD
Me	Corto	1	71	129.2 \pm 1.4	0.041 \pm 0.003	-31.0 \pm 1.8
Me	Corto	1	71 + 84 (30%)	136.5 \pm 0.9	0.040 \pm 0.026	-29.4 \pm 1.4
Me	Corto	7	71 + 84 (60%)	138.6 \pm 1.2	0.053 \pm 0.023	-27.3 \pm 2.9
Me	Corto	7	74	189.0 \pm 0.8	0.054 \pm 0.004	-14.2 \pm 0.1
Me	Corto	1	74 + 84 (30%)	198.3 \pm 2.1	0.052 \pm 0.006	-13.1 \pm 0.1
Me	Corto	7	74+ 84 (60%)	201.4 \pm 4.3	0.056 \pm 0.006	-9.2 \pm 0.9

La capacidad de las nanopartículas, supramolecularmente funcionalizadas con glicoligandos de manopiranosilo, para participar en fenómenos de reconocimiento de proteínas se confirmó mediante la evaluación de la afinidad de unión hacia el receptor de manosa de macrófagos humanos hMMR siguiendo un ensayo ELLA (*Enzyme-Linked Lectin assay*) modificado.²³ La Figura 8.9. muestra una representación esquemática del mismo. Se emplea manano de levadura, que presenta afinidad por la lectina hMMR, para recubrir los pocillos de la microplaca (a). Por otro lado, se incuba una disolución de nanopartículas (NP) unidas a glicoligando de manosa y hMMR, de modo que se establece un equilibrio de formación del complejo NP-hMMR (b). A continuación se añade dicha disolución sobre la microplaca (c), de modo que se dará un proceso competitivo de unión de la lectina al manano y a las nanopartículas (d). El lavado posterior (e) eliminará del medio el complejo NP-hMMR y las NPs en exceso, quedando en el pocillo únicamente el hMMR unido a manano. La fracción de receptor que queda unido al manano sobre la microplaca se cuantifica tras adición de un anticuerpo anti-hMMR, (comercialmente disponible), marcado con biotina. Como sistema de visualización se utiliza NeutravidinaTM (una forma tetramérica de la avidina) que se une a la biotina del anti-hMMR, y sobre la que se añade biotina marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP-biotina), que se une a la neutravidina. La presencia de cuatro sitios de reconocimiento para la avidina en la NeutrAvidinaTM permite la formación de una red que amplifica la

respuesta tras adición del sustrato de la peroxidasa, el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico, (ABTS) y permite utilizar cantidades mínimas de hMMR y anti-hMMR-biotina.

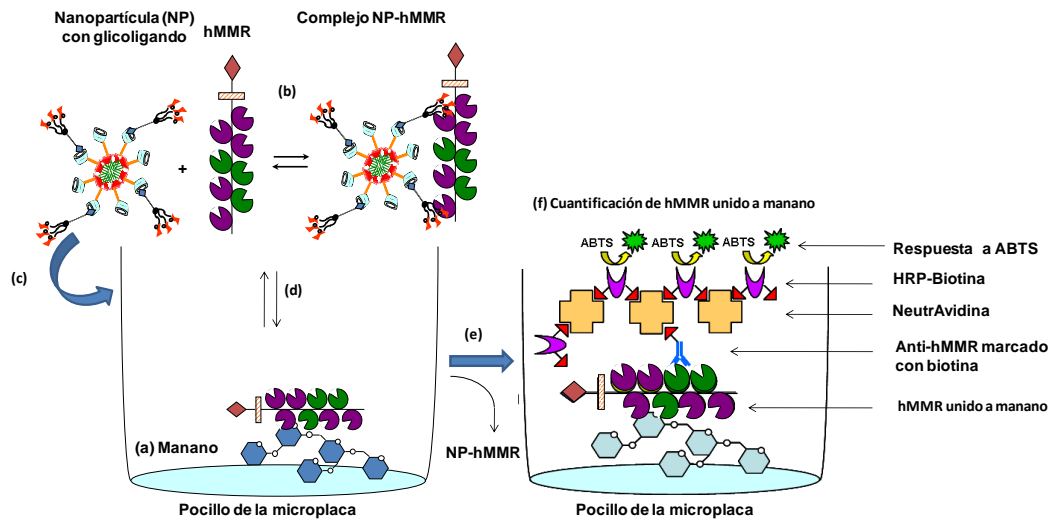


Figura 8.15. Representación esquemática del ensayo ELLA modificado para medir la afinidad de las nanopartículas unidas al glicoligando de manosa frente al receptor humano de manosa de macrófagos (hMMR).

La capacidad de los diferentes sistemas funcionalizados con manosa para inhibir la unión del manano de levadura hacia la hMMR se muestra en la Figura 8.16. Los resultados indicaron un importante aumento de la afinidad de las nanoesferas preparadas a partir de los derivados **71** y **74** funcionalizadas supramolecularmente con manosa, en comparación con el ligando trimanosilado individual ($IC_{50} = 79 \mu M$). Cuando se añade un 10% de glicoligando a las nanoesferas, el aumento de afinidad fue apenas 2 veces mayor respecto al glicoligando individual (IC_{50} de $41 \mu M$ y $44 \mu M$ para **71** y **74**, respectivamente), pero se obtuvieron incrementos mucho mayores para las formulaciones con 30 y 60% de **84**: de 42 veces para el derivado hexilado **71** y de 24-27 veces para el derivado dodecilado **74**. Estos datos son acordes con el aumento esperado de interacción

entre el motivo de manosa y la lectina hMMR como consecuencia de la presentación multivalente sobre la nanopartícula.²⁴ La pequeña diferencia observada en la afinidad hacia la hMMR de las nanoesferas modificadas cuando se añade un 30 ó un 60% de dendrón (IC_{50} de 1.9 y 1.7 μM para **71** y de 3.3. y 2.9 μM para **74**, respectivamente) sugiere la existencia de un valor máximo en el efecto multivalente, lo que podría resultar de interés ya que permitiría instalar diferentes elementos funcionales mediante la post-modificación supramolecular a las unidades de βCD que no estén funcionalizadas con **84**, por ejemplo sondas fluorescentes o moléculas para la mejora de biodisponibilidad o de la internalización celular mediante la post-funcionalización de estos nanosistemas.

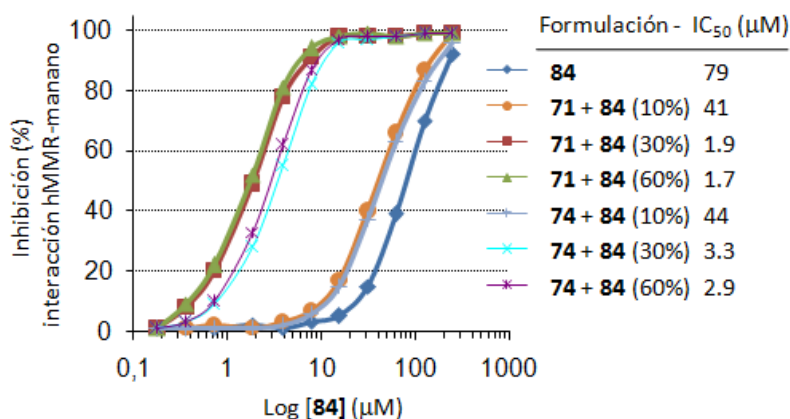


Figura 8.16. Inhibición de la asociación del manano de levadura hacia la MMR humana de nanoesferas preparadas a partir de **71** y **74** en presencia de de concentraciones crecientes del ligando manosilado **84**.

Con el objetivo de confirmar que el anclaje del derivado de manosiladamantano se basa en un proceso de inclusion en la cavidad de la βCD , hemos llevado a cabo ensayos ELLA en presencia de adamantano-1-carboxilato sódico (AC). La afinidad de las nanoesferas funcionalizadas con **84** (en un 30%, $[84] = 31.25$ mM) disminuyó drásticamente en presencia de un exceso de 10 veces de adamantano-1-carboxilato sódico ($[AC] = 312.5$ mM), lo que indica que dicho compuesto es capaz de reemplazar al glicoligando de la superficie de las nanopartículas, apoyando, por tanto, que el principal mecanismo de

funcionalización supramolecular se basa en una inclusión reversible en la cavidad de las unidades de β CD dispuestas en la superficie externa de las nanopartículas (Figura 8.17).

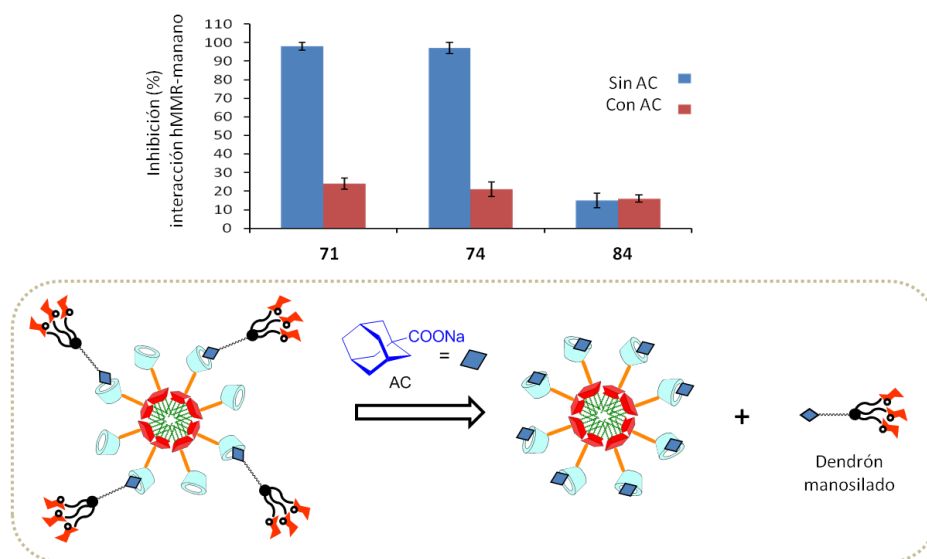


Figura 8.17. Inhibición de la asociación de hMMR a manano por **84** y por nanoesferas de los heterodímeros **71** y **74** funcionalizadas **84**, en ausencia o en presencia de un exceso de adamantano-1-carboxilato sódico.

8.3. Conclusiones.

En resumen, en este capítulo hemos descrito la preparación de un nuevo tipo de nanoesferas autoensambladas, estables en disolución acuosa, formadas a partir de especies moleculares que combinan un residuo hidrofóbico de calix[4]areno y una cabeza hidrofílica de β -ciclodextrina. Estos sistemas son eficaces para la encapsulación y liberación de manera controlada de fármacos, en concreto el ansiolítico Diazepam y el agente antimitótico docetaxel y permiten además, mediante complejación de tipo receptor-huésped, incorporar ligandos manosilados en la superficie de las nanopartículas que son reconocidos por el receptor de manosa de macrófago humano. Estos resultados son particularmente relevantes ya que el DXT, empleado en el tratamiento de cáncer de

próstata, mama, cuello y pulmón, puede inducir apoptosis selectiva en células supresoras de origen mielóide que sobre-expresan el receptor hMMR, por lo que esta estrategia podría utilizarse en inmunoterapias contra el cáncer.²⁵ En resumen, los resultados obtenidos muestran el potencial de sistemas de transporte heterodiméricos basados en CA₄-βCD para aplicaciones en nanomedicina que requieran la estabilización, la vectorización y/o la protección de una molécula huésped en medio acuoso.

¹ (a) S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991-1003; (b) K. Petkau-Milroy, L. Brunsveld, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 219-232; (c) M. C. Branco, J. P. Scheneider, *Acta Biomaterialia*, **2009**, *5*, 817-831; (d) N. Sakai, S. Matile, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 599-600.

² (a) Y. Zhao, Y. Zhao, F. Sakai, L. Su, Y. Liu, K. Wei, G. Chen, M. Jiang. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5215-5256; (b) A. Najer, D. Wu, D. Vazquez, C. G. Palavan, W. Meier, *Nanomedicine*, **2013**, *8*, 425-447; (c) M. A. C. Stuart, W. T. S. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G. B. Sukhorukov, I. Szleifer, V. V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov, S. Minko, *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 101-113.

³ (a) K. Liu, Y. Kang, Z. Wang, Xi Zhang, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5530-5548; (b) A. Barnard, D. K. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6527-6581.

⁴ (a) J. M. García Fernández, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 1759-1900; (b) A. Martínez, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4746-4773; (c) C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. M. Benito *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1586-1608; (d) Y. Chen, Y.-M. Zhang, Y. Liu, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5622-5633; (e) F. Sallas, R. Darcy, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 957-969; (f) F. Quaglia, L. Ostacolo, A. Mazzaglia, V. Villari, D. Zaccaria, M. T. Sciortino, *Biomaterials* **2009** *30*, 374-382; (g) C.-Y. Quan, J.-X. Chen, H.-Y. Wang, C. Li, C. Chang, X.-Z. Zhang, R.-X. Zhuo, *ACS Nano*, **2010**, *4*, 4211-4219; (h) R. V. Vico, J. Voskuhl; B. J. Ravoo, *Langmuir*,

2011, 27, 1391-1397; (i) F. Perret, M. Duffour, Y. Chevalier, H. Parrot-Lopez, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, 83, 25-32.

⁵ Revisiones recientes: (a) I. Montasser, P. Shahgaldian, F. Perret, A. W. Coleman, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14, 21899-21942; (b) F. Sansone, A. Casnati, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4623-4639; (c) K. Helttunen, P. Shahgaldian, *New J. Chem.* **2010**, 34, 2704-2714; (d) Y. Tanaka, M. Miyachi, Y. Kobuke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 504-506; (e) P. Shaghaldian, M. Cesario, P. Goreloff, A. W. Coleman, *Chem. Commun.* **2002**, 326-327; (f) A. Dubes, I. L. Moudrakovski, P. Shaghaldian, A. W. Coleman, C. I. Ratcliffe, J. A. Ripmeester, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6236-6237; (g) M. Strobel, K. Kita-Tokarczyk, A. Taubert, C. Vebert, P. A. Heiney, M. Chami, W. Meier, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, 16, 252-259; (h) A. W. Coleman, S. Jebors, P. Shahgaldian, G. S. Ananchenko, J. A. Ripmeester, *Chem. Commun.*, **2008**, 2291-2303; (i) C. Bize, J.-C. Garrigues, M. Blanzat, I. Rico-Lattes, O. Bistri, B. Colasson, O. Reinaud, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 586-588; (j) V. Francisco, N. Basilio, L. Garcia-Rio, J. R. Leis, E. F. Maques, C. Vázquez-Vázquez, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 6551-6553.

⁶ J. Zhang, P. X. Ma, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65, 1215-1233.

⁷ (a) K. Wang, D. -S. Guo, X. Wang, Y. Liu, *ACS Nano* **2011** 5, 2880-2894; (b) K. Wang, D. -S. Guo, H. -Q. Zhang, D. Li, X. -L. Zheng, Y. Liu, *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 6402-6412; (c) A. W. Coleman, S. Jebors, S. Cecillon, P. Perret, D. Garin, D. Marti-Battle, M. Moulin, *New J. Chem.* **2008**, 32, 780-782; (d) E. Memisoglu-Bilensoy, A. L. Dogan, A. A. Hincal, *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, 58, 585-589.

⁸ (a) W. Sliwa, M. Deska, *Arkivoc* **2011**, 496-551; (b) A. R. Khan, P. Forgo, K. J. Stine, V. T. D'Souza, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1977-1996; (c) P. Balbuena, R. Gonçalves-Pereira, J. L. Jiménez Blanco, M. Isabel García-Moreno, D. Lesur, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 1390-1403, and references therein.

-
- ⁹ (a) L. Wang, L.-l. Li, Y.-S. Fan, H. Wang, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 3888-3898; (b) C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6728-6742.
- ¹⁰ (a) J. Bügler, J. F. J. Engbersen, D. N. Reinhoudt, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5339-5344; (b) Y. Liu, Y. Chen, L. Li, G. Huang, C. C. You, H. Y. Zhang, T. Wada, Y. Inoue, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7209-7215; (c) J. J. Michels, R. Fiammengo, P. Timmerman, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *41*, 163-172; (d) C. K. Jankowski, S. Arseneau, J. Blu, L. Mauclaire, N. Aychet, *Can. J. Chem.* **2005**, *83*, 493-498; (e) C. Hocquelet, C. K. Jankowski, L. Mauclaire, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 10834-10839; (f) B. Garska, M. Tabatabai, H. Ritter, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 784-788; (g) X. Zhang, L. Shi, G. Xu, C. Chen, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2013**, *75*:147-153; (h) F. Dalessandro, F. G. Gulino, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, D. Scotto and G. Vecchio, *Tetrahedron Lett.*, 1994, *35*, 629-632.
- ¹¹ R. van der Meel, L. J.C. Vehmeijer, R. J. Kok, G. Storm, E. V.B. van Gaal, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1284-1298.
- ¹² L. Feng, R. J. Mumper, *Cancer Lett.* **2013**, *334*, 157-175.
- ¹³ (a) 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; (b) J. Rodríguez-Lavado, M. de la Mata Fernández, J. L. Jiménez Blanco, M. I. García-Moreno, J. M. Benito, A. Díaz-Quintana, J. A. Sánchez Alcázar, K. Higaki, E. Nanba, K. Ohno, Y. Suzuki, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2289-2301.
- ¹⁴ H. Ihm, K. Paek, *Bull. Korean Chem. Soc.* **1995**, *16*, 71-73.
- ¹⁵ E. Nomura, A. Hosoda, M. Takagaki, H. Mori, Y. Miyake, M. Shibakami, H. Taniguchi, *Langmuir* **2010**, *26*, 10266-10270.
- ¹⁶ 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, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12871-12888.

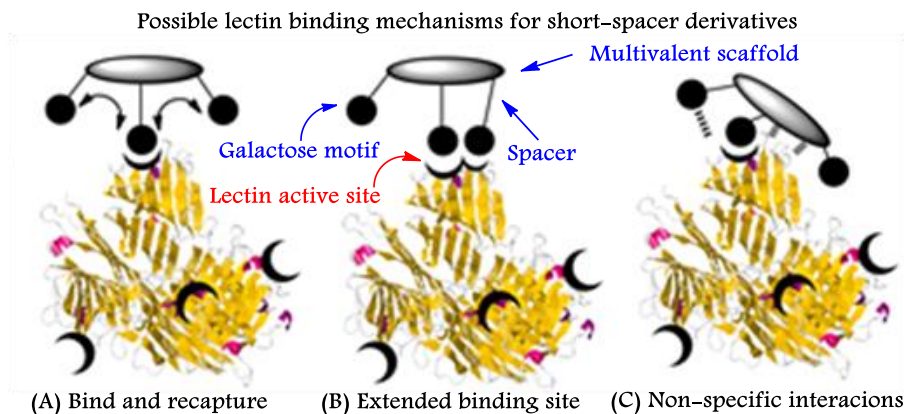
-
- ¹⁷ T. Kaneda, T. Fuyimoto, J. Goto, K. Asano, J. H. J. Yasufuku, C. Ozono, Y. Sakata, *Chem. Lett.* **2002**, 514-515.
- ¹⁸ Ejemplos seleccionados de conjugación via tiourea en los calixarenos y en las ciclodextrinas: (a) S. André, F. Sansone, H. Kaltner, A. Casnati, J. Kopitz, H.-J. Gabius, R. Ungaro, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1649-1661; (b) S. André, C. Grandjean, F.-M. Gautier, S. Bernardi, F. Sansone, H.-J. Gabius, R. Ungaro, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6126-6128; (c) Á. Martínez, C. Bienvenu, J. L. Jiménez Blanco, P. Vierling, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, C. Di Giorgio *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8143-8148; (d) M. Gómez-García, J. M. Benito, A. P. Butera, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. L. Jiménez Blanco, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1273-1288.
- ¹⁹ (a) A. Méndez-Ardoy, M. Gómez-García, A. Gèze, J.-L. Putaux, D. Wouessidjewe, C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández, J. M. Benito *Med. Chem.* **2012**, *8*, 524-532; (b) M. Skiba, D. Wouessidjewe, F. Puisieux, D. Duchêne, A. Gulik, *Int. J. Pharm.* **1996**, *142*, 121-124.
- ²⁰ R. V. Rodik, A. S. Klymchenko, N. Jain, S. I. Miroshnichenko, L. Richert, V. I. Kalchenko, Y. Mély, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5526.
- ²¹ E. Memişoğlu-Bilensoy, M. Şen, A. A. Hincal, *J. Microencapsul.* **2006**, *23*, 59-68.
- ²² A. W. Schwabacher, J. W. Lane, M. W. Schiescher, K. M. Leigh, C. W. Johnson, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1727-1729.
- ²³ A. Díaz-Moscoso, N. Guilloteau, C. Bienvenu, A. Méndez-Ardoy, J. L. Jiménez Blanco, J. M. Benito, L. Le Gourriérec, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Biomaterials*, **2011**, *32* 7263-7273
- ²⁴ a) M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908-2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794; b) C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksich, J. Dervedde, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472-10498.

²⁵ a) K. N. Kodumudi, K. Woan, D. L. Gilvary, E. Sahakian, S. Wei, J. Y. Djeu, *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 4583-4594; b) J. E. Talmadge, D. I. Gabrilovich, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 739-752.

Capítulo 9

Estudio de la naturaleza del efecto clúster entre galactósidos multivalentes y la lectina de cacahuete Peanut Agglutinin Lectin (PNA)

Abstract: a set of multigalactosides, with valencies ranging from one to seven and different spacer arm lengths, have been designed to study the molecular basis of multivalent carbohydrate-lectin interactions and optimize the bio-recognition properties for targeting purposes. The binding affinity toward the peanut agglutinin (PNA) was shown to be strongly dependent on the spacer-arm length. “Sandwich” ELLA (enzyme-linked lectin assay) and dynamic light scattering experiments demonstrated that PNA cross-linking abilities of long-spacer derivatives are responsible for their enhanced lectin affinity. The binding mechanism short-spacer galactosides, that are not able to cross-link PNA, have been studied by atomic force microscopy. A bind-and-recapture mechanism (A) was shown to be more probably than an extended binding site (B) or a process based on non-specific interactions (C).



9. Estudio de la naturaleza del efecto multivalente entre glicoligandos multitópicos y lectinas.

9.1. Antecedentes bibliográficos.

El reconocimiento multivalente, que tienen lugar en los sistemas biológicos, entre los carbohidratos y sus receptores proteicos específicos llamados lectinas, constituye la base de procesos cruciales como la fertilización, la metástasis, las interacciones celulares y las infecciones bacterianas.¹ Consecuentemente, el desarrollo de nuevos derivados de carbohidratos capaces de modular estas interacciones, como inhibidores o activadores, es un campo de investigación muy activo. En el capítulo anterior hemos presentado un sistema de transporte de fármacos vectorizado a macrófagos a través de la funcionalización supramolecular con un ligando manosilado cuya interacción con el receptor hMMR se ve favorecida gracias a la presentación multivalente del glicoligando. De hecho, las estrategias químicas más utilizadas se basan en la funcionalización de una plataforma con varias unidades de carbohidrato dando lugar a glicoclústeres que presentan una afinidad hacia la lectina muy superior a la que cabría esperar de la suma de las interacciones individuales. Este fenómeno, conocido como “efecto multivalente (o clúster) glicosídico”, fue descrito la primera vez por Y. C. Lee y R. T. Lee.²

Aunque existe un número muy importante de publicaciones al respecto,³ el diseño de nuevos ligandos multivalentes continúa siendo un reto sintético importante,⁴ debido fundamentalmente a los diferentes modos de interacción que pueden tener lugar de modo independiente o simultáneo en los sistemas biológicos. La efectividad de las interacciones depende tanto de la naturaleza de la lectina como de la del glicoconjugado. Una de las características estructurales más importantes es la longitud del espaciador entre los ligandos glucídicos. Cuando se utilizan glicoconjugados con ligandos unidos mediante espaciadores de la misma longitud que la distancia entre dos dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRDs, *Carbohydrate Recognition Domains*) de la lectina, éstos son

capaces interactuar a la vez con más de un CDR y se produce el llamado efecto quelato, por lo que se observan incrementos de afinidad muy elevados, de varios órdenes de magnitud.⁵ Además, los sistemas multivalentes con espaciadores suficientemente largos, incluso aunque no sean capaces de interactuar con más de un CDR, también pueden interactuar intermolecularmente formando redes entrecruzadas de carbohidrato-lectina,⁶ dando lugar a precipitados que desplazan notablemente el equilibrio de reacción. Resulta interesante el hecho de que los sistemas con espaciadores demasiado cortos para exhibir efecto multivalente quelato o para formar redes entrecruzadas, de los que no se esperaría efecto multivalente, pueden dar lugar a incrementos de afinidad debido al llamado efecto “minicluster” por interacción con un único CRD de la lectina.⁷ En estos casos los incrementos de afinidad generalmente no superan un orden de magnitud y pueden explicarse por mecanismos de “enlace y recaptura” también llamado de “enlace y deslizamiento” de epítopos vecinos al CDR (Figura 9.1, A). La elevada concentración local de ligando, debido a la pequeña longitud de los espaciadores, favorece este mecanismo de recaptura por la lectina de un ligando adyacente, dando lugar a un efecto similar al que se observaría si la proteína interactuase con más de un epítipo a la vez. En el caso de cadenas poliméricas⁸ se han descrito incrementos de afinidad más elevados.

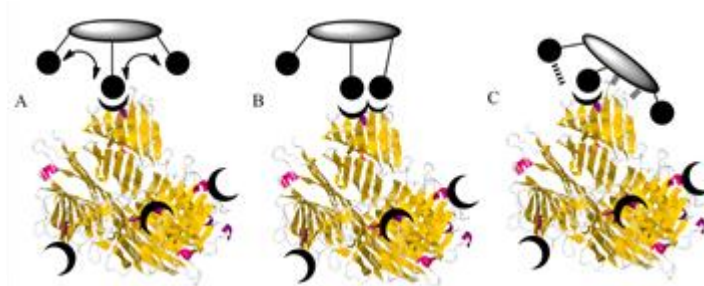


Figura 9.1. Representación esquemática de los diferentes mecanismos implicados en el efecto minicluster para una estequiometría ligando-lectina 1:1. A) Enlace y re-captura. B) Interacción de un segundo ligando en un sitio secundario de la lectina; c) Interacciones adicionales no específicas.

También pueden producirse aumentos de afinidad por efecto minicluster cuando en el sitio de reconocimiento de la lectina se acomoda un segundo ligando (Figura 9.1, B).

Finalmente, la afinidad también puede verse favorecida debido a interacciones no específicas en las proximidades de la superficie de la lectina (Figura 9.1, C).

El estudio de las bases moleculares de las interacciones carbohidrato-lectina permite predecir cuáles son las características estructurales de los ligandos que implican un mayor efecto multivalente y, consecuentemente, lleva al diseño de sistemas más eficientes para su vectorización a receptores biológicos. La funcionalización supramolecular presentada en el capítulo anterior supone una ventaja adicional en este aspecto, pues una vez que se tienen las nanopartículas optimizadas para la encapsulación y liberación del fármaco, se pueden preparar y evaluar de manera independiente glicoligandos con propiedades de vectorización mejoradas, y por simple adición de disoluciones acuosas de los mismos a las formulaciones de nanopartículas, se consiguen sistemas de transporte específico más eficientes.

A la vista de estos antecedentes, nos hemos propuesto estudiar, en colaboración con el grupo del Dr. S. Gouin del CNRS en Nantes, el estudio racional de los mecanismos que explican el incremento de afinidad de carbohidratos con lectinas en base a sus características estructurales. Para ello se ha empleado la lectina de cacahuete marcada con rábano picante HRP-PNA (*Horseradish Peroxidase Peanut Agglutinin*) y una serie de galactósidos multivalentes unidos covalentemente a plataformas sacarídicas, con valencias de una a siete y diferentes longitudes de espaciador entre las unidades de galactosa y la plataforma. Los compuestos muestran una elevada homología estructural concebida para un estudio estricto de la relación estructura-actividad sobre el fenómeno multivalente que pueda ser extrapolado a otros sistemas. Aunque en esta Tesis se hayan utilizado glicoligandos unidos a nanopartículas de manera supramolecular, para este tipo de estudio resulta más adecuado el uso de modelos más sencillos donde los epítomos de reconocimiento se unan de manera covalente y así se eviten procesos paralelos, como desplazamientos de equilibrios de inclusión, que puedan afectar a los resultados obtenidos.

La magnitud de las interacciones galactosa-lectina y su capacidad o no de formar redes se han determinado mediante ensayos ELLA convencionales (*Enzyme-Linked*

Lectin Assay) y el estudio de los mecanismos de interacción carbohidrato-lectina se ha llevado a cabo mediante ensayos ELLA competitivos de tipo sándwich, medidas de diámetro hidrodinámico de los sistemas por dispersión dinámica de la luz, DLS, y espectroscopía de fuerza usando un microscopio AFM (*Atomic Force Microscopy*).

9.2. Resultados y discusión.

9.2.1. Síntesis de los gliococonjugados.

Para la síntesis de los sistemas multivalentes se han seleccionado, como espaciadores, cadenas de oligoetilenglicol de diferentes longitudes, ya que estas cadenas no interaccionan con las proteínas.⁹ Los alquínilgalactósidos **85**,¹⁰ **86**¹¹ y **87** se obtuvieron mediante reacciones de glicosidación entre las cadenas glicólicas monopropargiladas y el correspondiente tricloroacetimidato usando las condiciones de glicosidación de Schmidt. Por otra parte, el grupo del Dr. S. Gouin y J. Kovensky han desarrollado metodologías de preparación de plataformas bifuncionales basadas en carbohidratos muy adecuadas para nuestro objetivo,¹² pues presentan grupos azida disponibles para la incorporación de los ligandos galactosilados mediante química click de tipo CuAAC y un grupo amino protegido que permite la unión a la punta del microscopio AFM. Siguiendo la misma metodología se prepararon los derivados **88-91**, que son mono-, di-, tri- y hepta-sacáridos lineales de glucosa funcionalizados con grupos azido en la posición 6 y un grupo cisteamina protegido con Fmoc (Figura 9.2.).

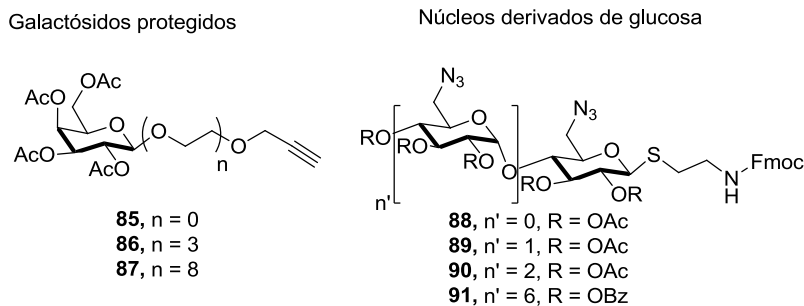
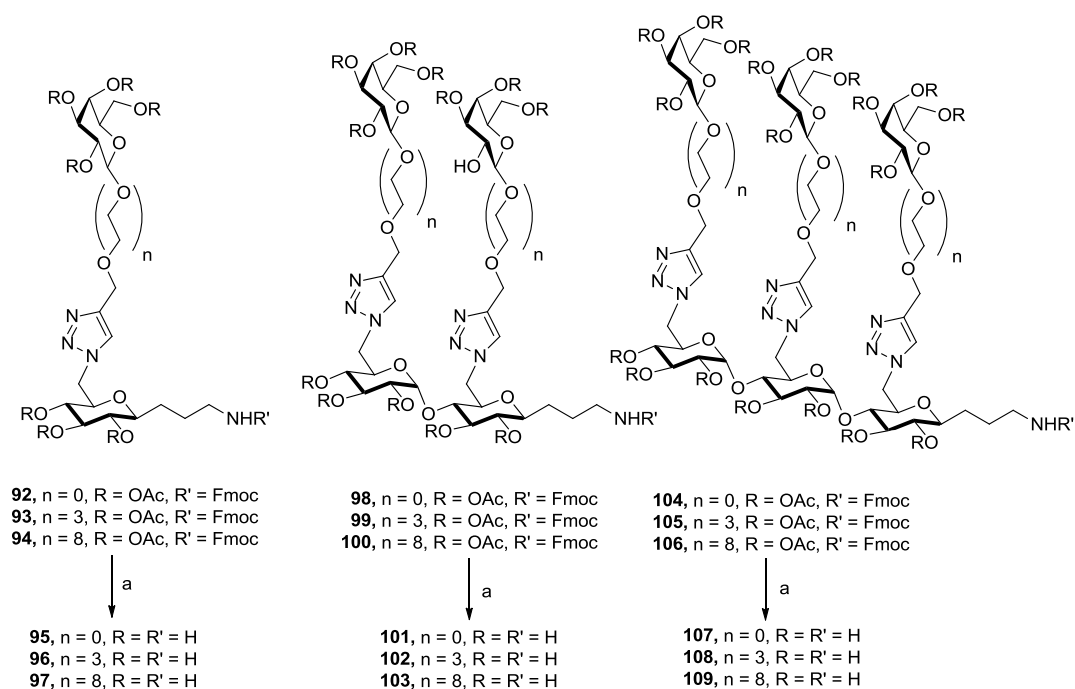


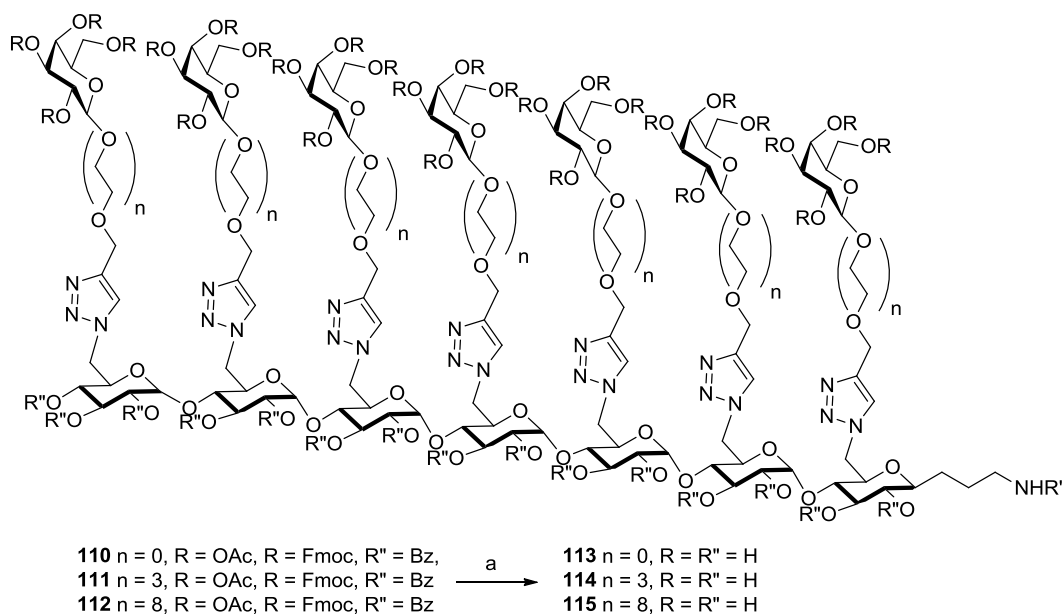
Figura 9.2. Estructura de los galactósidos **89-88** y de las plataformas glucosiladas **88-89** utilizadas para el acoplamiento via “click chemistry”.



Esquema 9.1. Preparación de los gliconjugados **92-119**. Reactivos y condiciones: a) MeOH, 7 N NH₃, 24 h, t.a., 51-78%.

Los acoplamientos se llevaron a cabo de manera satisfactoria, mediante el uso de irradiación con microondas obteniéndose los correspondiente cicloadductos 1,4 (**92-94**, **98-**

100, 104-106 y 110-112) con rendimientos del 60-83%. La formación de los derivados triazólicos se confirmó por la diferencia en los desplazamientos químicos de las señales de C-4 y C-5 ($\Delta\delta > 20$ ppm) observado en los espectros de ^{13}C RMN.¹³ La desprotección simultánea de los grupos carbamatos y de los grupos ésteres se llevó a cabo en amoníaco metanólico aislándose los compuestos **95-97, 101-103, 107-109 y 113-115** con rendimientos del 51-82% tras purificación por HPLC (Esquemas 9.1 y 9.2).



Esquema 9.2. Preparación de los gliconjugados **110-115**. Reactivos y condiciones: a) MeOH, 7 N NH₃, 24 h, t.a., 51-78%.

9.2.2. Evaluación de la afinidad de los gliconjugados frente a la lectina

PNA.

La evaluación de la afinidad de los galactósidos **95-97, 101-103, 107-109 y 113-115** hacia la lectina PNA se ha llevado a cabo empleando la técnica ELLA (Enzyme-

Linked Lectin Assay). Este ensayo determina la capacidad de los ligandos sintéticos de inhibir la asociación de la lectina a un ligando polimérico, un derivado de galactosa-poliacrilamida, que se encuentra inmovilizado en el pocillo de la microplaca. La lectina de cacahuete está marcada con la peroxidasa de rábano picante (HRP-PNA) que se emplea como sistema de visualización, pues la adición del sustrato de la peroxidasa, el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS), sobre la HRP-PNA que queda anclada en los pocillos, da lugar a una reacción colorimétrica que permite la cuantificación de la interacción. Los valores de IC_{50} son proporcionales a las afinidades de interacción. Los ensayos se repitieron seis veces para cada ligando y los valores no difirieron en más de un 15%. En las Figuras 9.3 (a-c) se recogen las gráficas ELLA, los valores de IC_{50} (μM) obtenidos en los ensayos (Figura d) y las potencias relativas en base molar de galactosa calculadas respecto al conjugado monovalente en cada serie (Figura e).

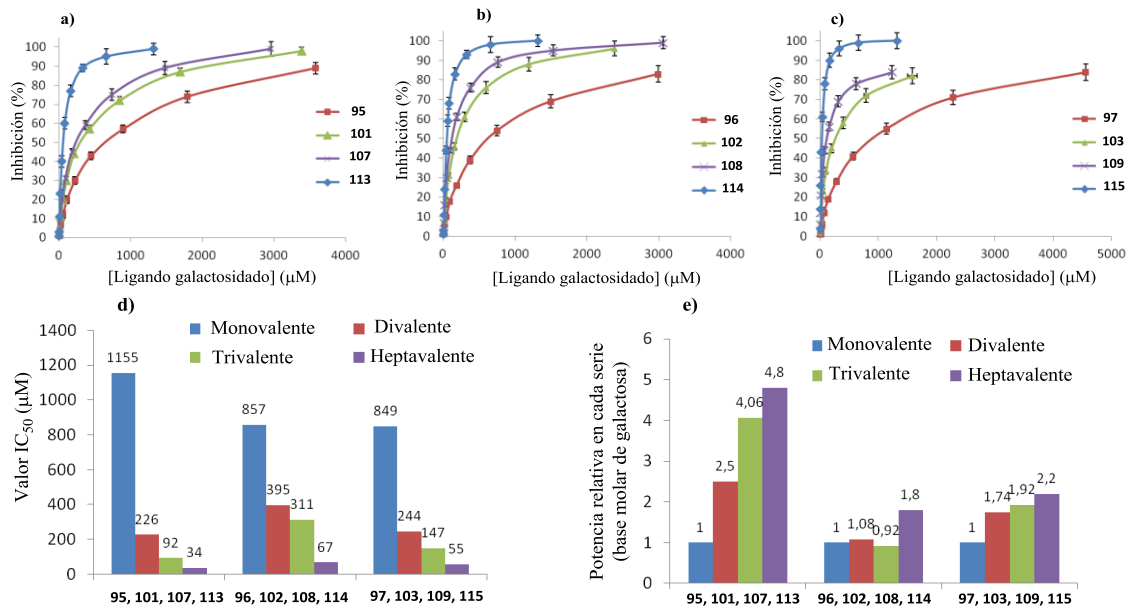


Figura 9.3. Gráficas ELLA para los conjugados galactosilados con espaciadores cortos (a), medios (b) y largos (c); (d) valores de IC_{50} (μM) para los conjugados galactosilados; (e) potencias relativas en base molar de galactosa.

El aumento de afinidad de los glicoconjugados multivalentes respecto a sus homólogos monovalentes se calcula como el cociente de sus valores de IC_{50} . Las potencias relativas resultan de dividir dicho valor de aumento de afinidad por la valencia (N) del glicoconjugado (2, 3 ó 7), lo que permite una comparación del efecto multivalente exhibido por los diferentes compuestos.

$$\text{Aumento de afinidad} = \frac{IC_{50}(\text{conjugado monovalente})}{IC_{50}(\text{conjugado multivalente})}$$

$$\text{Potencia relativa} = \frac{\text{Aumento de afinidad}}{N}; N = 2, 3, 7 (\text{valencia})$$

Los conjugados que presentaron un mayor efecto multivalente fueron los derivados con espaciadores más cortos (**101**, **107**, y **113**), que exhibieron incrementos de afinidad de 5, 12, y 33 veces superior a la del derivado monovalente **95**, lo que corresponde a potencias de inhibición en base molar de galactosa de 2.5, 4.1, y 4.8, respectivamente. Por el contrario, los conjugados **102** y **108**, con espaciadores de longitud intermedia (tres unidades de etilenglicol), mostraron una variedad en las afinidades de interacción puramente estadísticas, con valores de potencia relativa en torno a la unidad. El único derivado con espaciador medio que mostró un aumento de afinidad hacia la lectina fue el ligando heptavalente **114** (potencia relativa de 1.8). Sorprendentemente, los compuestos que presentan los espaciadores más largos (**103**, **109** y **115**, con ocho unidades de etilenglicol), también mostraron efecto multivalente (potencias relativas de 1.7, 1.9 y 2.2, respectivamente) pero con valores inferiores a los de sus homólogos con espaciador corto **101**, **107**, y **113**.

Los diferentes grados de efecto multivalente obtenidos al variar de la longitud del espaciador puede ser indicativo de distintos modos de interacción con la lectina en base a dicha característica estructural, por lo que habría que proponer mecanismos de unión diferentes para los conjuntos de compuestos de espaciador corto (**101**, **107** y **113**) y largo (**103**, **109** y **115**). Con respecto a los derivados de espaciador medio, se puede decir que el

aumento de afinidad observado para el ligando heptavalente **114** puede explicarse por la larga distancia entre los epítomos de los extremos más que por un efecto multivalente. La ausencia de efecto multivalente de sus homólogos divalente **102** y trivalente **108** apoya esta hipótesis.

Entre los posibles mecanismos de interacción carbohidrato-lectina, en el caso de estos glicoconjugados hay que descartar un modo de unión de tipo quelato, debido a que la distancia entre los CRDs de la PNA (57-59 Å) requeriría espaciadores mucho más largos para que las distintas unidades de galactósidos pudieran alcanzar, de manera simultánea, dos sitios de unión de una molécula de lectina.¹⁴ Además, un efecto de tipo quelato habría dado lugar a efectos multivalentes mucho mayores que los observados debido a la estabilización entrópica.

Otro posible mecanismo que conduce a un aumento de de afinidad es la formación de agregados ligando-lectina estabilizados. Kiessling y colaboradores¹⁵ han demostrado que algunos glicoclusteres pueden inducir la formación de agregados solubles con PNA, con el consiguiente incremento de efecto multivalente. En principio, cabe pensar en descartar también este tipo de procesos en el caso que nos ocupa dado que en los ensayos ELLA llevados a cabo, la presencia de la peroxidasa como marcador de la PNA impediría la formación de agregados debido a su gran tamaño.¹⁶ Además, durante los experimentos no se detectó la precipitación que pudiera ser debida a la formación de agregados lectina-carbohidrato insolubles. No obstante, este hecho será investigado con detalle.

Por tanto, en vista a las características estructurales de los multigalactósidos, se propuso, en primer lugar, un mecanismo de interacción basado en el entrecruzamiento de la PNA que se puede estudiar mediante ensayos ELLA de tipo “sándwich”.

9.2.3. Capacidad de entrecruzamiento de los glicoconjugados.

La capacidad de los multímeros para entrecruzar la lectina PNA se evaluó mediante un experimento ELLA tipo “sándwich”. En primer lugar se inmoviliza un polímero de lactosa sobre el pocillo de la microplaca y se añade PNA no marcada (y, por tanto, susceptible de ser entrecruzada) que quedará anclada al pocillo a través de uniones con el polímero. A continuación se añade una disolución de HRP-PNA con el glicoligando a diferentes concentraciones, y tras posterior lavado se determina espectrofotométricamente la cantidad de lectina marcada (HRP-PNA) que se ha fijado en el pocillo. La HRP-PNA quedará fijada como consecuencia de entrecruzamientos entre el la PNA, el ligando y la HRP-PNA, formando una estructura de tipo sándwich.

Los resultados obtenidos indican que la capacidad de entrecruzamiento depende tanto de la valencia como de la longitud del espaciador. El derivado heptavalente de espaciador largo, **115**, mostró la máxima cantidad de lectina fijada en comparación con el resto de derivados (Figura 9.4, a), y este valor se consideró como 100% para el cálculo de la capacidad de entrecruzamiento de los conjugados restantes, a una concentración fija de 1400 μM (Figure 9.4, b).

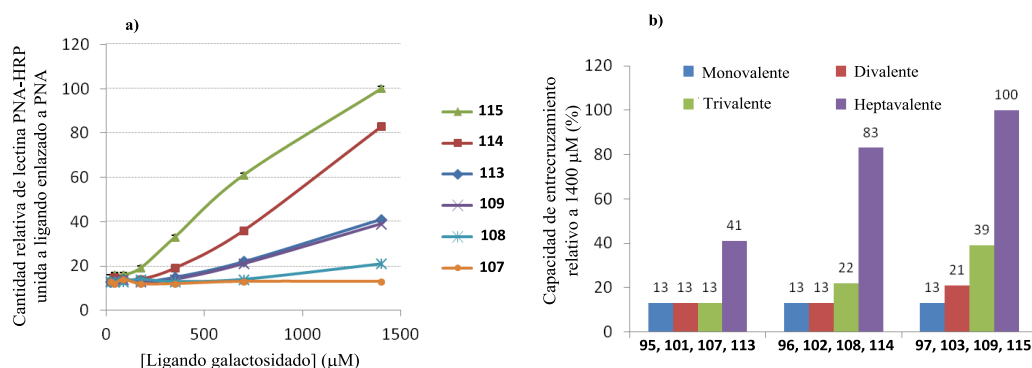


Figura 9.4. a) Capacidad de entrecruzamiento entre la PNA y la HRP-PNA para conjugados de galactosa determinados por ensayo ELLA de tipo “sándwich”. b) Capacidad relativa de entrecruzamiento (%) a 1400 μM .

Los derivados con las valencias más pequeñas y espaciadores más cortos, **95-97** (monovalentes), **101** y **102** (divalentes con espaciador corto y medio, respectivamente), y **107** (trivalente con espaciador corto) mostraron capacidad de entrecruzamiento prácticamente nula, pues presentaron una potencia de 13%, idéntico al valor residual de entrecruzamiento observado en ausencia de ligando. Dicho valor residual puede atribuirse a la presencia de epítomos de galactosa del polímero anclado al pocillo que permanezcan accesibles o a intercambios entre las dos lectinas marcada (HRP-PNA) y no marcada (PNA).

La capacidad de entrecruzamiento comenzó a observarse para los derivados con espaciador largo divalente (**103**) y trivalente (**109**) y el derivado trivalente con espaciador medio (**108**), con valores de 21, 39 y 22%, respectivamente. Los derivados heptavalentes **113-115** mostraron afinidades muy superiores, observándose un incremento intenso a medida que aumenta la longitud del espaciador, con porcentajes de 41, 83 y 100%, respectivamente. Este conjunto de resultados apoya que la capacidad de entrecruzamiento de los glicoconjugados aumenta con la valencia y la longitud del espaciador, pues ambas características estructurales resultan en una mayor distancia entre los epítomos de galactosa que les confiere la capacidad para unirse a dos moléculas de lectina de manera simultánea, evitando interacciones estéricas desfavorables entre las proteínas entrecruzadas. Por tanto, puede concluirse con que los glicoconjugados con mayores valencias y longitudes de espaciador presentan un efecto multivalente basado en un mecanismo de entrecruzamiento de la lectina.

9.2.4. Determinación de la capacidad de los conjugados de formar agregados con la PNA.

El ensayo ELLA de tipo sándwich es una herramienta útil para estimar la capacidad de entrecruzamiento relativa de los multímeros. Sin embargo, probablemente sobrestima la potencia real para formar agregados solubles con la HRP-PNA en los

ensayos ELLA convencionales en los cuales la lectina que debe ser entrecruzada, la PNA marcada con HRP anclada a los pocillos, presenta impedimento estérico, mientras que en los experimentos tipo sándwich se emplea una lectina menos impedida, la PNA no marcada, lo que favorece que se produzcan entrecruzamientos en una mayor extensión. Para confirmar o descartar la formación de agregados solubles entre los conjugados y la HRP-PNA se llevaron a cabo experimentos de DLS (*Dynamic Light Scattering*) empleando la lectina marcada y los diferentes glicoconjugados.

La lectina HRP-PNA aislada mostró un diámetro de 6 nm y la adición de los conjugados mono-, di-, y trivalentes (**95-97**, **101-103** y **107-109**, respectivamente) o el derivado heptavalente de espaciador corto **113**, dio lugar a una distribución de tamaños de partícula similar a la obtenida para la lectina en ausencia de ligandos, lo que descarta su capacidad de formación de agregados solubles (Figura 9.5.). La adición de disoluciones de los conjugados heptavalentes con espaciador medio y largo (**114** y **115**, respectivamente) sobre la muestra de lectina, condujo a la formación de un segundo conjunto de partículas polidispersas de tamaño en torno a los 12 nm, hecho que indica su capacidad para formar agregados solubles con la lectina.

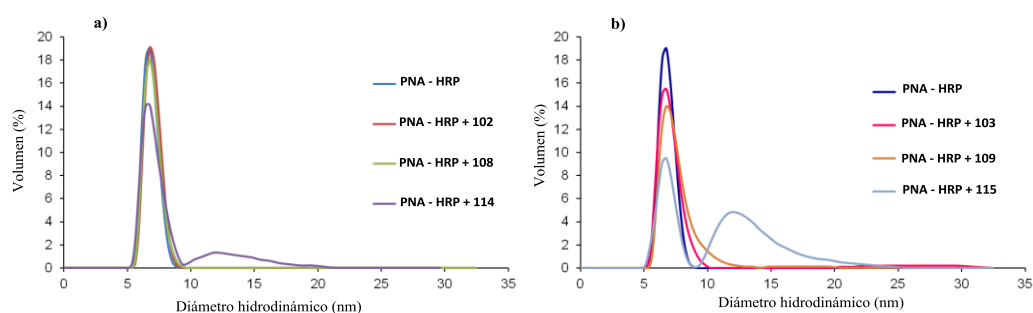


Figura 9.5. Experimentos DLS con la lectina marcada HRP-PNA y ligandos multivalentes con espaciadores medios- (a) o largos (b).

La velocidad de agregación de la PNA se ha determinado a partir de las variaciones de absorción ($\lambda = 490$ nm) experimentada tras la adición de los

glicoconjugados (Figura 9.6, a). Se confirmó que los compuestos mono-, di y trivalentes **95-97**, **101-103**, **107** y **109** no promueven la agregación y se observó una dependencia de las velocidades con la longitud del espaciador, como se deduce de los valores de velocidad de 0.38, 0.40, y 0.58 u.a./min obtenidos para los ligandos heptavalentes **113**, **114** y **115**, respectivamente. En el caso del derivado **115**, con espaciadores más largos, se formó una mayor proporción de estos agregados y a una mayor velocidad (Figura 9.5.b).

El hecho de que los derivados **114** y **115** sean los únicos capaces de formar agregados solubles está de acuerdo con su mayor potencia de entrecruzamiento determinada en los ensayos de tipo sándwich.

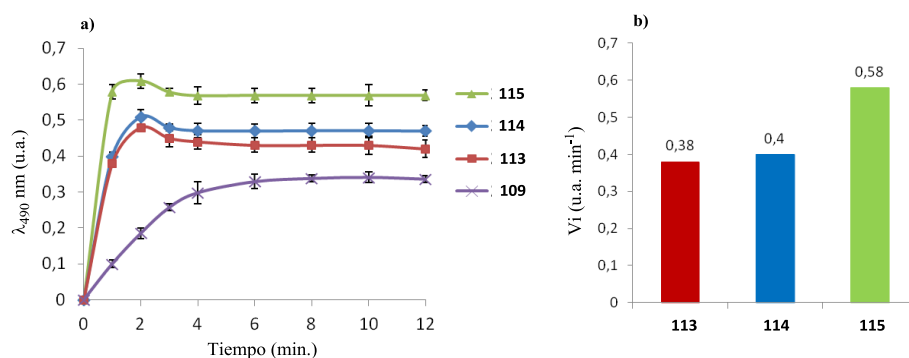


Figura 9.6. a) Variaciones de absorción de la PNA, a $\lambda = 490$ nm, tras la adición de los multilactósidos, en función del tiempo. Los compuestos **95-97**, **101-103** y **107-108** no promueven la agregación con PNA en estas condiciones. b) Velocidades iniciales de agregación para los conjugados heptavalentes **113-115**.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el efecto multivalente observado para los ligandos con valencias elevadas no es sólo consecuencia de su capacidad de entrecruzar lectinas sino que además tiene lugar la formación de agregados solubles de HRP-PNA, lo que implica que los experimentos ELLA no siempre están exentos de procesos de agregación, a diferencia de lo que cabía esperar debido al impedimento estérico que presenta la lectina marcada con HRP.

Puesto que los experimentos de entrecruzamiento y DLS descartan la formación de agregados solubles con los derivados mono-, di- y trivalentes, el efecto minicluster

observado en los ensayos ELLA de dichos compuestos debe atribuirse a una interacción estequiométrica 1:1 siguiendo uno de los tres modelos de unión representados en la Figura 9.1. De los tres, el mecanismo de “unión y re-captura” es significativamente diferente a los otros dos ya que, en ese caso, el incremento de afinidad no puede atribuirse a una estabilización entálpica con la lectina. El siguiente objetivo será el estudio de las bases moleculares del efecto minicluster.

9.2.5. Estudio del efecto minicluster mediante espectroscopía de fuerza atómica.

A continuación nos propusimos establecer la naturaleza del efecto minicluster observado para **101-109**, que no se debe a fenómenos de agregación o a un efecto quelato. Con objeto de discriminar entre un efecto multivalente debido al aumento de las fuerzas de interacción con PNA (Figuras 9.1, a y c) o a un mecanismo de “unión y re-captura” promovido por un aumento local de la concentración de galactósido (Figura 9.1, a), se llevaron a cabo medidas de espectroscopía de fuerza empleando un microscopio de fuerza atómica (AFM). Para ello, la lectina se inmovilizó sobre una superficie de oro y los galactósidos se unieron a la punta del AFM mediante un enlace covalente de tipo amida, lo que permitió determinar la fuerza de interacción no covalente entre los carbohidratos y la lectina. En la Figura 9.7 (a) se representa el histograma de distribución de fuerzas (frecuencia para cada intervalo de fuerzas) para la interacción del derivado trivalente de espaciador corto, **101**, con la PNA. Los resultados confirman que existe una importante interacción glicoligando-lectina, con una distribución de fuerzas monomodal de valor promedio de 30-60 pN (empleando una velocidad de tracción de la punta de $10000 \text{ pN}\cdot\text{s}^{-1}$), que es un rango de valores observado para lectinas similares para interacciones 1:1.¹⁷

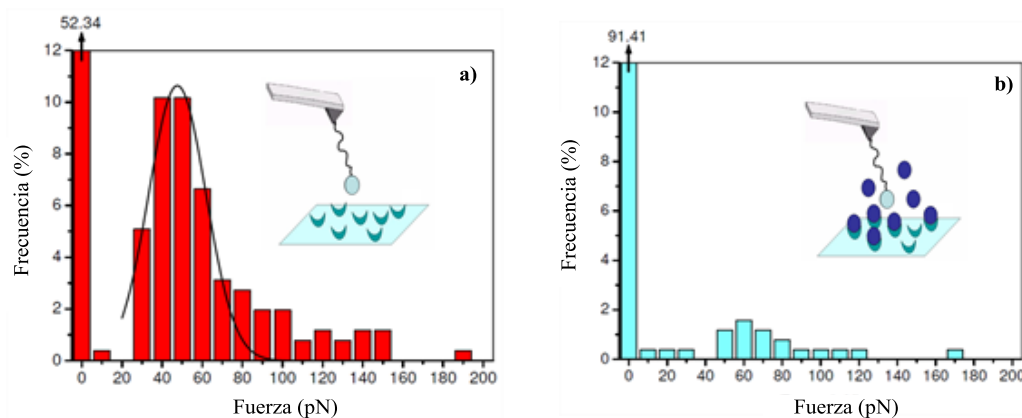


Figura 9.7. Histogramas de distribución obtenidos mediante espectroscopía de fuerza usando puntas de AFM modificadas con el ligando **101** en ausencia (a) o en presencia (b) de galactosa libre.

Con objeto de probar que las fuerzas medidas se deben únicamente a interacciones entre la lectina anclada a la punta del AFM y los motivos de galactosa, se llevaron a cabo experimentos de tipo competitivo. Al añadir galactosa en exceso sobre la lectina inmovilizada en la superficie de oro, de modo que se saturaran todos los sitios de unión de la proteína, se observó una disminución de considerable de la magnitud (la frecuencia) de las fuerzas registradas como consecuencia de la competición entre los residuos de galactosa del glicoligando unido a la punta del AFM y la galactosa libre, lo que confirmó la especificidad de la interacción que tiene lugar (Figura 9.7, b).

A continuación se llevaron a cabo estudios de interacción entre la lectina y los diferentes ligandos mediante espectroscopía de fuerza dinámica (*Dynamic Force Spectroscopy*, DFS) para evaluar cómo influye la estructura del glicoligando en las fuerzas de interacción con la lectina. En los experimentos DFS se registran curvas de fuerza a diferentes velocidades de tracción de la punta. En la Figura 9.8 (a) se han representado los perfiles de fuerza vs. velocidad de tracción para los derivados monovalentes de espaciador corto, medio y largo (**95-97**; se emplearon ligandos monovalentes para excluir el efecto de la valencia), y se observa que, aunque la fuerza aumenta con la velocidad de tracción de la punta del AFM, la interacción no se ve

influenciada por la longitud del espaciador, pues en los tres casos se han obtenido perfiles muy similares. Las fuerzas registradas para los diferentes ligandos se encuentran en el rango de valores característicos de lectinas similares interaccionan por un solo sitio de unión con sus ligandos.¹⁷

Cuando se compararon ligandos con igual longitud de espaciador y distinta valencia, como los derivados mono-, di- y trivalentes de espaciador largo, **97**, **103** y **109**, respectivamente, se registraron perfiles de fuerza-velocidad de tracción diferentes para cada compuesto, lo que indica que la valencia sí que es un factor que afecta a la magnitud de la interacción con la lectina (Figura 9.8, b).

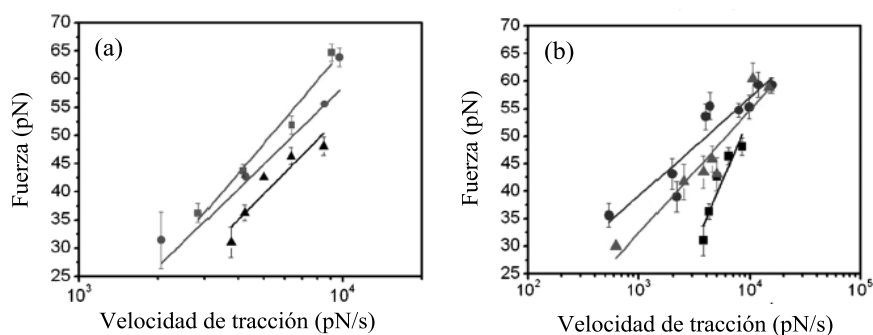


Figura 9.8. Resultados DFS obtenidos con los ligandos: (a) **95** (■), **96** (●) y **97** (▲) y (b) **97** (■), **103** (●) y **109** (▲).

Los resultados de los experimentos DFS se ajustaron al modelo Bell que permite la determinación de dos parámetros, la velocidad a fuerza cero, k_{off} , y la posición de la barrera de energía a lo largo de la coordenada de reacción, x_b , así como el tiempo de vida media de enlace ($\tau_{off} = 1/k_{off}$).¹⁸ En la Tabla 9.1 se muestran los parámetros de Bell para los ligandos seleccionados. Los ligandos presentan, en general, unos valores bastante elevados de k_{off} , lo que se corresponde con una baja estabilidad de la interacción con la PNA, y unos tiempos de vida de enlace cortos, en el rango de los milisegundos a los segundos. También cabe destacar que los valores de x_b son muy similares, en el rango de 0.2-0.5 nm.

Tabla 9.1. Parámetros de Bell determinados para diferentes glicoligandos.

Ligandos	Espaciador	Valencia	x_b (nm)	k_{off} (s^{-1})	τ_{off} (s)
95	Corto	1	0.170	27.323	0.037
101	Corto	2	0.272	14.249	0.070
107	Corto	3	0.375	2.279	0.439
96	Medio	1	0.223	23.072	0.043
97	Largo	1	0.198	35.314	0.028
103	Largo	2	0.523	0.836	1.196
109	Largo	3	0.418	3.678	0.272

De acuerdo con estos resultados de DFS, a la escala de moléculas individuales, se pueden observar algunas diferencias significativas en la asociación de la PNA con los diferentes ligandos. Los datos de espectros de fuerza obtenidos con los derivados de diferentes valencias de espaciador corto (**95**, **101** y **107**) y largo (**97**, **103** y **109**), revelan la existencia de regímenes de interacción que dependen del número de unidades de galactosa, tal y como se observa en la Figura 9.8 (b) y en los valores de la Tabla 9.1. Se observa un aumento de τ_{off} con el aumento de valencia, desde los milisegundos hasta las decenas de segundo o los segundos. Estudios realizados por Sulchek y colaboradores determinaron que el incremento del tiempo de vida media de enlace asociado a un aumento de unidades que se enlazan (en este caso, unidades de galactosa) indica que se está produciendo un efecto de multivalencia.¹⁹ Debido a que los espaciadores cortos son demasiado pequeños para interactuar a través de dos residuos de galactosa simultáneamente con dos sitios de unión de la misma molécula de lectina, la formación paralela de dos enlaces siguiendo los mecanismos b y c ilustrados en la Figura 9.1 son muy improbables. Esta suposición se confirma por los valores promedios de fuerza obtenidos (Figuras 9.7,a y 9.8), que se corresponden con interacciones individuales ligando-lectina. De hecho, la estabilización debida a múltiples interacciones ligando-PNA habría originado valores de fuerzas más elevados, que no se registraron en ningún caso. Por tanto, el efecto minicluster observado

en los ensayos ELLA para los derivados de espaciador corto (**95**, **101** y **107**) puede ser explicado únicamente por un mecanismo de unión y re-captura (Figura 9.1, a), donde opera un intercambio dinámico de los residuos de galactosa de un mismo ligando que se interaccionan con un mismo sitio de unión de la lectina. Este mecanismo está favorecido para los derivados de espaciadores cortos, ya que la longitud limitada de los espaciadores implica elevadas concentraciones locales de motivos de galactosa (los epítomos se encuentran muy próximos unos de otros), lo que favorece una mayor velocidad de unión y re-captura. Las tendencias observadas en el tiempo de vida media también apoyan esta hipótesis. Los derivados con espaciador corto, que seguirían el mecanismo descrito, aumentan su tiempo de vida media al aumentar la valencia (0.037, 0.070 y 0.439 s para **95**, **101** y **103**, respectivamente), lo que indica una que se está produciendo una interacción que se ve favorecida por el aumento de la multivalencia. Sin embargo, los tiempos de vida media de los ligandos con espaciador largo, **97**, **103** y **109**, fueron de 0.028, 1.196 y 0.272 s. La disminución de τ_{off} al pasar de valencia 2 a valencia 3 se debe, probablemente, a que el aumento de valencia no se traduce en un aumento de las interacciones como consecuencia de una mayor longitud del espaciador, que impide que exista una elevada concentración local de unidades de galactosa, de modo que no se puede producir un mecanismo de unión y re-captura.

9.3. Conclusiones.

Se han preparado, mediante acoplamiento de tipo click CuAAC, una serie de derivados de galactósidos multivalentes con valencias de uno a siete empleando plataformas glucosídicas y espaciadores de etilenglicol de longitud variable. Los ensayos de afinidad hacia la lectina PNA han demostrado los glicoligandos con espaciadores más largos y valencias más elevadas presentan efectos multivalentes significativos debido a su capacidad de entrecruzamiento y de agregación de la lectina. Sin embargo, los mayores efectos multivalentes se obtuvieron para derivados con espaciadores cortos, el llamado

efecto minicluster, que no puede atribuirse a la formación de agregados con la lectina. Su mecanismo de interacción fue investigado por AFM. Los valores de fuerza de interacción ligando-lectina determinados se corresponden con procesos que implican una sola unión entre el conjugado y la proteína, lo que descarta un modo de enlace de tipo quelato u otro tipo de estabilizaciones basadas en interacciones múltiples simultáneas con la PNA, pero apoyan un mecanismo de enlace y re-captura de los ligandos favorecido por la elevada concentración local de epítomos de galactosa. Este modo de acción implica un aumento del tiempo de vida media de unión del complejo. El conjunto de resultados ilustra que los ligandos multivalentes sintéticos que muestran muestras de interacción similares, con un receptor específico, que sus análogos multivalentes pueden presentar potencias mayores debido únicamente a efectos de concentración local.

Referencias

- ¹ Revisiones sobre lectinas: a) H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637–674; b) H.-J. Gabius, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, 56, 421–424; c) H.-J. Gabius, S. André, H. Kaltner, H.-C. Siebert, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2002**, 1572, 165–177; d) M. Ambrosi, N. R. Cameron, B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1593–1608.
- ² a) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 321–327; b) J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 555–578.
- ³ Revisions y capítulos de libro sobre ligandos multivalentes: a) R. J. Pieters, *Med. Res. Rev.* **2007**, 27, 796–816; b) R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 2013–2025; c) Y.-b. Lim, M. Lee, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 401–405; d) L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 2408–2429; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2348–2368; e) A. L. Baldini, A. Casnati, F. Sansone, R. Ungaro, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 254–266; f) A. Imberty, Y. M. Chabre, R. Roy, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 7490–7499; g) R. Roy, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, 15, 291–310; h) C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 1982–1990; i) N. Rockendorf, T. K. Lindhorst, *Top. Curr. Chem.* **2001**, 217, 201–238; j) Y. M. Chabre, R. Roy, *Adv.*

Carbohydr. Chem. Biochem. **2010**, *63*, 165-393; k) S. K. Choi, Synthetic Multivalent Molecules, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**; l) W. Jahnke, D. A. Erlanson, Fragment-based Approaches in Drug Discovery, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**; m) M. Hartmann, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3583-3609.

⁴ Revisión sobre diseño de ligandos multivalentes: D. Deniaud, K. Julienne, S. G. Gouin, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 966-979.

⁵ a) 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; b) E. K. Fan, Z. S. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663-2664; c) Z. Zhang, E. A. Merritt, M. Ahn, C. Roach, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, E. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12991-12998; d) D. Schwefel, C. Maierhofer, J. G. Beck, S. Seeberger, K. Diederichs, H. M. Müller, W. Welte, V. Wittmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8704-8719.

⁶ a) J. C. Sacchettini, L. G. Baum, F. C. Brewer, *Biochemistry* **2001**, *40*, 3009-3015; b) F. C. Brewer, M. C. Micelli, L. G. Baum, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 616-623.

⁷ a) M. S. Quesenberry, R. T. Lee, Y. C. Lee, *Biochemistry* **1997**, *36*, 2724-2732; b) J. M. Benito, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, I. Baussanne, J. Defaye, J. M. García Fernandez, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10355-10363

⁸ T. K. Dam, T. A. Gerken, B. S. Kavada, K. S. Nascimento, T. R. Moura, F. C. Brewer, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28256-28263.

⁹ a) K. L. Prime, G. M. Whitesides, *Science* **1991**, *252*, 1164-1167; b) K. L. Prime, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714-10721.

¹⁰ H. B. Mereyala, S. R. Gurralla, *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 351-354.

¹¹ O. Michel, B. J. Ravoo, *Langmuir* **2008**, *24*, 12116-12118.

¹² M. Almant, V. Moreau, J. Kovensky, J. Bouckaert, S. G. Gouin, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 10029-10038.

¹³ N. A. Rodios, *J. Heterocycl. Chem.* **1984**, *21*, 1169-1173.

-
- ¹⁴ R. Banerjee, K. Das, R. Ravishankar, K. Suguna, A. Surulia, M. Vijayan, *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 281-296.
- ¹⁵ S. D. Burke, Q. Zhao, M. C. Schuster, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4518-4519.
- ¹⁶ 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.
- ¹⁷ A. Touhami, B. Hoffmann, A. Vasella, F. A. Denis, Y. F. Dufrêne, *Langmuir* **2003**, *19*, 1745-1751.
- ¹⁸ (a) G. I. Bell, *Science* **1978**, *200*, 618-627; (b) E. Evans, K. Ritchie, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1541-1555.
- ¹⁹ T. Sulchek, R. Friddle, T. Ratto, H. Albrecht, S. DeNardo, A. Noy, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1161*, 74-82.

Capítulo 10
Conclusiones

10. Conclusions.

The ensemble of results obtained in this Thesis leads to the following conclusions:

FIRST. The incorporation of an aromatic substituent attached by a double bridge of benzyl ether to positions O-2 and O-3 of a single unit of a cyclodextrin glucopyranose promotes dimer formation in aqueous solution. For polycationic derivatives, this allows pre-organize the system to form bilayers in the presence of a plasmid DNA compaction thus favoring nanocomplexes formation in a hierarchical process. Due to the electrostatic repulsion of the polycationic clusters, stability of supramolecular dimers, and consequently of the nanocomplejos, depends on the pH, with a dimerization constant which is to two orders of magnitude at pH 7 with respect to pH 5. This range of pH values favors the formation of stable complexes with DNA in the extracellular medium (neutral pH) and their subsequent release into the cell upon acidification in endosomes. The higher transfection efficiency of xililenated derivatives with respect to its permethylated derivative counterparts supports this hypothesis.

SECOND. The polycationic preorganization of cyclodextrins for the efficient complexation of DNA may also be achieved by forming inclusion complexes with bis-adamantane derivatives. The stability of these multicomponent systems is also pH-dependent. Moreover, the synthetic versatility allows the incorporation of additional functional elements like disulfide bridges sensitive to redox potential. Transfection studies in COS-7 and HepG2 cells provided a proof of the concept.

THIRD. Both polycationic amphiphilic cyclodextrins and calixarenes are able to self-assemble spontaneously in presence of DNA to give nanocomplexes with excellent transfection properties. The comparative study shows that the optimum characteristics of

the cationic heads and the lipophilic chains are different for each scaffold and even depend on the cell line to be transfected.

FOURTH. The combination of a structural motif of hydrophobic calixarene type with a hydrophilic unit of cyclodextrin afforded heterodimers able to self-assemble into nanospheres and nanocapsules. The surface of these nanosystems expose the cyclodextrin units that are available for inclusion in the cavity of appropriate hosts, which allows the addition of new elements by post-functionalization strategies like receptor-targeted glycoligands. The potential of these vehicles drug targeted delivery has been shown for the anxiolytic diazepam and the anticancer drug doxetacel. Its vectorization towards macrophages by incorporating mannosylated dendrons that effectively recognize the mannose receptor in human macrophages has been demonstrated.

FIFTH. As part of our interest in establishing the molecular basis for effective recognition by lectins glycoligands, we studied the interaction between multigalactosides and peanut lectin agglutinin (PNA). With this purpose, ELLA competition assays, determination of hydrodynamic diameter of aggregates by DLS and atomic force microscopy experiments have been performed. The results indicate that the optimum structural features of ligand density and spacing between them are different depending on properties that are optimized: the increase of the affinity for a binding site of the lectin or the enhancement of cross-linking and aggregation of the protein.

10. Conclusiones.

El conjunto de resultados obtenidos en esta Tesis permite extraer las siguientes conclusiones:

PRIMERA. La incorporación de un sustituyente aromático unido mediante un doble puente de tipo bencil éter a las posiciones O-2 y O-3 de una única unidad de glucopiranososa de una ciclodextrina promueve la formación de dímeros en disolución acuosa. En el caso de derivados policatiónicos, esto permite preorganizar el sistema para la formación de bicapas en presencia de un plásmido de ADN favoreciendo la compactación y la formación de nanocomplejos en un proceso jerarquizado. Debido a la repulsión electrostática de los clústeres policatiónicos, la estabilidad de los dímeros supramoleculares, y consecuentemente de los nanocomplejos, depende del pH, siendo la constante de dimerización hasta dos órdenes de magnitud mayor a pH 7 que a pH 5. Este margen de valores de pH favorecería la formación de complejos estables de ADN en el medio extracelular (pH neutro) y su posterior liberación en el interior celular tras la acidificación en los endosomas. La mayor eficiencia de transfección de los derivados xililenados frente a sus homólogos permetilados apoyan esta hipótesis.

SEGUNDA. La preorganización de ciclodextrinas policatiónicas para la complejación eficaz del ADN puede también conseguirse mediante la formación de complejos de inclusión con derivados de tipo bis-adamantano. La estabilidad de estos sistemas multicomponentes es, igualmente, dependiente del pH. Además, la versatilidad sintética permite la incorporación de elementos funcionales adicionales, por ejemplo puentes disulfuro sensibles al potencial de oxido-reducción. Estudios de transfección en células COS-7 y HepG2 confirman la validez de la aproximación.

TERCERA. Tanto las ciclodextrinas como los calixarenos policationicos anfífilicos se autoorganizan espontáneamente en presencia de ADN para dar nanocomplejos con excelentes capacidades de transfección. El estudio comparativo realizado indica que las características óptimas tanto de las cabezas catiónicas como de las cadenas lipófilas difieren para una y otra plataforma e, incluso, dependen de la línea celular a transfectar.

CUARTA. La combinación de un motivo estructural de tipo calixareno hidrofóbico con una unidad hidrofílica de ciclodextrina permite obtener heterodímeros anfífilicos capaces de autoensamblarse para formar nanoesferas y nanocápsulas. La superficie de estos nanosistemas expone las unidades de ciclodextrina que están disponibles para la inclusión en su cavidad de huéspedes apropiados, lo que permite la incorporación de nuevos elementos mediante estrategias de post-funcionalización, por ejemplo, glicoligandos biorreconocibles. El potencial de estos vehículos para el transporte dirigido de medicamentos se ha demostrado para el ansiolítico diazepam y el anticanceroso doxetacel y se ha demostrado su vectorización a macrófagos mediante la incorporación de dendrones manosilados que reconocen eficazmente el receptor de manosa de macrófagos humanos.

QUINTA. En el marco de nuestro interés por establecer las bases moleculares para el reconocimiento eficaz de glicoligandos por lectinas, hemos estudiado la interacción entre multigalactósidos contruidos sobre soportes oligosacarídicos y la lectina de cacahuete (PNA). Para ello hemos empleado ensayos competitivos de tipo ELLA, determinación de diámetro hidrodinámicos de agregados mediante DLS y microscopía de fuerza atómica. Los resultados indican que las características estructurales óptimas de densidad de ligando y espaciado entre los mismos son diferentes según que se trate de maximizar la afinidad por un sitio de unión de la lectina o facilitar el entrecruzamiento y la agregación de la proteína.

Capítulo 11
Parte experimental

11. Experimental Part.

11.1. General Methods.

Reagents and solvents were purchased from commercial sources and used without further purification.

Thin-layer chromatography was carried out on aluminum sheets coated with *Silica Gel 60 F₂₅₄ Merck* (0.25 mm), with visualization by iodine vapour, UV light (λ 254 nm) and by charring with 10% H₂SO₄ in ethanol; ninhydrin 0.1% in ethanol; Mostain (20 g of ammonium (VI) molybdate·4 H₂O; 0.4 g of Ce(SO₄)₂·H₂O and 10% H₂SO₄ in 400 mL of H₂O); 5% phosphomolybdic acid in EtOH and heating at 100 °C.

Column chromatography was performed on Chromagel (SDS silice 60 AC.C 35-70 μ m or 70-200 μ m).

Optical rotations were measured at room temperature in 1 cm or 1 dm tubes on a Jasco P-2000 polarimeter using Na line (λ 589 nm), 0.5-1% (w/v) solutions.

Elemental analyses were performed at the Instituto de Investigaciones Químicas (Sevilla, Spain) using an elemental analyser *Leco CHNS-932* o *Leco TruSpec CHN*.

IR spectra were recorded on a Jasco FT/IR-4100 (ATR) spectrometer.

UV spectra were recorded on a Jasco UV-630 spectrometer at 25 °C.

¹H (and ¹³C NMR) spectra were recorded at 300 (75.5 for ¹³C), 400 (100.6 for ¹³C) and 500 (125.7 for ¹³C) MHz with, respectively, *Bruker AVANCE 300*, *Bruker*

AMX400 and Bruker AVANCE DRX 500 spectrometers. 2D COSY (Correlated Spectroscopy) and ^1H - ^{13}C (HMQC, Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence experiment) experiments were used to assist on NMR assignments. CDCl_3 , CD_3OD , CD_3CN , acetone- d_6 and D_2O have been used as solvents.

For **electrospray** mass spectra, 0.1 pM sample concentrations were used, the mobile phase consisting of 50% aq acetonitrile at 0.1 mL min^{-1} and were obtained with a Bruker Esquire 6000.

MALDI-TOF mass spectra were registered in a Bruker Daltonics Autoflex instrument in the linear positive mode with pulse ion extraction; 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) was used as desorption matrix. Matrix were prepared in 0.6 M in 50% aq. acetonitrile and diluted in an equal volume of the sample. Sample and matrix was co-crystallized on to the target plate. In certain cases, addition of aq. 30 mM NaCl to the mixture resulted in an improvement of the signal-to-noise ratio.

Preparation of complexes with CD:2MN. Saturated aqueous solutions of methyl 2-naphthalenecarboxylate (2MN) were prepared by weighting 2MN, adding milli-Q water, stirring for 48 h and filtering (cellulose Millipore filter, $0.5 \mu\text{M}$ diameter) to obtain solutions with constant concentration ($[\text{2MN}] = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) in all experiments. To prepare the complexes CD:2MN with CDs **137-142**, the required amount of the corresponding CD was weighed, 150 μL of 2MN solution was added ($[\text{2MN}] = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$), and the mixture was stirred for 24 h at rt. CD concentrations were 0-3.5 mM for derivative **137** and 0-10 mM for the rest of the derivatives (**138-142**). To prepare solutions of xylylene CDs in absence of 2MN, the required amount of the corresponding CD was weighed, milli-Q water was added and the mixture was stirred for 24 h at rt. CD concentrations were: 0.05-4.2 mM (**137**), 0.05-9.3 mM (**138**) and 0.06-13.9 mM (**139**).

The use of slightly larger CD concentrations than those used in our experiments resulted in the appearance of a certain turbidity.

Fluorescent measurements. Steady-state fluorescence measurements were performed by using a high sensitivity spectrofluorometer, the SLM 8100C Aminco. The fluorescence decay measurements were achieved on a Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC) FL900 Edinburgh Instruments Spectrometer with a thyratron-gated lamp filled with H₂. The system was equipped with two concave grating monochromators at both the excitation and emission paths and a red sensitive photomultiplier also immersed in a Peltier cooled housing. No polarizers were used. Data acquisition was carried out by using a multichannel time detector and a time window width of 200 ns with a total of 10 000 counts at the intensity maximum. The instrumental response function was regularly obtained by measuring the scattering of a Ludox solution. Temperature was controlled by a bath (Techne, TE-8A). Right angle geometry and cylindrical quartz 2 mm inner path cells were mainly used for most of the experiments. Inner effect corrections in the range of concentrations used were negligible.

Molecular mechanics (MM) and molecular dynamics (MD) calculations. MM calculations were performed with Sybyl X-1.2¹ and the Tripos Force Field.² The total potential energy is the sum of bond stretching, angle bending, torsion, van der Waals, electrostatics, and out-of-plane. A relative permittivity of 3.5 (1.0) was used for electrostatics interactions in the vacuo (in the presence of water).

Complexation of 2MN by neutral xylylene-CD derivatives.

Charged CDs **137-142** and the **2MN** guest, calculated by the MOPAC (AM1), were used in previous works.³

The strategy used for the emulation of the complexation of **2MN** by MM was similar to the ones used previously.⁴ The center of mass of the glycosidic oxygen atoms

of the CD was located at the origin of a coordinate system. Three parameters, the oo' projection on the y coordinate; the angle (θ) between the yz and the aromatic naphthalene **2MN** ring plane; and the oo' C9 angle (δ), define the **2MN** orientation relative to the host. **2MN** was forced to pass through the cavity along the y coordinate by both, polar (P) and non-polar (NP) orientations. Initial more feasible guest-host orientations for the approaching were obtained from the critical analysis of binding energies obtained by scanning δ (and θ) in the 10 - 100° (0 - 55°) range at 10° (5°) interval and y from $+10$ (Å) to -6 (Å) at 2 Å steps in vacuo. Then, fixed δ and θ angles, the 1:1 complexation was simulated by approaching **2MN** to the CD from $y = 20$ (Å) to -20 (Å) at 0.5 Å steps. Each structure created was solvated (PBC, MS), optimized, and saved for further analysis. Minima binding energy host-guest structures by MM were again optimized ($0.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-1}$) and were used as starting conformations to perform 1 ns MD simulations at 300 K. Characteristics of these simulations were similar to those used in some other dimerization processes^{2b, 2c} (i.e., equilibration period of 25,000 fs, integration time step of 2 fs, velocities rescaled at 100 fs intervals). Bonds containing H atoms were constrained so as not to vibrate during the whole trajectory, which consists of 4000 images, as data were saved every 250 fs.

Polycationic xylylene-CD derivative (3).

Charges for **3** were those for $2^{\text{II-VII}}, 3^{\text{II-VII}}$ -dodeca-*O*-methyl-2¹,3¹-*O*-(*o*-xylylene)cyclomaltoheptaose previously obtained by MOPAC except for the NH_3^+ substituent at the CD C-6 position, in which nitrogen was placed a net +1 esu charge and the rest of the charges for the substituent were rescaled to provide a total charge for **3** of +7 esu in the absence of chloride ions. Cut-off distances for van der Waals and electrostatics interactions were set at 8 Å. The MAXIMIN2 minimizer and the conjugate gradient termination method (gradients 0.2 and $3.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-1}$ in vacuo and with water, respectively) were used for energy optimization.⁵ Systems were solvated by the

Molecular Silverware algorithm (MS).⁶ Periodic Boundary Conditions (PBC) were also employed.

To study the dimerization of **3**, the four torsional angles of the bonds around the ether groups of the xylylene macroring linker were placed at the same positions as previously reported for X β CD.⁴ Based on our experience with other xylylene substituted CDs only the head-to-head architecture, in which the secondary rims of the dimerizing molecules are facing, was considered.⁴ Critical analysis of the structures generated by scanning the θ [$O(4)$ - o - o' $O(4')$] dihedral angle in the -180 to 180° range (10° intervals), the ε [o - o' $O(4')$] angle from 50 to 130° (10° intervals) and the y coordinate (oo' distance) from 20 to 6 \AA (1 \AA intervals) in the vacuum, followed by optimization (gradient $0.2 \text{ kcal/mol}\cdot\text{\AA}$) provided the most favourable θ and ε angles for approaching. Once these angles were fixed, a molecule of **3** was approached to another molecule of **3** centred at the origin of a coordinate system in 0.5 \AA steps along the y coordinate from 30 to 6 \AA in the presence of water (MS and PBC). Every structure was optimized and saved for further analysis. Minima binding energy (MBE) structures for dimers were optimized once again (gradient $0.5 \text{ kcal/mol}\cdot\text{\AA}$) and used as the starting conformation for the 1.0 ns MD simulations following the same strategy described earlier.^{3, 8} To diminish the computer time a cut-off of 8 \AA was employed in MD.

Theoretical background for the interaction between **3** and DNA. Molecular Mechanics (MM) and Molecular Dynamics (MD) calculations were also performed to study the structure and stability for the (**3**-dimer)-DNA₂ complex. Each B-DNA helical fragments contained twelve nucleotides with a CGCGAATTCGCG sequence. Charges for these fragments were determined by using the Gasteiger and Marsili method.⁷ As with previous calculations in the absence of DNA, a relative permittivity $\varepsilon = 1$ was used for electrostatic contributions in the presence of explicit water. As was done previously, water solvation was performed by using MS algorithm and PBC conditions. Non-bonded

cut-off distances for MM, as well as for MD were set at 12 Å. MM calculations start from the MBE 1-dimer structure obtained from preceding MM calculations of the single dimer in the presence of water. The dimer was placed with its centre of mass at the origin of a coordinate system between the two symmetrically located and oriented DNA helix fragments. DNA fragments were initially placed at distances where they hardly interact with the dimer structure (35 Å from the origin). To investigate the dimer stabilization in the presence of DNA moieties and the structure and interactions responsible for the stabilization of the whole system, both DNA1 and DNA2 fragments were simultaneously approached to the 1-dimer, in 1 Å steps along the *y* coordinate from *y* = +35 to 10 (Å) and from *y* = -35 to -10 (Å) respectively. Two types of orientation for the DNA moieties were considered: (i) one in which the two double helix DNA fragments approach the dimer by the *major groove* and (ii) one in which they do so by the *minor groove*. Every structure generated was solvated (MS and PBC) and optimized (gradient 3 kcal/mol·Å). Minima binding energy (MBE) structures for the system were optimized once again (gradient 0.5 kcal/mol·Å) and used as the starting conformations for a 1.0 ns MD simulations following the same strategy above described for a single 3-dimer formation. To maintain a regular helical structure for the pair of DNA chains and to avoid the partial fraying of the end portions of this short DNA helix during MD, the simulations were also performed on the MBE structures where N···HN hydrogen bond distances for each pair of nucleobases were constrained to keep them constant. For this purpose a harmonic penalty function was added to the force field equation for those atoms which are involved in the constraint. This energy function can be written as $E = k (r-r_i)^2$, where $k = 200$ kcal/mol·Å², r_i and r are the initial distance and during the MD trajectory, respectively.

Polycationic Amphiphilic βCD-bis-adamantane trimer(148:14) and DNA.

Molecular Mechanics (MM) and Molecular Dynamics (MD) calculations were performed to study the polycationic amphiphilic βCDs (*pa*βCD)₂-bisadamantane(*bADA*)

trimer stability in the absence and in the presence of two B-DNA helical fragments in water were performed following the same procedure described above for derivative **3**.

Circular dichroism experiments were performed in a Jasco-715 spectrometer using quartz 1 mm – 10 cm inner path cells depending on required concentration. Temperature was controlled by a Peltier system.

Preparation of pDNA complexes with synthetic vectors. The preparation of the DNA complexes from the CD or CA₄ and reference vectors bPEI (branched polyethyleneimine) and LTX (Lipofectamine), has been performed according to a procedure which has been detailed elsewhere.⁸ Different plasmid DNA were used, luciferase-encoding pDNA pTG11236 (pCMV-SV40-luciferase-SV40pA, 5739 base pairs) and eFLuc (pCpG-hCMV-SPEC-eFLuc, 4640 base pairs)⁹, and Green Fluorescent Protein-encoding pDNA (pEGFP-C1, 4731 base pairs). The quantities of compound used were calculated according to the desired DNA concentration of 0.02 mg·mL⁻¹ or 0.07 mg·mL⁻¹ (*i.e.* 60 μM or 200 μM phosphate, respectively), the N/P ratio (1, 2, 5, 10, 20 or 50), the molar weight, and the number of protonable nitrogens in the selected CD or calyx[4]arene derivative or cationic polymer (bPEI). For the preparation of the DNA complexes from CD derivatives, pDNA was diluted in HEPES (20 mM, pH 7.4) to a final concentration of 60 μM, and then the bPEI polyplexes, DNA was diluted in a 150 mM NaCl solution to a final phosphate concentration of 60 μM, and then the desired amount of bPEI was added from a 7.5 mM NaCl solution (prepared from a 0.1 M stock solution in H₂O). The preparations were vortexed for 2 h and used for particle size measurements and transfection experiments.

Agarose gel electrophoresis. Each vector:DNA complex (20 μL, 0.4 μg of plasmid) was submitted to electrophoresis for about 30 min under 150 V through a 0.8% agarose gel in TAE 1X (Tris-acetate-EDTA) buffer and stained by spreading GelRed

Nucleic Acid Stain (Biotium). The DNA was then visualized after photographing on an Alphaimager Mini UV transilluminator. The plasmid integrity in each sample was confirmed by electrophoresis after decomplexation with sodium dodecyl sulfate (SDS, 8%).

DNA protection assays. For protection assays, DNase I (1U/ μ g pDNA) was added to each sample and stirred for 30 min at 37 °C. 20 μ L of EDTA 0.25 M was added to inactivate DNase and the sample was vortexed and incubated for 5 min. 20 μ L of SDS 25% was added and further incubated for 5 min. Samples were electrophoresed as described above. Plasmid integrity was compared with free pDNA treated and untreated.

Hydrodynamic diameter and ζ -potential of the CDplexes. The average sizes of the CDplexes were measured using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) with the following specification: sampling time, automatic; number of measurements, 3 per sample; medium viscosity, 1.054 cP; refractive index, 1.33; scattering angle, 173°; λ = 633 nm; temperature, 25 °C. Data were analyzed using the multimodal number distribution software included in the instrument. Results are given as volume distribution of the major population by the mean diameter with its standard deviation. No significant differences were encountered when the data were expressed in intensity or number distributions. This is consistent with a spherical topology of the nanoparticles. ζ -Potentials were determined using the “mixed-mode measurement” phase analysis light scattering (M3-PALS). Before each series of experiments, the performance of the instruments was checked with either a 90 nm monodisperse latex beads (Coulter) for DLS or with DTS 50 standard solution (Malvern) for ζ -potentials.

Formvar-carbon coated grids (Cu, 200 mesh), previously made hydrophilic by glow discharge, were negatively stained with 1% aqueous solution of uranyl acetate. After 5 min of contact with a few drops of that solution, the drops were removed and the grids were dried for 24 h. Then, the grids were placed on top of small drops of the samples (HEPES 20 mM, pH 7.4, DNA 303 μ M phosphate) prepared as described above.

After 5 min of contact, the drops were removed and the grids were dried for 24 h. They were then observed with a Philips CM12 electron microscope working under standard conditions. All these experiments were reproduced twice on each formulation. All these experiments were reproduced twice on each formulation.

Transfection experiments (COS-7 cell line, luciferase-encoding pDNA).

COS-7 cells (African green monkey kidney) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma) and 1% (v/v) penicillin–streptomycin (Sigma), at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. The cells were harvested by trypsinization three times a week using Trypsin/EDTA (Sigma) and phosphate-buffered saline (PBS, Dulbeccos's Phosphate B., Sigma) was use to wash cells.

Twenty-four hours before transfection, COS-7 cells were grown at a density of 2×10^4 cells/well in a 96-well plates in the suitable complete culture media, in a wet (37 °C) and 5% CO₂/95% air atmosphere. The above CD or calixarene: pDNA complexes and PEI:pDNA polyplexes, previously formulated and incubated for 2 h as described above, were diluted to 100 µL in DMEM or in DMEM supplemented with 0%-60% fetal bovine serum in order to have 0.5 µg of pDNA in the well (15 µM phosphate).

The culture medium was removed and replaced by these 100 µL of complexes and it was incubated at 37°C under at 5% CO₂ atmosphere. After 4 h and 24 h, 50 and 100 µL of DMEM supplemented with 30% and 10% FCS, respectively, were added. After 48 h, the transfection was stopped, the culture medium was discarded, and the cells washed twice with 100 µL of PBS and lysed with 50 µL of lysis buffer (Promega, USA). The lysates were frozen at -80 °C, before the analysis of luciferase activity. This measurement was performed in a luminometer (Synergy HT, BioTek) for 10 s on 20 µL on the lysis mixture and using the luciferase determination system (Promega) in 96-well plates. The total protein concentration per well was determined using a protein assay kit

(BioRad). Luciferase activity was calculated as nanograms (ng) of luciferase per mg of protein (based on a standard curve for luciferase activity). The data were calculated from three or four repetitions in two fully independent experiments (formulation and transfection).

Transfection experiments (HepG2 cell line, luciferase-encoding pDNA, 48-well screening). HepG2 (human hepatoblastoma) cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) were maintained at 37 °C under 5% CO₂ in complete medium constituted by Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose + glutaMAX® (Gibco BRL Life Technologies) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). Cells were passaged by trypsinization twice a week. Transfection experiments were performed following the same procedure described above, using 48-well plates (Iwaki Microplate, Japan).

Transfection experiments (COS-7 and RD-4 cell lines, green fluorescent protein-encoding pDNA). RD-4 (human Rhabdomyosarcoma cell line (obtained from David Derse, National Cancer Institute, Frederick, MD) and COS-7 (African green monkey kidney cells; ATCC (#CRL-1651)) were grown in EMEM medium containing NEAA, 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 IU ml⁻¹ penicillin and 100 µg ml⁻¹ streptomycin. All cultures were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were subcultured to a fresh culture vessel when growth reached 70–90% confluence (that is, every 3–5 days) and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Transfections were performed in 24-well plates, when cells were 80% confluent (~5 × 10⁴ cells) on the day of transfection. Plasmid (2.5 µg corresponding to 1nM) and different concentrations of ligands were added to 1 ml of serum-free medium (DMEM, 2 mM L-glutamine and 50 µg ml⁻¹), mixed rapidly and

incubated at room temperature for 20 min. Following the removal of the culture medium from the cells, 0.5 ml of transfection mixture were carefully added to every well. Lipoplex formulations with helper lipid were prepared adding a 2 mM ethanol solution of DOPE to plasmid–ligand mixture at 1/2 ligand/DOPE molar ratio, where ligand concentration was kept to 10 μ M. These solutions administered to the cells were completely clear and homogeneous. LTX and PEI transfection reagent were used according to manufacturer's protocol as a positive transfection control.

The mixture and cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ for 5 h. Finally, transfection mixture was removed and 1 ml of growth medium added to each transfected well and left to incubate for 72 h. Five fields were randomly selected from each well without viewing the cells (one in the centre and one for each quadrant of the well) and examined. The transfected cells were observed under fluorescence microscope for enhanced green fluorescent protein expression. Each experiment was done at least three times. Statistical differences between treatments were calculated with student's *t*-test and multifactorial analysis of variance.

Different methods were used to measure cell viability:

Total protein method. The percentage of cell viability was calculated as the ratio of the total protein amount per well of the transfected cells relative to that measured for untreated cells x 100. The data were calculated from three or four repetitions in two fully independent experiments (formulation and transfection).

Cell viability by Alamar Blue method. Cell viability was quantified by a modified Alamar blue® assay (Invitrogen). Briefly, 1 mL of 10% (v/v) Alamar blue dye in complete medium was added to each well 48 h post-transfection. After 2.5 h of incubation at 37 °C, 200 μ L of the supernatant was assayed by measuring the absorbance

at 570 and 600 nm. Cell viability (as percentage of control cells) was calculated according to the formula $(A_{570} - A_{600})$ of treated cells $\times 100 / (A_{570} - A_{600})$ of control cells.

MTT assay. For MTT assay $3 \cdot 10^3$ cells (RD4 or COS-7) were seeded in 96 well plates and incubated at 37°C, in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ till confluence. 50 µl per well of the selected dilution of the calixarenes were then added, usually compounds were tested in a range from 40 to 2,5 µM with or without DOPE (maintaining the molar ratio 1:2, calixarenes and DOPE respectively). Compounds extremely toxic were tested till 0,6 µM. The plates were incubated for 24 hours at 37°C, 5% CO₂. 10 µl per well of MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) were then added at the final concentration of 5 mg/ml (MTT can be diluted in sterile PBS or in medium) and after an incubation of 6 hours 100 µl per well of a lysant (10%SDS and 0,01M HCl in dH₂O) were added. Plates were sealed and incubated overnight at 37°C, 5% CO₂. The absorbance was read at 620 or 540 nm after shaking of the plates. The rate of toxicity/survival was calculated respect to the controls, the cell line incubated in absence of the compound.

Statistical analysis. Statistical tests were performed with STATGRAPHICS Plus 5.0 software. Analysis of variance (Anova) was run on the logarithmic transformation of transfection levels (\log_{10} [fg luciferase per mg protein]) and on the cell viability to fit normal distributions of the data. Two factors, that is, the nature of the complexing agent (CD derivative and bPEI) and the N/P ratio, were analyzed as the source of the variation of logarithmic transformation of the transfection levels and of cell variability percentages using a multiple comparison procedure. Tukey's honestly significant difference (HSD) method was used to discriminate among the means of cell viability percentages and the logarithmic transformation of luciferase expression levels.

Fluorescence Binding Titration. The association constant of the complex **1**:TNS (K_{as}) was determined by measuring the fluorescence increase of a solution of the fluorescent probe upon addition of compound **1** in an aqueous phosphate buffer (10 mM, pH 7.3). Fluorescence spectra between 390 and 650 nm were measured in a conventional 1-cm quartz cell at 32 ± 0.1 °C. The excitation and emission slits were 10 nm. The excitation wavelength was 350 nm. In a typical titration experiment, a 10^{-5} M solution of TNS in phosphate buffer was prepared, a 2-mL aliquot was transferred to the quartz cell, and the initial fluorescence spectrum was recorded. A solution (1 mM) of **1** in the previous probe solution was prepared and then added via microsyringe in portions. These amounts were increased until complete complexation of the fluorescent probe. The fluorescence spectrum of each solution was recorded and the fluorescence intensity at a particular wavelength obtained at 10-15 different host-guest concentration ratios were used in an iterative least-squares fitting procedure.

^1H NMR pH titration. ^1H NMR spectra were registered at 25 °C, pH 3-12, using 19:1 H_2O - D_2O solutions containing 10 mM HCl and 100 mM NaCl. After registering the initial spectrum, NaOH 10 mM aliquots were added. These aliquots contained the CD derivative (**148**, at 2 mM), the bis-adamantane **14** (1 mM) and NaCl (100 mM).

Isothermal titration calorimetry (ITC).¹⁰ All experiments were carried out using a CSC Model 5300 Nano-ITC III. Adamantane derivatives solutions were 0.045 or 0.09 mM with in MilliQ water with 2% DMSO and solutions of CD (**148**) were 1.4 or 2.8 mM in MilliQ water with 2% DMSO. Chemical titrations were performed at 25 °C by injecting 10 μL (except the first injection, that was 5 μL) of **148** for a total of 25 injections into a cell containing 1300 μL of the corresponding adamantane derivative solution (**9-11**, **13**, **14** and **19**), using a 900 seconds equilibration time, 480 seconds between injections and stirred at 250 rpm. All the solutions were degassed prior to use. Data were corrected for heats of dilution by subtracting the excess heat at a high molar

ratio of CD to adamantane derivative. The experiment was computer controlled using Bindworks 3.0 software. OriginPro 8 software was used for data analysis. The entropy and Gibbs free energy was calculated using the equation $\Delta G = -RT\ln K_a = \Delta H - T\Delta S$.

Atomic Force Microscopy (AMF) for complexes with DNA. Sample preparation and AFM imaging. DNA samples were prepared by diluting the plasmid DNA (pEGFP-C1, 4731 base pairs) to a final concentration of 0.25 nM in deposition buffer (20 mM HEPES, 10 mM NaCl, 2 mM, MgCl₂, pH = 7.4) either in the presence or absence of compounds. To formulate the complexes, the desire amount of calixarene or cyclodextrine derivative was added from 10 to 50 mM stock solutions (DMSO or H₂O), to obtain samples at N/P ratio from 0.5 to 10 and concentrations of compound from 0.08 μM to 170 μM. The mixture was incubated for 5 min at room temperature. Then a 20 μL droplet was deposited onto freshly-cleaved ruby mica (Ted Pella, Redding, CA) for 1.5 min. The mica disk was rinsed with milliQ water and dried with a weak nitrogen stream. AFM imaging was performed on the dried sample with a Nanoscope IIIA Microscope (Digital Instruments Inc. Santa Barbara, CA) operating in tapping mode. Commercial diving board silicon cantilevers (NSC-15 Micromash Corp., Estonia) were used. Images of 512×512 pixels were collected with a scan size of 2 μm at a scan rate of 3-4 lines per second and were flattened after recording using Nanoscope software.

Preparation of homogeneous unloaded nanospheres. The nanoparticle suspensions were prepared using the nanoprecipitation technique¹¹ taking advantage of the spontaneous self-assembling capabilities of amphiphilic heterodimer βCD-calixarene derivatives when dispersed into an aqueous phase. Briefly, the corresponding amphiphilic derivative was dissolved in anhydrous acetone or methanol to a final concentration of 0.5 mM and this solution was incorporated dropwise for 5 min into an equal volume of distilled water with magnetic stirring (300 rpm) at 25 °C. Nanoparticles were formed

spontaneously and the organic solvent was removed under reduced pressure at 35 °C. The aqueous suspension was characterized, and stored in closed vials.

Preparation of homogeneous unloaded nanocapsules. The corresponding amphiphilic derivative was dissolved in anhydrous acetone or methanol at 0.5 mM containing a small amount (1% v/v) of capric/caprylic triglycerides (LabrafacLipophile WL1349) and non-ionic hydrophobic surfactant (Span 80, 2 mg·mL⁻¹). This solution was added dropwise into milliQ water (twice the volume of acetone or methanol) containing a non-ionic hydrophilic surfactant (Polysorbate 80, 2 mg·mL⁻¹), under magnetic stirring (300 rpm) at 25 °C. Nanoparticles were formed spontaneously and organic solvent was removed under reduced pressure at 35 °C. The nanoparticle suspensions were prepared in triplicate and were stored in closed vials at +6 °C.

Preparation of homogeneous diazepam or docetaxel-loaded nanospheres and nanocapsules. The nanoparticle suspensions were prepared following the above described procedures respectively, from acetone or methanol solutions containing both, the corresponding amphiphilic derivative (0.5 mM) and diazepam (2 mM) or docetaxel (0.625 mM). To formulate drug loaded-nanospheres, polysorbate 80 (Polisorbate 80) was added to the aqueous phase at a concentration of 1 mg·mL⁻¹ before nanoprecipitation. The nanoparticle suspensions were prepared in duplicate and were stored in closed vials at +6 °C. The recovery of DZ was determined spectrophotometrically at 230 nm following solubilization of a known volume of the suspension in methanol. Unloaded Docetaxel was eliminated by centrifugation (5000 rpm, 15 min) and a known volume was dissolved in MeOH. The amount of drug in the formulations was determined spectrophotometrically at 230 nm.

Atomic Force Microscopy (AMF) for nanospheres and nanoparticles of heterodimers. Sample preparation and AFM imaging. Nanospheres and nanocapsules were prepared as described above. Then 50 μL of 3-aminopropyltriethoxysilane solution (10% in water) was deposited onto freshly-cleaved ruby mica (SPI, V-4) for 40 min and the mica was washed with Milli-Q water. Then, 50 μL of nanospheres solution was deposited onto the mica for 20 min. Then the mica was washed with Milli-Q water and it was dried at rt for 30 min. Commercial diving board silicon cantilevers (Pointprobe-Plus Silicon-SPM-Sensor, Nanosensors. resonance frequency 204-497 kHz) were used. AFM imaging was performed on the dried sample with a Molecular Imaging PicoPlus 2500 microscope (Agilent Technologies) operating in tapping mode. Images of 256×256 pixels were collected with a scan size of 5 μm at a scan rate of 0.5-1 Hz and were flattened after recording using PicoView 1.14.3 software.

Diazepam and docetaxel recovery. Unloaded docetaxel or diazepam was eliminated by centrifugation (5000 rpm, 15 min) and a known volume was dissolved in MeOH. The recovery of DZ in the colloidal suspensions was assayed spectrophotometrically at 230 nm following solubilization of a known freeze-dried volume of the suspension in methanol.

In vitro release kinetics of diazepam and docetaxel delivery. In vitro release kinetics studies were performed by dialysis (cutoff of 12kDa, Sigma), in phosphate buffer saline medium (PBS, 0.01 M, pH 7.3, 37°C). 5 mL of drug-loaded nanospheres or nanocapsules were dialyzed against 250 mL (DZ) or 125 mL (Docetaxel) of PBS smoothly stirred. Samples were withdrawn each hour, measured spectrophotometrically at 230 nm and then returned to system. Concentration of DZ or Docetaxel in the saline media was determined by absorbance interpolation in a PBS calibration curve.

Inhibition of concanavalin A (Con A) and hMMR-immobilized mannan binding by enzyme-linked lectin assay (ELLA). Nunc-Inmuno™ plates (MaxiSorp™) were coated overnight with yeast mannan at 100 μL /well diluted from a stock solution of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 10 mM phosphate buffer saline (PBS, pH 7.3 containing 0.1 mM Ca^{2+} and 0.1 mM Mn^{2+}) at room temperature. The wells were then washed three times with 300 μL of washing buffer (containing 0.05% (v/v) Tween 20) (PBST). The washing procedure was repeated after each of the incubations throughout the assay. The wells were then blocked with 150 μL /well of 1% BSA/PBS for 1 h at 37 °C. After washing, the wells were filled with 50 μL of 20 mM HEPES buffer (pH 7.4) and 50 μL of serial dilutions of horseradish peroxidase labelled concanavalin A (Con A-HRP, Sigma) from 10^{-1} to 10^{-4} $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in PBS, and incubated at 37 °C for 1 h. The plates were washed and 50 μL /well of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) (0.25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in citrate buffer (0.2 M, pH 4.0 with 0.015% H_2O_2) was added. The reaction was stopped after 20 min by adding 50 μL /well of 1 M H_2SO_4 and the absorbances were measured at 415 nm. Blank wells contained citrate-phosphate buffer. The concentration of lectin-enzyme conjugate that displayed an absorbance between 0.8 and 1.0 was used for inhibition experiments.

In order to carry out the competitive lectin binding inhibition experiments, each compound was added in a serial of 2-fold dilutions (60 μL per well) in PBS to 60 μL of the appropriate Con A-HRP concentration in PBS buffer on Nunclon™ (Delta) microtitre plates and incubated for 1 h at 37 °C. HEPES was used instead of PBS for the preparation of paCD and paCD-pDNA nanocomplexes suspensions. The above solutions (100 μL) were then transferred to the mannan-coated microplates, which were incubated for 1 h at 37 °C. The plates were washed and the ABTS substrate was added (50 μL per well). Color development was stopped after 20 min and the absorbances were measured. The percent of inhibition was calculated as follows:

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 \times (A_{(\text{no inhibitor})} - A_{(\text{with inhibitor})}) / A_{(\text{no inhibitor})}$$

IC₅₀ values (concentration required for 50% inhibition of the lectin–immobilized yeast mannan association) were calculated relative to that reported for methyl α -D-mannopyranoside (865 μM).¹² Typically, the IC₅₀ values obtained from several independently performed tests were highly reproducible.

For determination of recombinant human MMR (rhMMR) binding affinity, the wells were filled with 100 μL of serial dilutions of rhMMR from a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ stock solution in PBS (pH 7.3 containing 0.1 mM Ca^{2+} and 0.1 mM Mn^{2+}), and incubated at 37 °C for 1 h. The plates were washed three times with PBST as described above and 100 μL of a solution of biotinylated anti-human MMR antibody (0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, R&D Systems) in PBS was added in each well, and the plates were further incubated for 1 h at 37 °C. The complex NeutrAvidin®-biotinylated HRP was preformed separately by successively adding to Tris buffer (9.6 mL, 50 mM, pH 7.6) a solution of Neutravidin® (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in Tris buffer, 1.2 mL, Thermo Scientific) and a solution of biotin-conjugated HRP (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in Tris buffer, 1.2 mL, Thermo Scientific). The mixture was shaken for 30 min at rt and the solution was immediately transferred into the plates (60 μL /well). After 1 h at 37 °C, these plates were washed twice with Tris (250 μL /well) and ABTS (0.25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 50 μL /well) in citrate buffer (0.2 M, pH 4.0 with 0.015% H_2O_2) was added. After 5 min at rt, the optical density was measured at 415 nm. Blank wells were processed with anti-human MMR antibody as well as NeutrAvidin®-biotinylated HRP. The concentration of rhMMR that displayed an absorbance between 0.8 and 1.0 was used for inhibition experiments. For the competitive lectin binding inhibition experiment, (ManS)₃- β CD was mixed in a serial of 2-fold dilutions (60 μL per well) in HEPES buffer (20 mM, pH 7.4) with 60 μL of the appropriate rhMMR concentration in PBS buffer on Nunclon® (Delta) microtitre plates and incubated for 1 h at 37 °C. The above solutions (100 μL) were then transferred to the mannan-coated titer plates, which were incubated for 1 h at 37 °C. The plates were washed and the solution of biotinylated anti-human MMR antibody in PBS

(100 μL) was added in each well, and the plates were further incubated for 1 h at 37 °C. Then the NeutrAvidin solution was transferred into the plates (60 $\mu\text{L}/\text{well}$). After 1 h at 37 °C, these plates were washed twice with Tris (250 $\mu\text{L}/\text{well}$) and ABTS was added (50 $\mu\text{L}/\text{well}$). Optical density at 415 nm was determined after 5 min.

Competitive ELLA experiments in the presence of adamantane 1-carboxylate sodium salt. To nanosphere formulations obtained from $\beta\text{CD-CA}_4$ heterodimers decorated with 30% of **84** at 31.25 μM (based on **84**), adamantane 1-carboxylate sodium salt (AC) was added so as to have a final concentration of 312.5 μM (10-fold excess with respect to **84**). The capacity of these new formulations to inhibit the association of human MMR to immobilized yeast mannan according to the above ELLA experimental setup was next determined in comparison with the corresponding formulations before addition of AC. As a control, the effect of a 10-fold excess of AC on the inhibition potency of **84** under identical conditions was found to be negligible.

Two-site ELLA (sandwich assay). Nunc-Inmuno plates (MaxiSorp) microtitration plates were coated with peanut lectin (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) from a stock solution of a concentration of 5 mg/mL in PBS (0.01 M, pH 7.3) for 2 h at 37 °C. The synthesized multivalent lactosides and lactose were used as a negative control and came from a stock solution of PBS (3.4 mmol/mL). The ligands were added in serial 2- to 10-fold dilutions (50 $\mu\text{L}/\text{well}$) in PBS and incubated at 37 °C for 1 h. Horseradish peroxidase-labeled peanut lectin (50 $\mu\text{L}/\text{well}$) of 200-fold dilution of a stock solution in PBS (1 mg/mL) was added to the microtiter plates, which were incubated for another hour at 37 °C. The plates were washed with PBS, and ABTS (1 mg, 50 $\mu\text{L}/\text{well}$) in citrate-phosphate buffer (4 mL; 0.2 M, pH 4.0 with 0.015% H_2O_2) was added. The reactions were stopped after 30 min by adding 1 M H_2SO_4 (50 $\mu\text{L}/\text{well}$) and the optical density was measured at $\lambda=410$ nm relative to 570 nm.

Turbidity assay. The ligand of interest (50 mL) of a solution in PBS (250 mM) was added to PNA lectin (50 mL) in PBS (pH 7.3, containing 0.1 mM Ca^{2+} and 0.1 mM Mn^{2+}). The time-dependent turbidity kinetics was recorded by measuring the absorption coefficient at $\lambda=410$ nm at intervals of 1 min for 12 min.

Preparation of ligand-modified AFM tips for AFM-force spectroscopy. The AFM tips were modified by using a procedure previously established by Gruber and co-workers.¹³ Briefly, the AFM tips were first washed with chloroform, dried under nitrogen, and placed for 30 min in an UV/ ozone cleaner. The tips were then washed with ethanol and dried under N_2 . The cleaned probes were incubated overnight in an ethanolamine/DMSO solution (1:2, v/v) to generate amino groups on the tip surface. After rinsing with DMSO and ethanol, the probes were incubated for 2 h in acetal/PEG/NHS (1 mg/mL; Institute of biophysics, JKU, Linz, Austria) in chloroform with 20% triethylamine. The tips were rinsed with chloroform and incubated for 15 min in 1% citrate solution to deprotect the acetal groups. The probes were covered with a PBS solution (150 mL, pH 7.4) containing the ligand (30 mL, 0.2 mg/mL) and NaCNBH_3 (4 mL, 1 M) to couple the ligand. After 50 min of incubation, a solution of ethanolamine hydrochloride in DMSO (5 mL, 1 M) was added over 10 min to block any starting material benzaldehyde groups. Finally, the probes were washed with PBS (pH 7.4) and stored in PBS until use.

AFM-force spectroscopic measurements. Force–distance curves were obtained at room temperature on a commercial Nanoscope III Multimode AFM microscope (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) with a scanner (Jscanner) of 125x125x5 mm. The ligand-modified AFM tips were mounted onto a quartz fluid cell used without the O-ring for the AFM measurements in tris-buffered saline (TBS; 25 mM 2-amino-2-hydroxymethyl-propane- 1,3-diol (Tris), 150 mM NaCl, pH 7.2 with 0.5 mM CaCl_2 and 0.5 mM MnCl_2). PNA-functionalized substrates were stuck onto steel disks with double-sided adhesive tape. The sample was immediately transferred under the AFM liquid cell

while avoiding dewetting. Adhesion force measurements were obtained in TBS (pH 7.2 with CaCl_2 and MnCl_2) by recording adhesion maps of 500x500 nm with a forward velocity of 400 nm s^{-1} and a reverse velocity of 100–600 nm s^{-1} . Data analyses were performed using Punias3D software and histograms were fitted with OriginPRO (v8.5; OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

General Methods in Homogeneous Synthesis.

Acetylation was carried out by dissolving the compound in Ac_2O -py (1:1, 10 mL/g) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature, then poured into water/ice and extracted with DCM. Organic layer was washed with 2 N H_2SO_4 and saturated aqueous solution of NaHCO_3 , then dried (MgSO_4) and concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography.

Deacetylation was carried out using Zemlen procedure.¹⁴ Addition of 1 M MeONa (0.1 equiv./Ac mol) in MeOH at room temperature, followed by neutralization with solid CO_2 , evaporation of the solvent and purification by column chromatography in some cases.

Boc cleavage was achieved by treatment with 1:1 DCM-TFA or 1:1 H_2O -TFA at rt for 2 h. Then, the solvent was eliminated under reduced pressure and coevaporated several times with water. The residue was submitted to column chromatography in most cases and the pure compound was dissolved in a HCl diluted solution and freeze-dried to yield the product as hydrochloride.

CuAAC reaction was carried out in a microwave reactor vial, alkyne, azide, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 equiv. per alkyne), and sodium ascorbate (0.2 equiv. per alkyne) in $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ were successively added. The resulting suspension was heated under

microwave irradiation at 80 °C for 30 min., water was added and the aqueous phase was extracted with EtOAc. The organic phases were combined, dried (Na₂SO₄) and concentrated under reduced pressure. Traces of copper salts were removed by filtration under silica gel eluting with CH₃CN/H₂O/NH₄OH (15/0.5/0.5) and the residue was then purified by column chromatography.

10.2. Starting Materials.

Heptakis(6-azido-6-deoxy)cyclomaltoheptaose (**146**).¹⁵

Heptakis(6-azido-6-deoxy-2,3-di-*O*-methyl)-cyclomaltoheptaose (**147**).¹⁶

Heptakis[6-(2-aminoethylthio)]cyclomaltoheptaose (**148**).¹⁷

Heptakis[6-(2-(*N'*,*N'*-bis-(2-aminoethyl)thioureido)ethylthio)-6-deoxy-2,3-di-*O*-hexanoyl]cyclomaltoheptaose heptahydrochloride (**149**).¹⁸

5,11,17,23-Tetrakis(L-Arg-amino)-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene octa-hydrochloride (**150**).¹⁹

Heptakis[6-(2-(*N'*-(2-aminoethyl)thioureido)ethylthio)-2,3-di-*O*-hexanoyl]cyclomaltoheptaose heptahydrochloride (**151**).¹³

Heptakis[6-(2-(*N'*-(2-(*N,N*-bis-(2-aminoethyl)amino)ethyl)thioureido)-ethylthio)-2,3-di-*O*-hexanoyl]cyclomaltoheptaose heptahydrochloride (**152**).¹³

Heptakis(6-bromo-6-deoxy)cyclomaltoheptaose (**153**).²⁰

Heptakis[6-(2-aminoethylthio)-2,3-di-*O*-hexanoyl]cyclomaltoheptaose heptahydrochloride (**154**).¹³

Heptakis[6-(2-isothiocyanatoethylthio)-2,3-di-*O*-hexanoyl]cyclomaltoheptaose heptahydrochloride (**155**).¹³

2-[Bis[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl]amino]ethyl isothiocyanate (**156**).¹³

Bis-[2-(*N-tert*-butoxycarbonylamino)ethyl]amine (**157**).¹³

5,11,17,23-Tetraamino-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (**158**).²¹

2-aminoethyl-bis[2-(*tert*butoxycarbonylamino)ethyl]amine (**159**).²²

Heptakis[6-azido-6-deoxy-2,3-di-*O*-hexanoyl]cyclomaltoheptaose (**160**).²³

25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (**169**).²⁴

25,26,27,28-tetrakis(*n*-docecyloxy)calix[4]arene (**170**).²⁵

6^I-[2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)ethylthio]cyclomaltoheptaose (**171**).²⁶

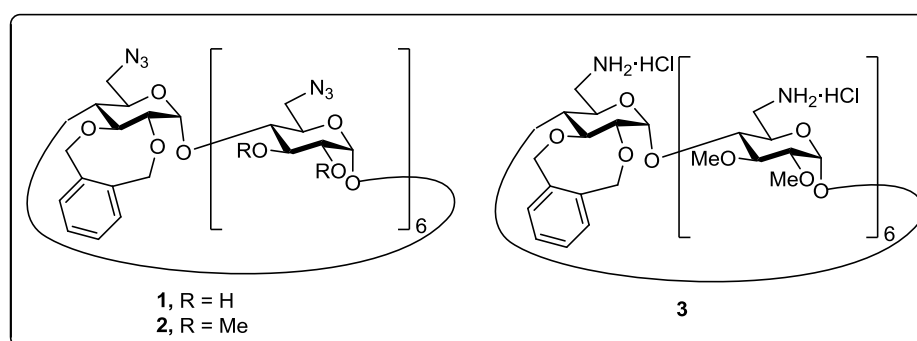
2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl isothiocyanate (**172**).²⁷

6^{II-VII}-Hexa-*O*-methyl-6^I-*p*-toluensulfonyl-heptakis-(2,3-di-*O*-methyl)-cyclomaltoheptaose (**173**).²⁸

- □-Amino-□-azidotetra(ethyleneglycol) (**174**).²⁹
- 1,6-Hexamethylenediisothiocyanate.³⁰
- 1-Isothiocyanatoadamantane.³¹

11.3. New products.

Preparation of self-assembling polycationic cyclodextrins: incorporation of *o*-xylylene group at the secondary face.



Heptakis[6-azido-6-deoxy]-2^I,3^I-*O*-(*o*-xylylene)cyclomaltoheptaose (1**).** To a solution of heptakis(6-azido-6-deoxy)cyclomaltoheptaose (**146**, 0.6 g, 0.46 mmol) in DMSO (24 mL) LDA (2 M in THF/*n*-heptane, 0.26 mL, 0.46 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 16 h at rt and then, a solution of 1,2-dibromomethylbenzene (135 mg, 1 eq, 0.46 mmol) in DMSO (4 mL) was dropwise added.

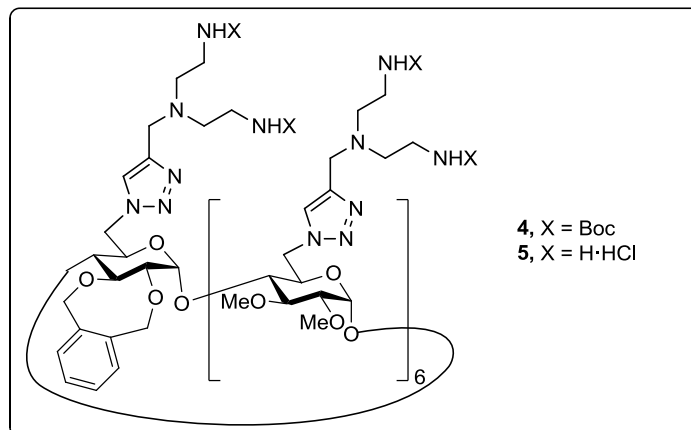
The reaction mixture was stirred for 6 h at rt, concentrated and purified by column chromatography (30:2:1 → 10:1:1 MeCN-H₂O-NH₄OH). Yield: 156 mg (24%). *R_f* 0.39 (10:1:1 MeCN-H₂O-NH₄OH); [α]_D = +75.9 (*c* 1.0, DMSO); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 313 K): δ 7.32-7.16 (m, 4 H, Ar), 5.90-5.60 (m, 12 H, OH-2, OH-3), 5.18 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 3.8 Hz, H-1^I), 5.14 (2d, 2 H, ²*J*_{H,H} = 14.4 Hz, CHAr), 4.96 (d, 1 H, CHAr), 4.94-4.88 (m, 7 H, CHAr, H-1^{II-VII}), 3.83 (da, 1 H, *J*_{6a,6b} = 12.8 Hz, H-6a^I), 3.81-3.70 (m, 14 H, H-5^I, H-3^I, H-5^{II-VII}, H-6a^{II-VII}), 3.69-3.51 (m, 15 H, H-6b^{I-VII}, H-2^I, H-4^I, H-3^{II-VII}), 3.45-3.30 (m, 12 H, H-2^{II-VII}, H-4^{II-VII}); 1D TOCSY (irradiation at H-1^I): δ 5.18 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 3.8 Hz, H-1^I), 3.84 (bd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 12.8 Hz, H-6a^I), 3.78 (m, 1 H, H-3^I), 3.76 (m, 1 H, H-5^I), 3.64 (m, 1 H, H-2^I), 3.62 (m, 1 H, H-6b^I), 3.55 (t, 1 H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9.5 Hz, H-4^I); ¹³C NMR (125.7 MHz, DMSO-*d*₆, 313 K): δ 136.9-128.3 (Ar), 102.6-102.3 (C-1^{II-VII}), 100.7 (C-1^I), 84.2-83.5 (C-4^{II-VII}), 81.3 (C-4^I), 80.6 (C-3^I), 80.3 (C-2^I), 73.6-71.1 (CH₂Ar, C-2^{II-VII}, C-3^{II-VII}), 70.8-70.4 (C-5^{II-VII}), 51.8 (C-6^{II-VII}); ESI-MS: *m/z* 1434.4 [M + Na]⁺, 1450.4 [M + K]⁺. Anal. Calcd for C₅₀H₆₉N₂₁O₂₈: C 42.52, H 4.92, N 20.83. Found: C 42.67, H 5.22, N 20.65.

Heptakis[6-azido-6-deoxy]-2^{II-VII},3^{II-VII}-dodeca-O-methyl-2^I,3^I-O-(o-xylylene)cyclomaltoheptaose (2). To a solution of **1** (0.5 g, 0.38 mmol) in DMF (19 mL), NaH (60%, 0.92 g, 23 mmol, 5 eq) and MeI (1.43 mL, 23 mmol, 5 eq) were added at 0 °C, under Ar atmosphere. The reaction mixture was stirred for 12 h at rt, quenched with H₂O (35 mL) and extracted with DCM (4 x 25 mL). The organic layer was dried (Na₂SO₄), concentrated and purified by column chromatography (50:1 → 15:1 DCM-MeOH). Yield: 0.48 g (76%). *R_f* 0.59 (15:1 DCM-MeOH); [α]_D = +114.5 (*c* 0.4, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, 313 K): δ 7.31-7.10 (m, 4 H, Ar), 5.32 (d, 1 H, ²*J*_{H,H} = 12.7 Hz, CHAr), 5.27 (m, 2 H, H-1^{II}, H-1^{III}), 5.21-5.15 (m, 7 H, 2 CHAr, H-1^I, H-1^{IV-VII}), 4.79 (d, 1 H, CHAr), 3.92-3.76 (m, 14 H, H-5^{I-VII}, H-6a^{I-VII}), 3.76, 3.68 (2 s, 6 H, 2 OMe), 3.66-3.45 (m, 54 H, H-6b^{I-VII}, H-3^{I-VII}, H-4^{II-VII}, 10 OMe), 3.37 (t, 1 H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9.1 Hz, H-4^I), 3.31-3.20 (m, 6 H, H-2^{II-VII}), 3.16 (dd, 1 H, *J*_{1,2} = 3.6 Hz, *J*_{2,3} = 9.1 Hz, H-2^I); ¹H TOCSY

(irradiation at H-2^I): δ 5.21 (d, 1 H, H-1^I), 3.81-3.77 (m, 2 H, H-6a^I, H-5^I), 3.65 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 13.3$ Hz, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, H-6b^I), 3.57 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1$ Hz, H-3^I), 3.37 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.1$ Hz, H-4^I), 3.16 (dd, 1 H, H-2^I); ¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD, 313 K): δ 137.8-126.8 (Ar), 99.0- 98.0 (C-1^{II-VII}), 97.9 (C-1^I), 81.44 (C-2^I), 81.4 (C-4^I), 81.8-79.5 (C-2^{II-VII}, C-4^{II-VII}, C-3^{II-VII}), 78.6 (C-3^I), 75.4 (CH₂Ar), 72.2 (CH₂Ar), 71.1-70.8 (C-5^{I-VII}), 60.6-60.3, 58.0-57.5 (OMe), 51.8-51.7 (C-6^{I-VII}); ESI-MS: m/z 1602.6 [M + Na]⁺, 1618.4 [M + K]⁺. Anal. Calcd for C₆₂H₉₃N₂₁O₂₈: C 47.11, H 5.93, N 18.61. Found: C 47.45, H 6.26, N 18.29.

Heptakis[6-amino-6-deoxy]-2^{II-VII},3^{II-VII}-dodeca-O-methyl-2^I,3^I-O-(*o*-xylylene)cyclomaltoheptaose heptahydrochloride (3). To a solution of **2** (50 mg, 30 μ mol) in MeOH (2.5 mL), PPh₃ (61.0 mg, 0.23 mmol, 1.1 eq) and aq. NH₃ (30%, 0.25 mL) were added. After stirring for 6 h at rt, the solvent was eliminated, the residue taken in water (3 mL) and the pH was adjusted to 5 (0.1 M HCl). The aqueous solution was washed with DCM (3 x 5 mL), and the aqueous layer freeze-dried. Yield: 50 mg (96%). [α]_D = +84.3 (*c* 0.4, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, D₂O, 313 K): δ 7.28-7.14 (m, 4 H, Ar), 5.38 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1^{II}), 5.32-5.24 (m, 6 H, H-1^{IV-VII}, 2 CHAr), 5.22 (d, 1 H, H-1^I), 5.13-5.07 (m, 2 H, H-1^{III}, CHAr), 4.88 (d, 1 H, $^2J_{H,H} = 13.9$ Hz, 2 CHAr), 4.21-4.05 (m, 7 H, H-5^{I-VII}), 3.93 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$ Hz, H-3^I), 3.74 (t, 1 H, H-3^{II}), 3.71-3.52 (m, 28 H, H-6a^{III-VII}, H-3^{III-VII}, H-2^I, H-4^{I,II}, 5 OMe), 3.52-3.39 (m, 23 H, H-6b^{III-VII}, H-6a^{I,II}, H-2^{II}, 5 OMe), 3.39-3.19 (m, 18 H, H-2^{III-VII}, H-4^{III-VII}, H-6b^{I,II}, 2 OMe); 1D TOCSY (irradiation at H-1^I): δ 5.22 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, H-1^I), 3.93 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$ Hz, H-3^I), 3.65 (m, 2 H, H-2^I, H-4^I), 3.50 (da, 1 H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, H-6a^I), 3.27 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.5$ Hz, H-6b^I); 1D TOCSY (irradiation at H-3^{II}): δ 5.38 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.3$ Hz, H-1^{II}), 4.14 (m, 1 H, H-5^{II}), 3.74 (m, 1 H, H-3^{II}), 3.68 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.2$ Hz, H-4^{II}), 3.48 (bd, 1 H, $J_{6a,6b} = 12.9$ Hz, H-6a^{II}), 3.42 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, H-2^{II}), 3.30 (da, 1 H, H-6b^{II}); ¹³C NMR (125.7 MHz, D₂O, 313 K): δ 136.5-128.1 (Ar), 99.1 (C-1^I), 98.2-97.9 (5 C, C-1^{II-VII}), 80.7 (C-3^I), 80.2-78.2 (C-3^{II-VII}, C-2^{I-VII}, C-4^{I-VII}), 74.1, 75.6 (2 C, CH₂Ar), 68.2-

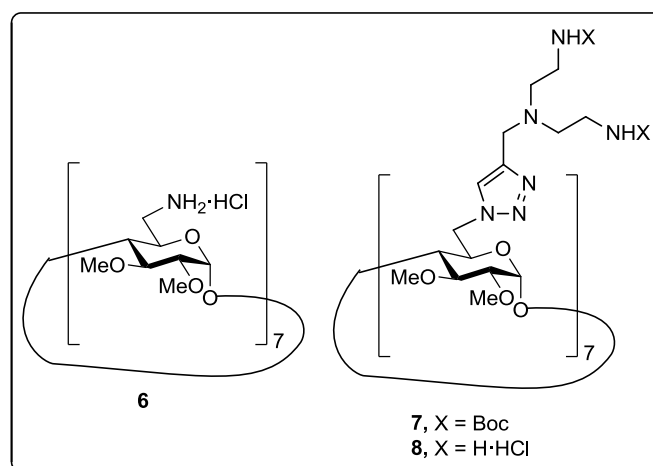
68.5 (C-5^{I-VII}), 60.2-60.1, 58.5-58.3 (OMe), 40.3 (C-6^{I-VII}); ESI-MS: m/z 1398.7 [M + H]⁺, 699.9 [M + 2 H]²⁺. Anal. Calcd for C₆₂H₁₀₇N₇O₂₈·7 HCl: C 45.03, H 6.95, N 5.93. Found: C 44.89, H 7.07, N 5.70.



Heptakis[6-(4-(2,2-bis-*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)aminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl-6-deoxy-2^{I-VII},3^{I-VII}-dodeca-*O*-methyl]-2^I,3^I-*O*-(*o*-xylylene)cyclomaltoheptaose (4). To a solution of **2** (50 mg, 32 μ mol) and 3-bis[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl]-aminopropine³² (83 mg, 0.25 mmol, 1.1 eq) in DMF (2 mL), the Cu(I)-supported catalyst³³ Si-BPA·Cu⁺ (7.3 mg) was added and the reaction mixture was stirred at 120 °C for 2 h, the solvent was removed and the residue was purified by column chromatography (40:1 \rightarrow 9:1 DCM-MeOH). Yield: 91.6 mg (93%). R_f 0.50 (9:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_D = +17.5$ (c 0.8, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, 313 K): δ 8.05-7.08 (m, 7 H, =CH triazole), 7.32-7.08 (m, 4 H, Ar), 5.66-5.42 (m, 7 H, H-1^{I-VII}), 5.29-5.14 (m, 3 H, 3 CHAr), 4.89-4.63 (m, 14 H, H6a^{I-VII}, H6b^{I-VII}), 4.43-4.21 (m, 8 H, H-5^{I-VII}, CHAr), 3.95-3.38 (m, 71 H, H-2^{I-VII}, H-3^{I-VII}, H-4^{I-VII}, OMe, =CCH₂N), 3.23-2.95 (m, 28 H, CH₂NHBoc), 2.75-2.45 (m, 28 H, CH₂CH₂NHBoc), 1.55-1.37 (m, 63 H, CMe₃). ¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD, 313 K): δ 156.9 (CO), 144.3 (C-4 triazole), 126.3 (C-5 triazole, Ar), 98.5 (C-1^{I-VII}), 82.1-81.3 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}, C-4^{I-VII}, C_q), 78.7 (CMe₃), 71.3-

69.8 (C-5^{I-VII}, CHAr), 60.8-58.2 (OMe), 53.3 (CH₂CH₂NHBoc), 50.7 (C-6^{I-VII}), 48.1 (=CCH₂N), 38.1 (CH₂CH₂NH₂), 27.5 (CMe₃). ESI-MS: *m/z* 3992.7 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₈₁H₃₁₀N₄₂O₅₆: C 54.75, H 7.87, N 14.82. Found: C 54.91, H 7.56, N 14.49.

Heptakis[6-(4-(2,2-bis-aminoethyl)aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl-6-deoxy)-2^{II-VII},3^{II-VII}-dodeca-*O*-methyl-2^I,3^I-*O*-(*o*-xylylene)-cyclomaltoheptaose tetradecahydrochloride (5). Treatment of **4** (31 mg, 8 μmol) with a mixture of TFA-DCM (1:1, 0.8 mL) for 3 h at rt, followed by removal of the solvent and lyophilization from a solution of 0.1 M HCl, gave **2** in 99% yield (24 mg). [α]_D = +2.7 (*c* 0.7, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, 313 K): δ 8.51-8.48 (m, 7H, =CH), 7.86-7.54 (m, 4 H, Ar), 5.87-5.73 (m, 7 H, H-1^{I-VII}), 5.56-5.44 (m, 3H, 3 CHAr), 5.25-5.05 (m, 16 H, H6a^{I-VII}, H6b^{I-VII}, CHAr), 4.36-4.27 (m, 7 H, H-5^{I-VII}), 4.14-3.64 (m, 71 H, H-2^{I-VII}, H-3^{I-VII}, H-4^{I-VII}, OMe, =C-CH₂-N), 3.63-3.48 (m, 28 H, CH₂NH₂), 3.32-3.13 (m, 28 H, CH₂CH₂NH₂); ¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD, 313 K): δ 141.1 (C-4 triazole), 128.1 (C-5 triazole, Ar), 97.6 (C-1^{I-VII}), 80.6-79.9 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}, C-4^{I-VII}, C_q), 70.1 (C-5^{I-VII}, CHAr), 69.8 (=CCH₂N), 50.3-49.9 (CH₂CH₂NH₂, OMe), 46.1-45.9 (C-6^{I-VII}), 37.1 (CH₂NH₂); ESI-MS: *m/z* 1024.7 [M + 3 H]³⁺, 1536.6 [M + 2 H]²⁺. Anal. Calcd for C₁₁₁H₁₉₈N₄₂O₂₈·14 HCl: C 43.29, H 6.94, N 19.10. Found: C 43.38, H 6.69, N 18.96.



Heptakis[6-amino-6-deoxy-2,3-di-*O*-methyl]cyclomaltoheptaose (6).

To a solution of **147** (89 mg, 59 μmol) in MeOH (4.5 mL), PPh_3 (119.3 mg, 0.46 mmol) was added. The solution was stirred for 2 h and then 30% NH_4OH (0.44 mL) was added. The solvents were removed and 0.1 M HCl was added. It was extracted with DCM (3 x 5 mL) and the organic layer was freeze-dried to obtain **6** as heptahydrochloride. Yield: 78 mg (99%); $[\alpha]_{\text{D}} = +104.3$ (c 0.8, MeOH). ^1H RMN (500 MHz, D_2O): δ 5.31 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, H-1), 5.18-4.12 (m, 7 H, H-5), 3.73-3.64 (m, 14 H, H-3, H-4), 3.61-3.54 (sa, 21 H, OCH_3), 3.51-3.44 (m, 28 H, OCH_3 , H-6a), 3.37 (dd, 7 H, $J_{2,3} = 9.4$ Hz, H-2), 3.29 (dd, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.5$ Hz, $J_{6b,5} = 6.7$ Hz, H-2). ^{13}C RMN (125.7 MHz, D_2O): δ 98.1 (C-1), 80.0, 79.6, 79.5 (C-2, C-3, C-4), 68.1 (C-5), 60.2 (7 C, CH_3), 58.4 (7 C, CH_3), 40.2 (C-6). EM (ESI): m/z 1598.5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1614.5 $[\text{M} + \text{K}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{56}\text{H}_{112}\text{Cl}_7\text{N}_7\text{O}_{28}$: C 42.58, H 7.15, N 6.21. Found: C 42.63, H 6.97, N 6.10.

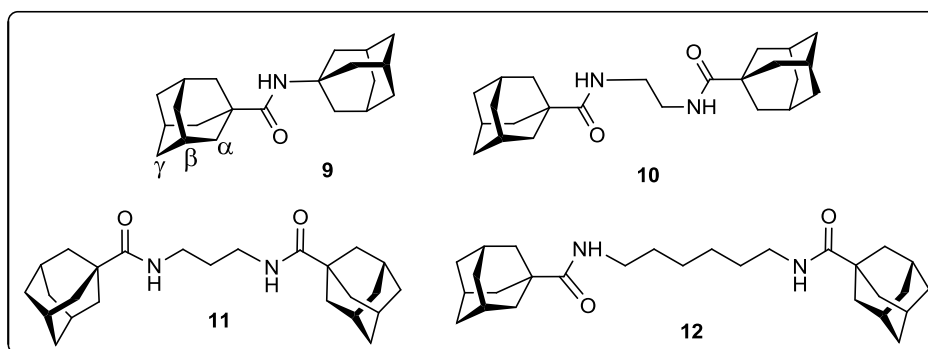
Heptakis[6-(4-(2,2-bis-*tert*-butoxycarbonylamino)ethylaminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy-2,3-di-*O*-methyl]cyclomaltoheptaose (7). To a solution of **147** (50 mg, 33 μmol) and 3-bis[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl]aminopropine (89 mg, 0.26 mmol, 1.1 eq) in $t\text{BuOH-H}_2\text{O}$ 2:1 (3 mL) the Cu(I)-supported catalyst $\text{Si-BPA}\cdot\text{Cu}^+$ (8 mg) was added and the reaction mixture was refluxed overnight, the solvent was removed and the residue was purified by column chromatography (30:1 \rightarrow 9:1 DCM-MeOH). Yield: 122 mg (95%). R_f 0.59 (9:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_{\text{D}} = +21.5$ (c 0.9, DCM); ^1H NMR (500 MHz, 333 K, CD_3OD): δ 7.94 (s, 7 H, =CH), 5.52 (s, 7 H, H-1), 4.77 (s, 14 H, H-6), 4.35 (s, 7 H, H-5), 3.80 (s, 14 H, CH_2 -triazole), 3.64 (s, 28 H, H-3, OMe), 3.51 (s, 21 H, OMe), 3.35 (m, 7 H, H-4), 3.13 (t, 35 H, H-2, CH_2NHBoc), 2.59 (s, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 1.46 (s, 126 H, CMe_3); ^{13}C NMR (125.7 MHz, 313 K, CD_3OD): δ 159.2 (CO), 146.3 (C-4 triazole), 128.6 (C-5 triazole), 100.2 (C-1), 83.7 (C-2, C-3), 82.3 (C-4), 80.9 (CMe_3), 72.2 (C-5), 62.8, 60.1 (OMe), 55.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 52.8 (C-6), 50.0 (CH_2), 40.5 (CH_2NHBoc), 29.9 (CMe_3); ESI-MS: m/z 1299.1 $[\text{M} + 3 \text{H}]^{3+}$, 1949.1

$[M + 2 H]^{2+}$. Anal. Calcd for $C_{175}H_{308}N_{42}O_{56}$: C 53.94, H 7.97, N 15.10. Found C 53.61, H 7.71, N 14.89.

Heptakis[6-4-(2,2-bis-aminoethyl)aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl-6-deoxy]-2,3-di-*O*-methyl]cyclomaltoheptaose tetradecahydrochloride (8). Treatment of **7** (107 mg, 27 μ mol) with TFA-DCM (1:1, 2.5 mL) for 2 h at rt, followed and evaporation of the solvent and lyophilization from a solution in 0.1 M HCl. Yield: 80 mg (99%). $[\alpha]_D = +20.9$ (*c* 0.9, H_2O); 1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 8.14 (s, 7 H, =CH), 5.46 (s, 7 H, H-1), 4.96 (d, 7 H, $J_{6a,6b} = 13.4$ Hz, H-6a), 4.75 (s, 7 H, H-6b), 4.31 (m, 7 H, H-5), 4.10 (m, 14 H, CH_2), 3.71 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.7$ Hz, H-3), 3.53 (s, 21 H, OMe), 3.45 (m, 7 H, H-4), 3.37 (s, 21 H, OMe), 3.22 (t, 28 H, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, CH_2NH_2), 3.05 (d, 7 H, H-2), 2.98 (t, 28 H, $CH_2CH_2NH_2$); ^{13}C NMR (125.7 MHz, D_2O): δ 139.3 (C-4 triazole), 128.4 (C-5 triazole), 97.3 (C-1), 81.5-78.5 (C-2, C-3, C-4, C_q), 69.7 (C-5), 60.6, 58.2 (OMe), 50.5 (C-6), 49.7 ($CH_2CH_2NH_2$), 46.01 (CH_2), 35.6 (CH_2NH_2); ESI-MS: m/z 832.5 $[M + 3 H]^{3+}$, 1248.3 $[M + 2 H]^{2+}$. Anal. Calcd for $C_{105}H_{196}N_{42}O_{28} \cdot 14 HCl$: C 41.96, H 7.04, N 19.57. Found C 41.64, H 6.77, N 19.31.

Multicomponent supramolecular systems for gene transport.

Preparation of bis-adamantane connectors



***N*-(1-Adamantanyl)adamantane-1-carboxamide (9).** To a solution of 1-adamantanecarbonyl chloride (75 mg, 0.38 mmol) in DCM (3 mL), a solution of 1-

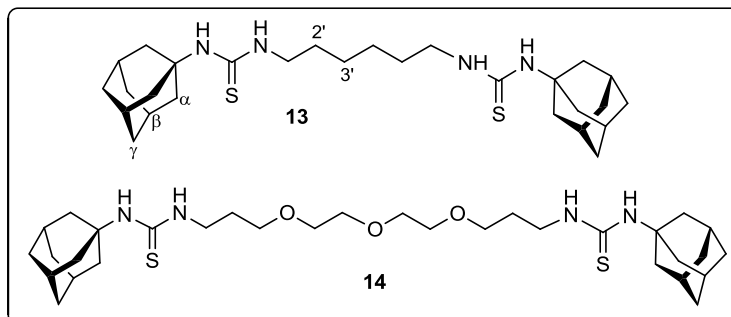
aminoadamantane hydrochloride (71 mg, 0.38 mmol) and DIPEA (0.17 mL, 0.94 mmol, 2.5 eq) in DCM (3 mL) was added. The mixture was stirred at rt for 2.5 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was suspended in H₂O (10 mL), stirring the mixture vigorously for 16 h. Then, DCM (10 mL) was added and the organic layer was washed with 2 M H₂SO₄ (5 mL) and aqueous NaHCO₃ (5 mL), dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated. Yield: 104 mg (87%). *R_f* = 0.77 (1:5 EtOAc-petroleum ether). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ = 5.24 (bs, 1 H, NH), 2.09 (sa, 3 H, βH'), 2.05 (bs, 3 H, βH), 2.00 (da, 6 H, ³J_{H,H} = 3 Hz, αH'), 1.83 (da, 12 H, ³J_{H,H} = 3 Hz, αH), 1.75 (dd, 3 H, ¹J_{H,H} = 12.5 Hz, γHa), 1.70 (m, 9 H, γHb, γH'). ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 298 K): δ = 177.3 (CO), 51.2 (Cq'), 41.7 (αC'), 40.9 (Cq), 39.4 (αC), 36.6 (γC), 36.4 (γC'), 29.5 (βC'), 28.3 (βC). EM (ESI): *m/z* 336.2 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₃₁NO: C, 80.46; H, 9.97; N, 4.47. Found: C, 80.50; H, 9.65; N, 4.39.

***N,N'*-Bis(1-adamantanecarbonyl)ethylenediamine (10)**. To a solution of 1-adamantanecarbonyl chloride (100 mg, 0.5 mmol) in DCM (4 mL), a solution of ethylenediamine (15.3 μL, 0.24 mmol) and DIPEA (101.5 μL, 0.57 mmol, 1.25) in DCM (3 mL) was added. The mixture was stirred at rt for 2.5 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was suspended in H₂O (10 mL), stirring the mixture vigorously for 16 h. Then, DCM (10 mL) was added and the organic layer was washed with 2 M H₂SO₄ (5 mL) and aqueous NaHCO₃ (5 mL), dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated. Yield: 88 mg (99%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ = 6.40 (bs, 2 H, NH), 3.41 (d, 4 H, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, CH₂N), 2.07 (bs, 6 H, βH), 1.86 (bd, ³J_{H,H} = 2.6 Hz, 12 H, αH), 1.76 (bdd, 6 H, *J*_{H,H} = 15 Hz, γHa), 1.71 (dd, 6 H, ³J_{H,H} = 5 Hz, γHb). ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 298 K): δ = 179.5 (CO), 40.6 (CqAd), 40.3 (CH₂N), 39.2 (αC), 36.5 (γC), 28.1 (βC). EM (ESI): *m/z* 407.3 [M + Na]⁺, 419.2 [M + Cl]⁻. Anal. Calcd for C₂₄H₃₆N₂O₂: C, 74.96; H, 9.44; N, 7.28. Found: C, 74.88; H, 9.34; N, 7.17.

***N,N'*-Bis(1-adamantanecarbonyl)-1,3-propylenediamine (11)**. To a solution of 1-adamantanecarbonyl chloride (100 mg, 0.5 mmol) in DCM (4 mL), a solution of 1,3-propylenediamine (19.3 μ L, 0.24 mmol) and DIPEA (101.5 μ L, 0.57 mmol) in DCM (4 mL) was added. The mixture was stirred at rt for 2.5 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was suspended in water (10 mL), stirring the mixture vigorously for 16 h. Then, DCM (10 mL) was added and the organic layer was washed with 2 M H₂SO₄ (5 mL) and aqueous NaHCO₃ (5 mL), dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated. Yield: 88 mg (96%). *R*_f = 0.73 (1:5 EtOAc-petroleum ether). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ = 6.32 (bt, 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, β H), 1.90 (bd, 12 H, ³*J*_{H,H} = 2.5 Hz, α H), 1.75 (m, 12 H, γ Ha, γ Hb), 1.60 (t, 2 H, ³*J*_{H,H} = 5.9 Hz, CH₂CH₂N). ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 298 K): δ = 178.8 (CO), 40.7 (CqAd), 39.3 (α C), 36.6 (γ C), 35.1 (CH₂N), 30.1 (CH₂CH₂N), 28.2 (β C). EM (ESI): *m/z* 399.1 [M + H]⁺, 421.3 [M + Na]⁺, 437.2 [M + K]⁺. *Anal.* Calcd for C₂₅H₃₈N₂O₂: C, 75.33; H, 9.61; N, 7.03. Found: C, 75.21, H, 9.43; N, 6.89.

***N,N'*-Bis(1-adamantanecarbonyl)-1,6-hexylenediamine (12)**. To a solution of 1-adamantanecarbonyl chloride (50 mg, 0.25 mmol) in DCM (2 mL), a solution of 1,6-hexylenediamine (13.3 mg, 0.11 mmol) and DIPEA (51 μ L, 0.29 mmol) in dry DCM (2 mL) was added. The mixture was stirred at rt for 2.5 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was suspended in water (10 mL), stirring the mixture vigorously for 16 h. Then, DCM (10 mL) was added and the organic layer was washed with 2 M H₂SO₄ (5 mL) and aqueous NaHCO₃ (5 mL), dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated. Yield: 49 mg (97%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ = 5.71 (t, 2 H, ³*J*_{H,H} = 4.8 Hz, NH), 3.25 (m, 4 H, ³*J*_{H,H} = 6.3 Hz, CH₂N), 2.07 (bs, 6 H, β H), 1.90 (d, 12 H, ³*J*_{H,H} = 2.0 Hz, α H), 1.74 (m, 12 H, γ Ha, γ Hb), 1.51 (m, 4 H, ³*J*_{H,H} = 6.6 Hz, CH₂CH₂N), 1.35 (m, 4 H, ³*J*_{H,H} = 3.5 Hz, CH₂CH₂CH₂N). ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 298 K): δ = 178.0 (CO), 40.6 (CqAd), 39.3 (α C), 38.8 (CH₂N), 36.6 (γ C), 29.6 (CH₂CH₂N), 28.2 (β C), 26.0 (CH₂CH₂CH₂N). MS (ESI): *m/z* 903.5 [2 M + Na]⁺, 475.3

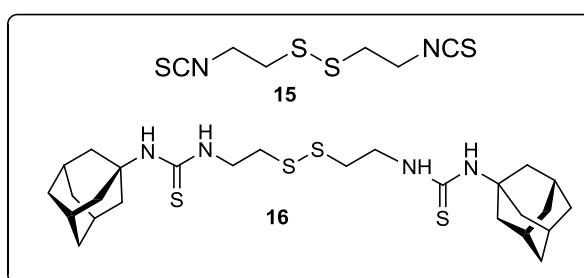
$[M + Cl]^-$, 463.3 $[M + Na]^+$, 439.3 $[M - H]^-$. Anal. Calcd for $C_{28}H_{44}N_2O_2$: C, 76.32; H, 10.06; N, 6.36. Found: C, 76.44, H, 10.12; N, 6.27.



***N',N'*-(hexane-1,6-diyl)-bis-(adamantan-1-yl)thiourea (13).** To a solution of 1-aminoadamantane (151 mg, 0.81 mmol) and DIPEA (276 μ L, 1.61 mmol) in DCM (3 mL) was added dropwise a solution of 1,6-diisothiocyanto-hexane (50 mg, 0.27 mmol) in DCM (3 mL). The mixture was stirred overnight at rt, under Ar atmosphere. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by column chromatography (1:5 \rightarrow 1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 51 mg (38%); R_f = 0.35 (1:2 EtAcO-cyclohexane). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5.78 (bs, 2 H, NH), 5.68 (bs, 2 H, NH), 3.61-3.54 (m, 4 H, CH_2NH), 2.18-2.12 (m, 6 H, βH), 2.08-2.02 (m, 12 H, αH), 1.76-1.61 (m, 16 H, CH_2-2' , γH), 1.46-1.41 (m, 4 H, CH_2-3'). ^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ 180.3 (CS), 53.2 (Cq), 44.3 (CH_2NH), 41.7 (αC), 35.3 (γC), 28.7 (βC), 28.2 (CH_2-2'), 25.4 (CH_2-3'). ESI-MS: m/z 537.2 $[M + Cl]^-$, 501.2 $[M - H]^-$. Anal. calcd for $C_{28}H_{46}N_4S_2$: C 66.88, H 9.22, N 11.14, S 12.75. Found: C 66.81, H 9.27, N 11.18, S 12.71.

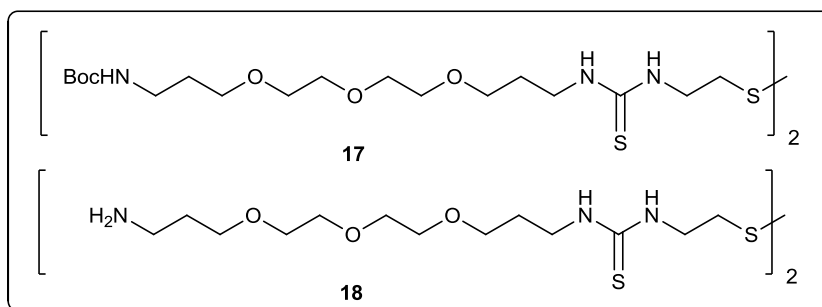
***N',N'*-(4,7,10-trioxatridecane-1,13-diyl)-bis-(adamantan-1-yl)thiourea (14).** To a solution of 1-isothiocyanoadamantane (114.5 mg, 0.59 mmol) in dry DCM (4 mL) was added dropwise a solution of 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (55.9 mg, 0.25 mmol) and DIPEA (107 μ L, 0.63 mmol) in dry DCM (2 mL). The mixture was stirred

overnight at rt, under Ar atmosphere. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by column chromatography (1:2 → 2:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 145 mg (96%); $R_f = 0.28$ (2:1 EtOAc-cyclohexane). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6.41 (bs, 2 H, NH), 5.94 (bs, 2 H, NH), 3.74-3.65 (m, 4 H, CH_2NH), 3.65-3.57 (m, 12 H, CH_2O), 2.16-2.07 (m, 6 H, βH), 2.06-1.98 (m, 12 H, αH), 1.94-1.83 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.73-1.64 (m, 12 H, γH). $^{13}\text{C NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3) δ 180.6 (CS), 70.4, 70.2 (CH_2O , CH_2N), 53.9 (Cq), 42.2 (αC), 36.2 (γC), 29.6 (βC), 28.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$). ESI-MS: m/z 607.4 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 629.3 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$: C 63.33, H 8.97, N 9.23, O 7.91, S 10.57. Found: C 63.39, H 9.07, N 9.22, S 10.38.



2,2'-Bis-(2-isothiocyanatoethyl) disulfide (15). To a solution of cystamine hydrochloride (1 g, 4.44 mmol) and CaCO_3 (5.4 g, 53.34 mmol) in a mixture of H_2O -DCM (1:1, 60 mL), CSCl_2 (2.04 mL, 26.66 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 7 h at rt. DCM was added and the mixture was washed with water. The organic layer was dried (MgSO_4), filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (1:9 → 1:6 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.00 g (96%); $R_f = 0.44$ (1:4 EtOAc-cyclohexane). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 3.86 (t, $J = 6.5$ Hz, 2 H, CH_2NCS), 3.86 (t, 2 H, CH_2S). $^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ 133.8 (SCN), 44.6 (CH_2NCS), 38.8 (CH_2S). ESI-MS: m/z 237 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$. Anal. calcd for $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_4$: C 30.48, H 3.41, N 11.85, S 54.26. Found: C 30.11, H 3.26, N 11.49, S 53.91.

2,2'-Bis-(2-(*N*-(adamantan-1-yl)thiourea)ethyl)disulfide (16). To a solution of 1-isothiocyanatoadamantane (100 mg, 0.52 mmol) in DCM (1 mL), a solution of cystamine hydrochloride (39 mg, 0.17 mmol) and Et₃N (144 μL, 1.03 mmol) in a 2:1 mixture of DCM-H₂O (0.9 mL) was added. The mixture was stirred overnight at rt, under Ar atmosphere. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by column chromatography (1:8 EtOAc-cyclohexane → EtOAc). Yield: 92 mg (99%); *R_f* = 0.40 (1:2 EtOAc-cyclohexane). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.24 (bs, 2 H, NH), 6.06 (bs, 2 H, NH), 3.98 (q, *J* = 5.8 Hz, 4 H, CH₂NH), 3.00 (t, *J* = 6.06 Hz, 4 H, CH₂S), 2.19 – 2.09 (m, 6 H, βH), 2.08-1.95 (m, 12 H, αH), 1.76-1.62 (m, 12 H, γH). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 181.1 (CS), 54.3 (Cq), 43.8 (CH₂NH), 42.6 (αC), 37.8 (CH₂S), 36.2 (γC), 29.5 (βC). ESI-MS: *m/z* 269.1 [M + 2H]⁺. Anal. calcd for C₂₆H₄₂N₄S₄: C 57.95, H 7.86, N 10.40, S 23.80. Found: C 58.05, H 7.77, N 10.49, S 23.69.

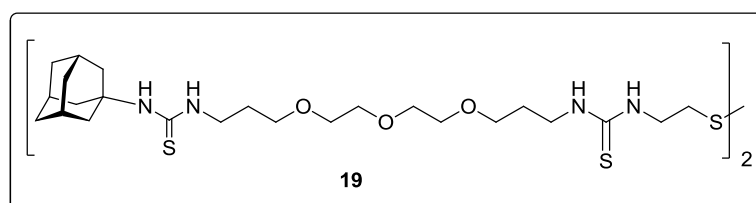


2,2'-Bis-(2-(*N*-(13-*tert*-butoxycarbonylamino-4,7,10-trioxatridecane-1-yl)thiourea)ethyl) disulfide (17). To a solution of *N*-*tert*-butoxycarbonyl-4,7,10-trioxatridecane-1,13-tridecanediamine (149 mg, 0.47 mmol) and Et₃N (194 μL, 1.39 mmol) in dry DCM (2 mL) was added dropwise a solution of **15** (45.6 mg, 0.19 mmol) in dry DCM (1 mL). The mixture was stirred overnight at rt, under Ar atmosphere. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by column chromatography (20:1 → 9:1 DCM-MeOH). Yield: 164 mg (97%); *R_f* = 0.56 (9:1 DCM-MeOH). ¹H NMR (500 MHz, 313 K, CDCl₃) δ 6.97-6.78 (m, 4 H, NHCS), 4.93 (bs, 2 H, *NHBoc*), 3.92 (q, *J* = 6.2 Hz,

4 H, CH₂CH₂S), 3.71- 3.66 (m, 8 H, CH₂NHCS), 3.65-3.59 (m, 16 H, CH₂O), 3.56 (t, *J* = 6.2 Hz, 4 H, OCH₂CH₂CH₂NHBoc), 3.23 (q, *J* = 6.2 Hz, 4 H, CH₂NHBoc), 2.99 (t, 4 H, CH₂CH₂S), 1.88 (m, *J* = 5.7 Hz, 4 H, CH₂CH₂CH₂NHCS), 2.05 (m, *J* = 6.4 Hz, 4 H, CH₂CH₂CH₂NHBoc), 1.48 (bs, 18 H, CMe₃). ¹³C NMR (125.7 MHz, 313 K, CDCl₃) δ 182.1 (CS), 156.1 (CO), 80.1 (C(CH₃)₃), 70.4 (CH₂NHCS), 70.0 (OCH₂CH₂CH₂NHCS), 69.7, 69.3 (OCH₂), 43.4 (CH₂CH₂S), 38.4 (CH₂NHBoc), 38.1 (CH₂CH₂S), 29.8 (CH₂CH₂CH₂NHBoc), 28.6 (CMe₃), 28.5 (CH₂CH₂CH₂NHCS). ESI-MS: *m/z* 438.1 [M + 2H]⁺, 911.1 [M + Cl]⁻. Anal. calcd for C₃₄H₆₈N₆O₉S₄: C 49.01, H 8.23, N 10.09, S 15.39. Found: C 49.20, H 8.32, N 9.37, S 14.46.

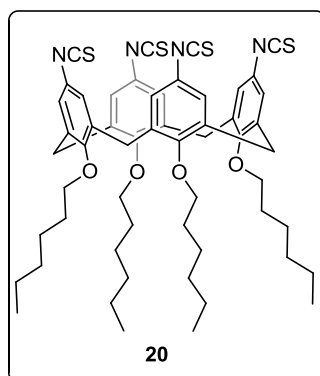
2,2'-Bis-(2-(N-(13-amino-4,7,10-trioxatridecane-1-yl)thiourea)ethyl) disulfide (18).

Treatment of **17** (77 mg, 0.09 mmol) with 1:1 TFA-DCM (0.8 mL) for 1 h at rt and further removal of solvents under reduced pressure afforded **18**. Yield: 60 mg (99%). ¹H NMR (500 MHz, 313 K, CDCl₃) δ 7.85- 7.57 (m, 4 H, NH₂), 7.09-6.74 (m, 4 H, NHCS), 3.88 (t, *J* = 6.4 Hz, 4 H, CH₂CH₂S), 3.74 (t, *J* = 5.3 Hz, 4 H, OCH₂CH₂CH₂NH₂), 3.69-3.58 (m, 28 H, OCH₂CH₂CH₂NHCS, CH₂O), 3.25-3-16 (m, 4 H, OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.96 (t, 4 H, CH₂CH₂S), 1.97 (qu, *J* = 5.3 Hz, 4 H, CH₂CH₂CH₂NH₂), 1.84 (m, *J* = 6.3 Hz, 4 H, CH₂CH₂CH₂NHCS). ¹³C NMR (125.7 MHz, 313 K, CDCl₃) δ 182.1 (CS), 70.5-69.0 (CH₂O), 43.5 (CH₂CH₂S), 41.9 (OCH₂CH₂CH₂NHCS), 40.5 (OCH₂CH₂CH₂NH₂), 38.5 (CH₂CH₂S), 28.7 (CH₂CH₂CH₂NCS), 26.1 (CH₂CH₂CH₂NH₂). ESI-MS: *m/z* 677.3 [M + H]⁺, 339.6 [M + 2H]⁺. Anal. calcd for C₂₆H₅₆N₆O₆S₄: C 46.13, H 8.34, N 12.41, S 18.94. Found: C 46.21, H 8.30, N 12.11, S 18.46.

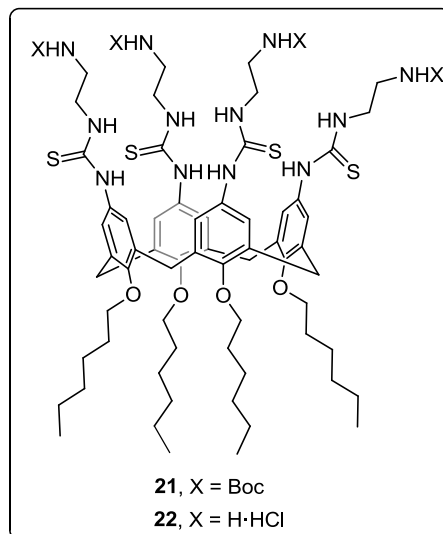


2,2'-Bis-(2-(N-(13-(N-(adamantan-1-yl)thiourea)-4,7,10-trioxatridecane-1-yl)thiourea)ethyl) disulfide (19). To a solution **18** (50 mg, 0.07 mmol) and Et₃N (60 μ L, 0.44 mmol) in dry DCM (4 mL) was added dropwise a solution of 1-isothiocyanatoadamantane (57 mg, 0.27 mmol) in dry DCM (1 mL). The mixture was stirred overnight at rt under Ar atmosphere. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by column chromatography (80:1 \rightarrow 9:1 DCM-MeOH). Yield: 49 mg (63%); $R_f = 0.52$ (9:1 DCM-MeOH). ¹H NMR (500 MHz, 313 K, CDCl₃) δ 7.92-7.78 (m, 4 H, NHCS), 6.36 (bs, 4 H, NHCS), 5.91 (bs, 4 H, NHCS), 3.94-3.84 (m, 4 H, CH₂CH₂S), 3.71-3.53 (m, 32 H, CH₂CH₂CH₂NHCS, CH₂O), 2.98 (t, 4 H, $J = 6.4$ Hz, CH₂CH₂S), 2.16 (m, 6 H, β H), 2.09 (m, 12 H, α H), 1.92-1.81 (m, 8 H, CH₂CH₂CH₂NHCS), 1.65 (m, 12 H, γ H). ¹³C NMR (125.7 MHz, 313 K, CDCl₃) δ 181.9, 180.0 (CS), 69.7-68.5 (CH₂O), 53.3 (Cq), 43.5 (CH₂CH₂S), 42.6, 41.7 (CH₂CH₂CH₂NHCS), 41.5 (α C), 37.4 (CH₂CH₂S), 35.4 (γ C), 28.7 (β C), 28.1, 28.0 (CH₂CH₂CH₂NCS). ESI-MS: m/z 1085.7 [M + Na]⁺, 1097.5 [M + Cl]⁻, 1061.6 [M - H]⁻. Anal. calcd for C₄₈H₈₆N₈O₆S₆: C 54.20, H 8.15, N 10.53, S 18.09. Found: C 54.14, H 7.99, N 10.37, S 18.12.

Preparation of amphiphilic polycationic systems based on cyclodextrins and calixarenes

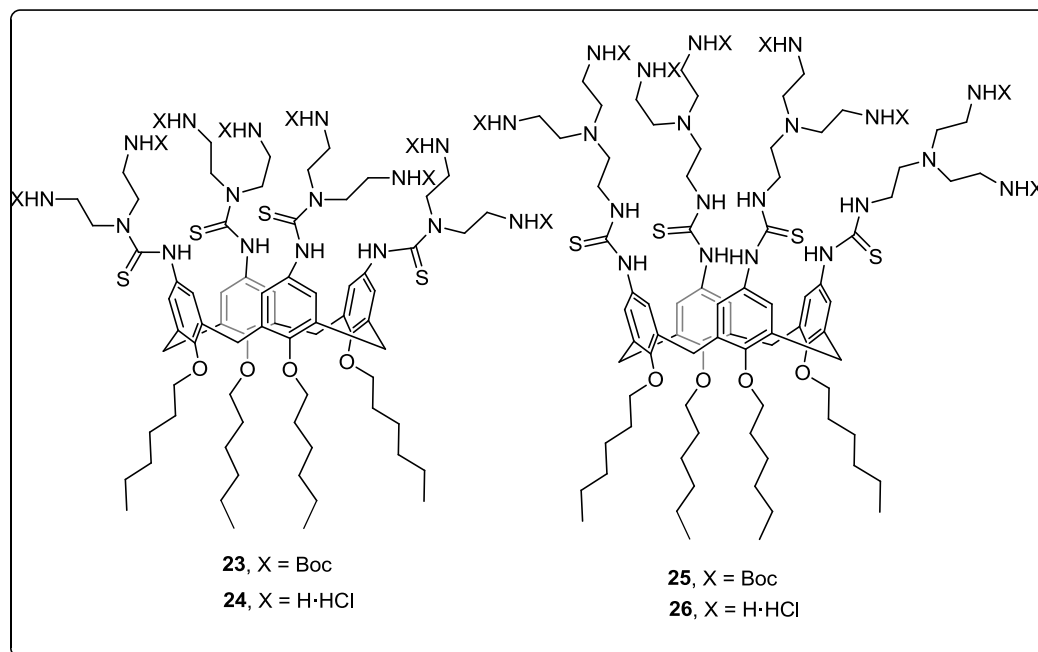


5,11,17,23-Tetraisothiocyanate-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (20). To a solution of 5,11,17,23-tetraamino-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (**158**, 150 mg, 0.183 mmol) in absolute EtOH (4 mL), CS₂ (440 μL, 7.3 mmol) and Et₃N (102 μL, 0.73 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 2 h at rt and then cooled in an ice bath. A solution of Boc₂O (158 mg, 0.72 mmol, 3.96 equiv) in absolute EtOH (1 mL) was added followed by the addition of a catalytic amount of DMAP (1.8 mg, 15 μmol, 0.08 equiv). The reaction mixture was kept in the ice bath for 20 min. Then it was allowed to reach rt and further stirred for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (1:3 DCM-cyclohexane). Yield: 181 mg (88%); R_f = 0.67 (1:3 DCM-cyclohexane). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.56 (s, 8 H, Ar), 4.35 (d, *J* = 10.2 Hz, 4 H, ArCH_{ax}Ar), 3.83 (t, *J* = 5.7 Hz, 8 H, CH_{2-1Hex}), 3.09 (d, *J* = 10.2 Hz, 4 H, ArCH_{eq}Ar), 1.89-1.77 (m, 8 H, CH_{2-2Hex}), 1.41-1.28 (m, 24 H, CH_{2-3Hex}, CH_{2-4Hex}, CH_{2-5Hex}), 0.97-0.84 (m, 12 H, CH_{3-6Hex}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ 155.7, 135.9 (Ar), 134.3 (NCS), 125.7, 125.6 (Ar), 75.9 (C-1Hex), 32.1 (C-3Hex), 30.9 (ArCH₂Ar), 30.2 (C-2Hex), 25.9 (C-4Hex), 22.9 (C-5Hex), 14.2 (C-6Hex). ESI-MS: *m/z* 1011.1 [M + Na]⁺. Anal. calcd for C₅₆H₆₈N₄O₄S₄: C 67.98, H 6.93, N 5.66, S 12.96. Found: C 68.07, H 6.88, N 5.61, S 12.79.



5,11,17,23-Tetra-[N'-(2-(tert-butoxycarbonylamino)ethyl)thioureido]-25,26,27,28-tetrakis-(n-hexyloxy)calix[4]arene (21). A solution of **20** (84.1 mg, 0.085 mmol) in dry DCM (3 mL) was added dropwise to a solution of commercial N'-(2-tert-butoxycarbonylamino)ethylamine (67 mg, 0.41 mmol, 4.8 equiv) and Et₃N (85 μL, 0.62 mmol, 7.2 equiv) in dry DCM (3 mL). The mixture was stirred overnight at rt, the solvent was removed under vacuum and the residue was purified by column chromatography (95:5 → 9:1 DCM-MeOH). Yield: 138 mg (99%); R_f = 0.61 (9:1 DCM-MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 6.68 (bs, 8 H, Ar), 4.46 (d, *J* = 12.7 Hz, 4 H, ArCH_{ax}Ar), 3.93 (t, *J* = 7.9 Hz, 8 H, CH₂-1_{Hex}), 3.65 (t, *J* = 6.0 Hz, 8 H, CH₂NHCS), 3.34-3.16 (m, 12 H, ArCH_{eq}Ar, CH₂NHBoc), 2.06-1.91 (m, 8 H, CH₂-2_{Hex}), 1.55-1.32 (m, 60 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}, CMe₃), 1.01-0.92 (m, 12 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ 181.6 (CS), 158.8 (CO), 155.8-125.9 (Ar), 80.2 (CMe₃), 76.7 (C-1_{Hex}), 45.9 (CH₂NHCS), 40.8 (CH₂NHBoc), 33.4 (C-3_{Hex}), 31.9 (ArCH₂Ar), 31.6 (C-2_{Hex}), 28.9 (CMe₃), 27.3 (C-4_{Hex}), 24.1 (C-5_{Hex}), 14.5 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 1651.8 [M + Na]⁺, 1668.7 [M + K]⁺. Anal. calcd for C₈₄H₁₃₂N₁₂O₁₂S₄: C 61.88, H 8.16, N 10.31, S 7.87. Found: C 61.85, H 8.29, N 10.24, S 7.79.

5,11,17,23-Tetraaminoethylthioureido-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)-calix[4]arene (22). A solution of **21** (40 mg, 25 μ mol) in DCM-TFA-TES (87.5:10:2.5, 0.5 mL) was stirred at 0 °C for 2 h. The solvent was removed and the residue was precipitated and washed with Et₂O. Then the solid was dissolved in an aqueous 0.1 M HCl solution and concentrated to yield the product as hydrochloride. Yield: 33.8 mg (99%). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6.72 (bs, 8 H, Ar), 4.47 (d, *J* = 13.2 Hz, 4 H, ArCH_{ax}Ar), 3.98-3.85 (m, 16 H, CH₂-1_{Hex}, CH₂NHCS), 3.26-3.13 (m, 12 H, ArCH_{eq}Ar, CH₂NH₂), 2.02-1.88 (m, 8 H, CH₂-2_{Hex}), 1.56-1.35 (m, 24 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 0.99-0.91 (m, 12 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (75.MHz, CD₃OD): δ 182.8 (CS), 156.0-125.7 (Ar), 76.7 (C-1_{Hex}), 42.8 (CH₂NHCS), 40.8 (CH₂NH₂), 33.4 (C-3_{Hex}), 31.9 (ArCH₂Ar), 31.5 (C-2_{Hex}), 27.3 (C-4_{Hex}), 24.0 (C-5_{Hex}), 14.5 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 1291.4 [M + Cu]⁺. Anal. calcd for C₆₄H₁₀₀N₁₂O₄S₄·4HCl: C 55.88, H 7.62, N 12.22, S 9.32. Found: C 55.59, H 7.56, N 11.92, S 9.03.



5,11,17,23-Tetra-[*N,N'*-bis-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)-thioureido]-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (23). A solution of **20** (84.1 mg, 0.085 mmol) in dry DCM (3 mL) was added dropwise to a solution of *N,N'*-bis-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)amine (**157**, 124 mg, 0.41 mmol, 4.8 equiv) and Et₃N (85 μL, 0.62 mmol, 7.2 eq) in dry DCM (3 mL). The mixture was stirred overnight at rt. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by column chromatography (100:1 → 99:1 DCM-MeOH). Yield: 187 mg (99%); *R_f* = 0.58 (9:1 DCM-MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6.96 (bs, 8 H, Ar), 4.48 (d, *J* = 12.5 Hz, 4 H, ArCH_{ax}Ar), 4.05-3.70 (m, 24 H, CH_{2-1Hex}, CH₂NHCS), 3.31 (bs, 16 H, CH₂NHBoc), 3.14 (d, *J* = 12.5 Hz, 4 H, ArCH_{eq}Ar), 2.07 (m, 8 H, CH_{2-2Hex}), 1.67-1.28 (m, 96 H, CMe₃, CH_{2-3Hex}, CH_{2-4Hex}, CH_{2-5Hex}), 1.05-0.95 (m, 12 H, CH_{3-6Hex}). ¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD, 333K): δ 183.2 (CS), 158.5 (CO), 155.3-127.3 (Ar), 80.7 (CMe₃), 76.6 (C-1Hex), 52.4 (CH₂NHCS), 39.7 (CH₂NHBoc), 33.3 (C-3Hex), 32.0 (ArCH₂Ar), 31.5 (C-2Hex), 29.0 (CMe₃), 27.2 (C-4Hex), 23.9 (C-5Hex), 14.4 (C-6Hex). ESI-MS: *m/z* 2265.9 [M + Cu]⁺, 1144.9 [M + Cu + Na]²⁺. Anal. calcd for C₁₁₂H₁₈₄N₁₆O₂₀S₄: C 61.06, H 8.42, N 10.17, S 5.82. Found: C 61.30, H 8.302, N 9.88, S 5.88.

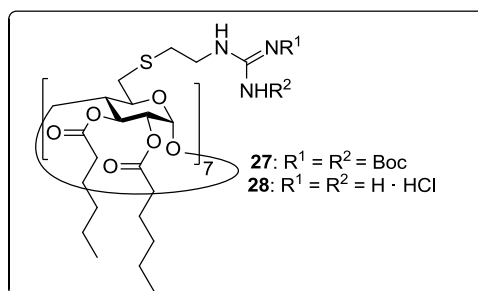
5,11,17,23-Tetra-[bis-2-(aminoethyl)thioureido]-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (24). A solution of **23** (25 mg, 11 μmol) in DCM-TFA-TES (87.5:10:2.5, 3 mL) was stirred at 0°C for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was precipitated and washed with Et₂O (5 mL). Then the solid was dissolved in an aqueous 0.1 M HCl solution and concentrated to give the product as hydrochloride. Yield: 19 mg (99%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 6.86 (s, 8 H, Ar), 4.50 (d, *J* = 12.6 Hz, 4 H, ArCH_{ax}Ar), 4.09 (t, *J* = 6.7 Hz, 16 H, CH₂NHCS), 3.96 (t, *J* = 7.8 Hz, 8 H, CH_{2-1Hex}), 3.26 (t, *J* = 6.7 Hz, 16 H, CH₂NH₂), 3.16 (d, *J* = 12.6 Hz, 4 H, ArCH_{eq}Ar), 2.11-1.95 (m, 8 H, CH_{2-2Hex}), 1.56-1.32 (m, 24 H, CH_{2-3Hex}, CH_{2-4Hex}, CH_{2-5Hex}), 1.02-0.90 (m, 12 H, CH_{3-6Hex}). ¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD, 313 K): δ 184.3 (CS), 155.5-127.9 (Ar), 76.9 (C-1Hex), 48.65 (CH₂NHCS), 38.4 (CH₂NH₂), 33.4 (C-3Hex),

31.8 (ArCH₂Ar), 31.6 (C-2_{Hex}), 27.1 (C-4_{Hex}), 23.9 (C-5_{Hex}), 14.5 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 1463.9 [M + Cu]⁺. Anal. calcd for C₇₂H₁₂₀N₁₆O₄S₄·8HCl: C 51.06, H 7.62, N 13.23, S 7.57. Found: C 50.77, H 7.59, N 12.91, S 7.19.

5,11,17,23-Tetra-[2-*N'*-(*N,N*-bis-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)amino)-ethyl]-thioureido]-25,26,27,28-tetrakis-(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (25). A solution of **20** (40 mg, 0.040 mmol) in dry DCM (3 mL) was added dropwise to a solution of 2-[bis-[2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl]amino]ethylamine (**159**, 67.4 mg, 0.19 mmol, 4.8 equiv) and Et₃N (40 μL, 0.28 mmol, 7.2 eq) in dry DCM (3 mL). The mixture was stirred overnight at rt. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by column chromatography (19:1 DCM-MeOH). Yield: 95 mg (99%); R_f = 0.56 (9:1 DCM-MeOH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 6.721 (bs, 8 H, Ar), 4.47 (d, J = 12.9 Hz, 4 H, ArCH_{ax}Ar), 3.93 (m, 8 H, CH_{2-1Hex}), 3.69-3.53 (m, 8 H, CH₂NHCS), 3.20 (d, J = 13.3 Hz, 4 H, ArCH_{eq}Ar), 3.07 (t, J = 6.4 Hz, 16 H, CH₂CH₂NHBoc), 2.77-2.65 (m, 8 H, CH₂CH₂NHCS), 2.64-2.53 (m, 16 H, CH₂CH₂NHBoc), 2.06-1.89 (m, 8 H, CH_{2-2Hex}), 1.62-1.25 (m, 96 H, CMe₃, CH_{2-3Hex}, CH_{2-4Hex}, CH_{2-5Hex}), 1.02-0.87 (m, 12 H, CH_{3-6Hex}). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD, 313 K): δ 181.7 (CS), 158.4 (CO), 155.9-126.1 (Ar), 80.3 (CMe₃), 76.6 (C-1_{Hex}), 55.3 (CH₂NHBoc), 54.4 (CH₂CH₂NHCS), 43.8 (CH₂NHCS), 40.1 (CH₂CH₂NHBoc), 33.3 (C-3_{Hex}), 32.0 (ArCH₂Ar), 31.5 (C-2_{Hex}), 29.0 (CMe₃), 27.3 (C-4_{Hex}), 23.9 (C-5_{Hex}), 14.4 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 2397.3 [M + Na]⁺, 1209.6 [M + 2Na]²⁺. Anal. calcd for C₁₂₀H₂₀₄N₂₀O₂₀S₄: C 60.68, H 8.66, N 11.79, S 5.40. Found: C 60.52, H 8.58, N 11.62, S 5.24.

5,11,17,23-Tetra-[2-*N'*-(*N,N*-bis-(2-ethylamino)ethyl)thioureido]-25,26,27,28-tetrakis-(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (26). A solution of **25** (52 mg, 22 μmol) in TFA (0.4 mL) was stirred at rt for 5 min. H₂O (10 mL) was added and the solution was freeze-dried. The residue was dissolved in 0.1 M HCl methanolic solution and freeze-dried to obtain the product as hydrochloride. Yield: 41 mg (99%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.02

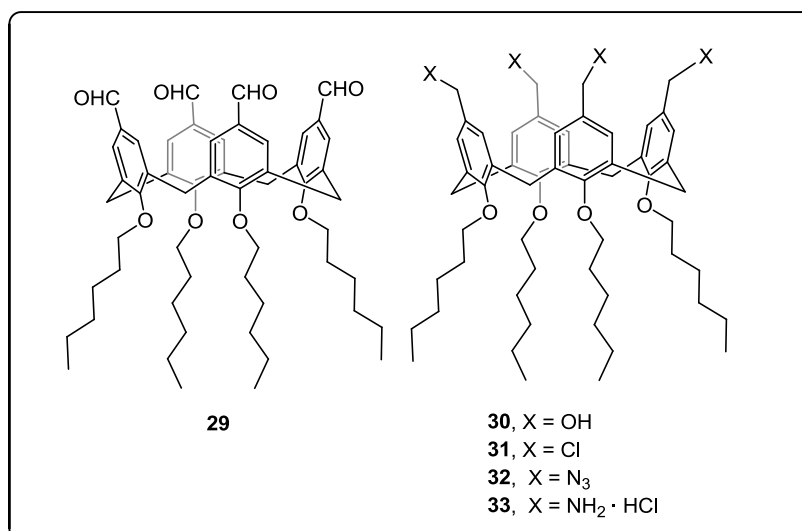
(bs, 8 H, Ar), 4.51 (d, $J = 12.7$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_{\text{ax}}\text{Ar}$), 4.18 (t, $J = 7.2$ Hz, 8 H, $\text{CH}_2\text{-1}_{\text{Hex}}$), 3.96 (t, $J = 7.7$ Hz, 8 H, CH_2NHCS), 3.37-3.26 (m, 40 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 3.21 (d, 4 H, $\text{ArCH}_{\text{eq}}\text{Ar}$), 2.18-2.06 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{-2}_{\text{Hex}}$), 1.56-1.34 (m, 24 H, $\text{CH}_2\text{-3}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-4}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-5}_{\text{Hex}}$), 1.05-0.89 (m, 12 H, $\text{CH}_3\text{-6}_{\text{Hex}}$). ^{13}C NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ 183.9 (CS), 155.4-127.8 (CAr), 76.5 (C-1_{Hex}), 51.5, 51.8 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$), 42.2 (CH_2NHCS), 37.9 (CH_2NH_2), 32.5 (C-3_{Hex}), 31.3 (ArCH_2Ar), 30.8 (C-2_{Hex}), 26.7 (C-4_{Hex}), 23.4 (C-5_{Hex}), 14.4 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 1574.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 788.0 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$. Anal. calcd for $\text{C}_{80}\text{H}_{152}\text{Cl}_{12}\text{N}_{20}\text{O}_4\text{S}_4$: C 47.76, H 7.62, N 13.92, S 6.38. Found: C 47.67, H 7.72, N 13.90, S 6.29.



Heptakis[6-(2-(di-tert-butoxycarbonylguanidino)ethylthio)-2,3-di-O-hexanoyl]-cyclomaltoheptaose (27). To a solution of heptakis[2,3-di-O-hexanoyl-6-(2-aminoethylthio)]cyclomaltoheptaose heptahydrochloride (**154**, 50 mg, 15 μmol) in dry DCM (5mL), under Ar atmosphere, Et_3N (61 μL , 440 μmol , 28 equiv) and *N-N'*-di-tert-butoxycarbonyl-*N''*-tryfilguanidine (86 mg, 220 μmol , 14 equiv) were added. The reaction mixture was stirred overnight. The reaction mixture was washed with an aqueous solution of 2 M KHSO_4 . The organic layer was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 , dried (MgSO_4), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (DCM \rightarrow 1:4 EtOAc-cyclohexane). Yield: 67 mg (99%); $R_f = 0.75$ (1:3 EtOAc-cyclohexane); $[\alpha]_D = +30.7$ (c 1 in MeOH). ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD , 313 K): δ 5.33 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.6$ Hz, H-3), 5.14 (d, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, 7 H, H-1), 4.88 (dd, 7 H, H-2), 4.26-4.15 (m, 7 H, H-5), 3.93 (t, 7 H, H-4), 3.78-3.53 (m, 14 H, H-6a,

H-6b), 3.16 (bs, 14 H, CH₂NH), 2.98–2.85 (m, 14 H, CH₂S), 2.51–2.14 (m, 28 H, CH₂-2_{Hex}), 1.74–1.56 (m, 28 H, CH₂-3_{Hex}), 1.57–1.43 (bs, 126 H, CMe₃), 1.45–1.24 (m, 56 H, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 1.02–0.85 (m, 42 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD, 313 K): δ 174.5, 173.4 (CO ester), 164.6 (CN), 157.3, 154.2 (CO carbamate), 98.6 (C-1), 84.5 (C-4), 80.4 (CMe₃), 73.0 (C-5), 71.9 (C-3), 71.5 (C-2), 41.4 (C-6), 35.2, 35.0 (C-2_{Hex}, CH₂NH), 34.1 (CH₂S), 32.6, 32.5 (C-4_{Hex}), 28.9, 28.6 (CMe₃), 25.6 (C-3_{Hex}), 23.6, 23.5 (C-5_{Hex}), 14.5 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 2332.2 [M + 2 Na]²⁺, 1562.7 [M + 3 Na]³⁺. Anal. calcd for C₂₁₇H₃₇₁N₂₁O₇₀S₇: C 56.43, H 8.10, N 6.37, S 4.86. Found: C 56.26, H 8.00, N 6.12, S 4.51.

Heptakis[6-(2-guanidinoethylthio)-2,3-di-*O*-hexanoyl]cyclomaltoheptaose heptahydrochloride (28). A solution of **27** (60 mg, 13 μmol) in DCM-TFA (1:1, 2 mL) was stirred at rt for 3 h. The solvent was eliminated under reduced pressure and coevaporated several times with water. The residue was dissolved in a 0.1 M HCl solution and freeze-dried to yield the product as hydrochloride. Yield: 45 mg (99%); [α]_D = + 68.3 (*c* 1 in DMF). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 5.39 (t, 7 H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 9.4 Hz, H-3), 5.18 (d, *J*_{1,2} = 3.51 Hz, 7 H, H-1), 4.86 (m, 7 H, H-2), 4.16–4.07 (m, 7 H, H-5), 3.96 (t, 7 H, H-4), 3.48 (t, 14 H, CH₂NH), 3.20–3.11 (m, 14 H, H-6a, H-6b), 2.97–2.85 (m, 14 H, CH₂S), 2.55–2.21 (m, 28 H, CH₂-2_{Hex}), 1.72–1.55 (m, 28 H, CH₂-3_{Hex}), 1.41–1.26 (m, 56 H, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 0.99–0.87 (m, 42 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (125.7 MHz, DMSO-*d*₆, 323 K): δ 172.2, 171.2 (CO), 156.8 (CN), 96.1 (C-1), 78.0 (C-4), 71.2 (C-5), 69.7 (C-3), 69.8 (C-2), 45.5 (C-6), 40.6 (CH₂NH), 33.1, 32.9 (C-2_{Hex}), 32.1 (CH₂S), 30.6, 30.4 (C-4_{Hex}), 23.6, 23.5 (C-3_{Hex}), 21.5 (C-5_{Hex}), 13.3, 13.2 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 1609.6 [M + 2 H]²⁺, 1073.0 [M + 3 H]³⁺, 805.1 [M + 4 H]⁴⁺. Anal. calcd for C₁₄₇H₂₆₆Cl₇N₂₁O₄₂S₇·7 H₂O: C 49.06, H 7.84, N 8.17, S 6.24. Found: C 48.91, H 7.78, N 8.03, S 6.15.



5,11,17,23-Tetraformyl-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (29). A solution of hexamethylenetetramine (16.57 g, 118.3 mmol, 36 equiv) in TFA (150 mL) was stirred at 100 °C for 10 min. Then, 25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (**169**, 2.5 g, 3.29 mmol) was added and the mixture was stirred at reflux for 2 days. The reaction was quenched by addition of HCl 1 M (400 mL) and stirred for 3h. The aqueous layer was extracted twice with DCM (250 mL); the combined organic phases were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (200 mL) and brine (200 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The product was purified by cristalization from hexane (50 mL). Yield: 2.75g (96%). $R_f = 0.20$ (2:3 EtOAc-cyclohexane). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.58 (s, 4 H, CHO), 7.15 (s, 8 H, Ar), 4.49 (d, $J = 13.8$ Hz, 4 H, ArCH_{ax}Ar), 3.96 (t, $J = 7.5$ Hz, 8 H, CH_{2-1Hex}), 3.34 (d, $J = 13.8$ Hz, 4 H, ArCH_{eq}Ar), 2.00-1.80 (m, 8 H, CH_{2-2Hex}), 1.50-1.20 (m, 24 H, CH_{2-3Hex}, CH_{2-4Hex}, CH_{2-5Hex}), 1.00-0.80 (m, 12 H, CH_{3-6Hex}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 191.3-130.2 (Ar), 75.8 (C-1Hex), 31.9 (C-3Hex), 30.9 (ArCH₂Ar), 30.3 (C-2Hex), 25.8 (C-4Hex), 22.8 (C-5Hex), 14.0 (C-6Hex). ESI-MS: m/z 895.9 [M + Na]⁺. Anal.

calcd for C₅₆H₇₂O₈: C 77.03, H 8.31. Found: C 76.78, H 8.04.

5,11,17,23-Tetrahydroxymethyl-25,26,27,28-tetrakis(*n*-oxyloxy)calix[4]arene (30). To a suspension of **29** (910 g, 1.04 mmol) in absolute EtOH (50 mL) at 0 °C, NaBH₄ (0.24 g, 6.25 mmol, 6 equiv) was added. The mixture was stirred at room temperature for 18 h. Then, HCl 1 M (20 mL) was added and the solvents were evaporated under reduced pressure. EtOAc (50 mL) was added and the organic layer was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (50 mL) and H₂O (50 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated. Yield: 788 mg (86%). R_f = 0.16 (19:1 DCM- MeOH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 6.66 (s, 8 H, Ar), 4.46 (d, *J* = 13.2 Hz, 4 H, ArCH_{ax}Ar), 4.24 (s, 8 H, CH₂OH), 3.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 8 H, CH_{2-1Hex}), 3.15 (d, *J* = 13.2 Hz, 4 H, ArCH_{eq}Ar), 2.00-1.87 (m, 8 H, CH_{2-2Hex}), 1.52-1.34 (m, 24 H, CH_{2-3Hex}, CH_{2-4Hex}, CH_{2-5Hex}), 0.95 (t, *J* = 6.6 Hz, 12 H, CH_{3-6Hex}). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 157.1-128.3 (Ar), 76.0 (C-1_{Hex}), 65.1 (CH₂OH), 33.1 (C-3_{Hex}), 32.1 (ArCH₂Ar), 31.5 (C-2_{Hex}), 27.3 (C-4_{Hex}), 24.0 (C-5_{Hex}), 14.5 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 903.8 [M +Na]⁺. Anal. calcd for C₅₆H₈₀O₈: C 76.33, H 9.15. Found: C 76.41, H 9.20.

5,11,17,23-Tetrachloromethyl-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (31). To a solution of **30** (600 mg, 0.68 mmol) in dry DCM (10 mL), SOCl₂ (0.99 mL, 13.60 mmol, 20 equiv) was added dropwise and the mixture was stirred for 4 h at room temperature. Then, the solvent was evaporated under reduced pressure. Yield: 622 mg (95%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.64 (s, 8 H, Ar), 4.40 (d, *J* = 13.2 Hz, 4 H, ArCH_{ax}Ar), 4.29 (s, 8 H, CH₂Cl), 3.88 (t, *J* = 7.6 Hz, 8 H, CH_{2-1Hex}), 3.12 (d, *J* = 13.2 Hz, 4 H, ArCH_{eq}Ar), 1.95-1.80 (m, 8 H, CH_{2-2Hex}), 1.49-1.19 (m, 24 H, CH_{2-3Hex}, CH_{2-4Hex}, CH_{2-5Hex}), 1.01-0.77 (m, 12 H, CH_{3-6Hex}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 157.0-128.6 (Ar), 75.4 (C-1_{Hex}), 46.6 (CH₂Cl), 32.0 (C-3_{Hex}), 30.9 (ArCH₂Ar), 30.2 (C-2_{Hex}), 25.9 (C-4_{Hex}), 22.8 (C-5_{Hex}), 14.1 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 977.7 [M +Na]⁺. Anal. calcd for C₅₆H₇₆Cl₄O₄: C 70.43, H 8.02. Found: C 70.54, H 8.16.

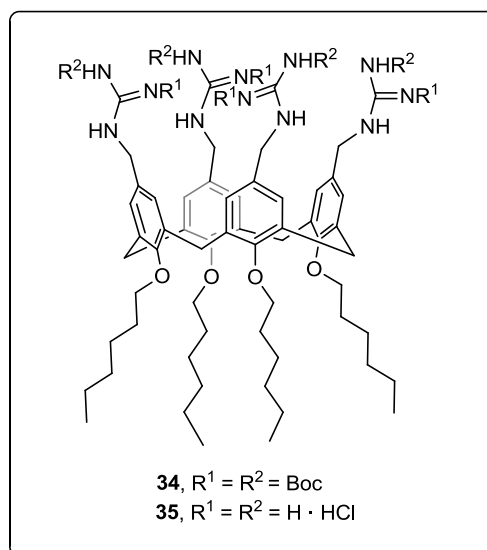
5,11,17,23-Tetraazidomethyl-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene

(**32**). To a solution of **31** (192 mg, 0.20 mmol) in dry DMF (7 mL), NaN₃ (78.5 mg) was added. The mixture was stirred under Ar atm., at rt, overnight. Then, the solvent was evaporated and the crude was dissolved in EtOAc (15 mL). The organic layer was washed with water (15 mL), dried over MgSO₄, filtrated and concentrated. The residue was purified by column chromatography (Cyclohexane → 19:1 Cyclohexane – EtOAc). R_f = 0.29 (19:1 Cyclohexane – EtOAc). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.61 (bs, 8 H, Ar), 4.45 (d, *J* = 13.2 Hz, 4 H, ArCH_{2ax}Ar), 3.95 (s, 8 H, CH₂N₃), 3.89 (t, *J* = 7.5 Hz, 8 H, CH_{2-1Hex}), 3.16 (d, *J* = 13.2 Hz, 4 H, ArCH_{2eq}Ar), 1.98-1.85 (m, 8 H, CH_{2-2Hex}), 1.48-1.30 (m, 24 H, CH_{2-3Hex}, CH_{2-4Hex}), 0.93 (t, *J* = 6.9 Hz, 12 H, CH_{3-6Hex}). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 162.1 – 128.2 (Ar), 75.0 (C-1_{Hex}), 53.8 (CH₂N₃), 31.7 (C-3_{Hex}), 30.4 (ArCH₂Ar), 29.9 (C-2_{Hex}), 25.5 (C-4_{Hex}), 22.4 (C-5_{Hex}), 13.7 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 1004.1 [M + Na]⁺, 1020.0 [M + K]⁺. Anal. calcd for C₅₆H₇₆N₁₂O₄: C 68.54, H 7.81, N 17.13, O 6.52. Found: C 68.60, H 7.67, N 17.09.

5,11,17,23-Tetraaminomethyl-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene

tetrahydrochloride (33). To a solution of **32** (300 mg, 0.306 mmol) in EtOAc-EtOH (1:1, 50 mL), a catalytic amount of Pd/C (30 mg) and 1 M HCl (4 mL) were added. Hydrogenation was carried out at 2 atm for 48 h. Then, the catalyst was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. Yield: 313 mg (99%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 6.87 (s, 8 H, Ar), 4.49 (d, *J* = 13.2 Hz, 4 H, ArCH_{ax}Ar), 3.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 8 H, CH_{2-1Hex}), 3.84 (s, 8 H, CH₂NH₂), 3.31 (m, 4 H, ArCH_{eq}Ar) 2.00-1.85 (m, 8 H, CH_{2-2Hex}), 1.55-1.30 (m, 24 H, CH_{2-3Hex}, CH_{2-4Hex}, CH_{2-5Hex}), 1.00-0.85 (m, 12 H, CH_{3-6Hex}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ 157.0-126.7 (Ar), 75.2 (C-1_{Hex}), 42.6 (CH₂NH₂), 31.9 (C-3_{Hex}), 30.3 (ArCH₂Ar), 30.1 (C-2_{Hex}), 25.8 (C-4_{Hex}), 22.5 (C-5_{Hex}), 13.1 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 877.6 [M + H]⁺, 899.8 [M + Na]⁺. Anal. calcd for C₅₆H₈₈Cl₄N₄O₄: C 65.74, H

8.67, N 5.48. Found: C 66.91, H 8.37, N 5.62.

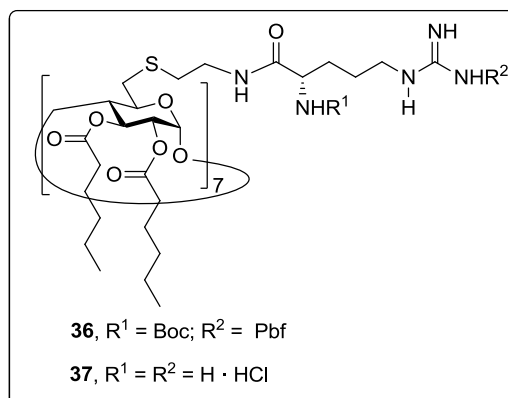


5,11,17,23-Tetra-[N,N'-di-(*tert*-butoxycarbonyl)]guanidinomethyl-

25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (34). To a solution of **33** (100 mg, 0.098 mmol) in dry DCM (5 mL), Et_3N (137 μL , 0.98 mmol, 10 equiv) was added. Then, a solution of *N,N'*-di-*tert*-butoxycarbonyl-*N,N'*-tryfilguanidine (192 mg, 0.49 mmol) in dry DCM (1 mL) was added. The mixture was stirred at rt, under N_2 atm, 48 h. The reaction mixture was washed with an aqueous solution of 2 M KHSO_4 . The organic layer was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 , dried (MgSO_4), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (2:1 DCM-cyclohexane \rightarrow 1:5 EtOAc- cyclohexane). Yield: 165 mg (91%). $R_f = 0.24$ (1:6 EtOAc - cyclohexane). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.74 (bs, 4 H, NH), 7.55 (bs, 4 H, NH), 6.60 (s, 8 H, Ar), 4.38 (d, $J = 12.8$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_{\text{ax}}\text{Ar}$), 4.27 (d, $J = 4.4$ Hz, 8 H, CH_2NH), 3.84 (t, $J = 7.6$ Hz, 8 H, $\text{CH}_2\text{-1}_{\text{Hex}}$), 3.10 (d, $J = 13.2$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_{\text{eq}}\text{Ar}$), 1.98-1.85 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{-2}_{\text{Hex}}$), 1.52-1.28 (m, 96 H, $\text{CH}_2\text{-3}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-4}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-5}_{\text{Hex}}$, CMe_3) 0.90 (t, $J = 6.8$ Hz, 12 H, CH_3 -

6_{Hex} . ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 163.6 (CN), 156.1 (Ar), 155.7, 153.1 (CO carbamate), 135.1-127.9 (Ar), 86.0, 82.9 (CMe_3), 75.4 (C-1_{Hex}), 44.9 (CH_2NH), 32.2, 31.6 (C-3_{Hex}), 31.1 (ArCH_2Ar), 30.3 (C-2_{Hex}), 28.3, 27.1, 30.9 (CMe_3), 26.0 (C-4_{Hex}), 22.9, 22.6 (C-5_{Hex}), 14.1 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 1846.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 1868.7 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1885.7 $[\text{M} + \text{K}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{100}\text{H}_{156}\text{N}_{12}\text{O}_{20}$: C 65.05, H 8.52, N 9.10. Found: C 65.23, H 8.64, N 9.03.

5,11,17,23-Tetraguanidinomethyl-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)-calix[4]arene tetrahydrochloride (35). To a solution of **34** (69 mg, 0.037 mmol) in dry dioxane (7 mL), TES (59 μL , 0.37 mmol) and 37% HCl (500 μL) were added. The mixture was stirred 24 h at rt. Then, the solvents were evaporated under reduced pressure. The product was precipitated with Et_2O (6 mL) and dried under reduced pressure. Yield: 44 mg (99%). ^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 6.75 (s, 8 H, Ar), 4.49 (d, $J = 13.2$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_{\text{ax}}\text{Ar}$), 4.15 (s, 8 H, CH_2NH), 3.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 8 H, $\text{CH}_2\text{-1}_{\text{Hex}}$), 3.23 (d, $J = 13.2$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_{\text{eq}}\text{Ar}$), 2.05-1.95 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{-2}_{\text{Hex}}$), 1.55-1.31 (m, 24 H, $\text{CH}_2\text{-3}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-4}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-5}_{\text{Hex}}$), 1.01-0.93 (m, 12 H, $\text{CH}_3\text{-6}_{\text{Hex}}$). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD): δ 158.3 (CN), 157.6-129.0 (Ar), 76.5 (C-1_{Hex}), 45.9 (CH_2NH), 33.6 (C-3_{Hex}), 31.9 (ArCH_2Ar), 31.5 (C-2_{Hex}), 27.3 (C-4_{Hex}), 24.0 (C-5_{Hex}), 14.5 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 1045.89 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{96}\text{Cl}_4\text{N}_{12}\text{O}_4$: C 60.49, H 8.12, N 14.11. Found: C 60.13, H 7.95, N 13.89.

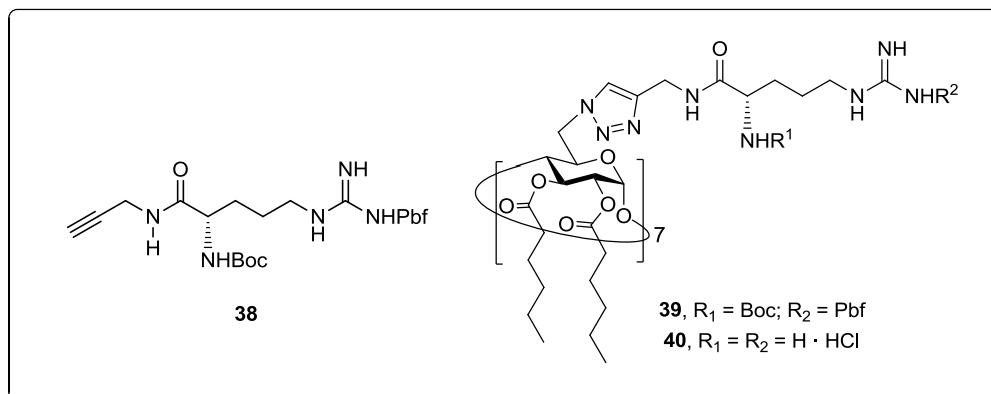


Heptakis[6-(2-(4-(*N*_α-*tert*-butoxycarbonylamino-*N*_ω-(2,2,4,6,7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-arginine-*N*-amide)ethylthio)-2,3-di-*O*-hexanoyl]cyclomaltoheptaose (36). To a solution of heptakis[2,3-di-*O*-hexanoyl-6-(2-aminoethylthio)]cyclomaltoheptaose heptahydrochloride (**154**, 60 mg, 19 μmol) in dry DCM (4 mL), under Ar atmosphere, DIPEA (90 μL, 53 μmol), *N*_α-*tert*-butoxycarbonylamino-*N*_ω-(2,2,4,6,7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-arginine (*N*_α-Boc-*N*_ω-Pbf-L-arginine) (104 mg, 198 μmol) and *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) (75 mg, 198 μmol) were added and the mixture was stirred overnight. The reaction mixture was washed with an aqueous solution of NaHCO₃ (8 mL), the organic layer was dried (MgSO₄), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (25:1 → 18:1 DCM-MeOH). Yield: 83 mg (68%). *R*_f = 0.43 (17:1 DCM-MeOH). [α]_D = +31.9 (*c* 1 in MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 5.54 (t, 7 H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 9.5 Hz, H-3), 5.36 (d, *J*_{1,2} = 3.7 Hz, 7 H, H-1), 5.02 (dd, 7 H, H-2), 4.41 (m, 7 H, H-5), 4.33-4.23 (m, 7 H, CH-2-Arg), 4.12 (m, 7 H, H-4), 3.76-3.67 (m, 7 H, CH₂NCO), 3.64-3.55 (m, 7 H, CH₂NCO), 3.48-3.28 (s, 28 H, CH₂-5-Arg, H_{6a}, H_{6b}), 3.17 (s, 14 H, Me_{Pbf}), 3.07-2.96 (m, 14 H, CH₂S), 2.77 (s, 21 H, Me_{Pbf}), 2.71 (s, 21 H, Me_{Pbf}), 2.57-2.38 (m, 28 H, CH₂-2_{Hex}), 2.26 (s, 21 H, Me_{Pbf}), 2.03-1.93 (m, 7 H, CH₂-3-Arg), 1.91-1.71 (m, 49 H, CH₂-3-Arg, CH₂-4-Arg, CH₂-3_{Hex}), 1.63 (bs, 42 H, CMe₂ Pbf), 1.61 (bs, 63 H, CMe₃), 1.59-1.44 (m, 56 H, CH₂-4_{Hex},

CH₂-5_{Hex}), 1.20-1.05 (m, 42 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 174.9, 174.7 (CO ester), 173.5 (CO amide), 159.9 (CN), 158.1 (CO carbamate), 157.7-118.4, (Cq_{Pbf}), 98.2 (C-1), 87.7 (CMe₃), 80.7 (CMe_{2Pbf}), 71.7 (C-4), 73.5 (C-5), 71.7, 71.6 (C-2, C-3), 55.8 (CH₂-2-Arg), 44.1 (CH_{2Pbf}), 41.5 (CH-5-Arg), 40.5 (CH₂NHCO), 35.1, 35.0 (C-2_{Hex}, C-6), 34.1 (CH₂S), 32.6, 32.5 (C-4_{Hex}), 30.9 (CH₂-3-Arg), 28.9, 28.8 (CMe_{2Pbf}, CMe₃), 27.1 (CH₂-4-Arg), 25.6 (C-3_{Hex}), 23.6 (C-5_{Hex}), 19.8, 18.6 (Me_{Pbf}), 14.6 (C-6_{Hex}), 12.7 (Me_{Pbf}). ESI-MS: *m/z* 3263.3 [M + 2 Na]²⁺, 2182.6 [M + 3 Na]²⁺. Anal. calcd for C₃₀₈H₄₉₇N₃₅O₈₄S₁₄: C 57.06, H 7.73, N 7.56, S 6.92. Found: C 56.88, H 7.64, N 7.34, S 6.63.

Heptakis[6-(2-(4-L-arginine-N-amide)ethylthio)-2,3-di-O-hexanoyl]-cyclomaltoheptaose (37). A solution of **36** (37.5 mg, 6 μmol) in TFA-TIS-H₂O (95:2.5:2.5, 4 mL) was stirred at rt for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and coevaporated several times with H₂O. The residue was dissolved in an aqueous solution 0.1 M HCl solution and freeze-dried to obtain the product as hydrochloride. Yield: 41 mg (99%); [α]_D = +9.7 (*c* 1 in DMSO). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 323 K): δ 8.96 (bs, 7 H, NHCO), 8.51-8.29 (m, 14 H, NH₂Arg), 7.93-7.77 (bs, 7 H, NH guanidine), 7.44-7.09 (m, 21 H, NH, NH₂ guanidine), 5.25 (t, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 9.0 Hz, 7 H, H-3), 5.09 (bs, 7 H, H-1), 4.69 (bd, 7 H, H-2), 4.17-4.07 (m, 7 H, H-5), 3.99-3.83 (m, 21 H, CH₂-5-Arg, H-4), 3.43-3.32 (bs, 14 H, CH₂N), 3.29-3.19 (bs, 14 H, CH₂-5-Arg), 3.15-2.99 (m, 14 H, H-6a, H-6b), 2.87-2.66 (m, 14 H, CH₂S), 2.44-2.29 (m, 14 H, CH₂-2_{Hex}), 2.26-2.11 (m, 14 H, CH₂-2_{Hex}), 1.92-1.80 (m, 14 H, CH₂-3-Arg), 1.70-1.58 (m, 14 H, CH₂-4-Arg), 1.58-1.45 (m, 28 H, CH₂-3_{Hex}), 1.35-1.19 (bs, 56 H, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 0.93-0.78 (m, 42 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (125.7 MHz, DMSO-d₆, 323 K): δ 175.7, 174.5 (CO ester), 177.8 (CO amide), 161.2 (CN), 99.4 (C-1), 81.3 (C-4), 74.3 (C-5), 73.1 (C-2), 72.9 (C-3), 55.1 (CH₂-2-Arg), 43.7 (CH₂-5-Arg), 42.4 (CH₂NHCO), 36.5, 36.3 (C-2_{Hex}, C-6), 35.3 (CH₂S), 33.9, 33.8 (C-4_{Hex}), 31.4 (CH₂-3-Arg), 27.2 (CH₂-4-Arg), 26.9, 26.8 (C-3_{Hex}), 24.9, 24.8 (C-5_{Hex}), 16.65, 16.63 (C-6_{Hex}). MALDI-MS: *m/z* 4017.86 [M + H]⁺.

Anal. calcd for $C_{182}H_{343}Cl_{14}N_{35}O_{49}S_7 \cdot 7 H_2O$: C 46.98, H 7.73, N 10.54, S 4.82. Found: C 47.01, H 7.50, N 10.48, S 4.75.



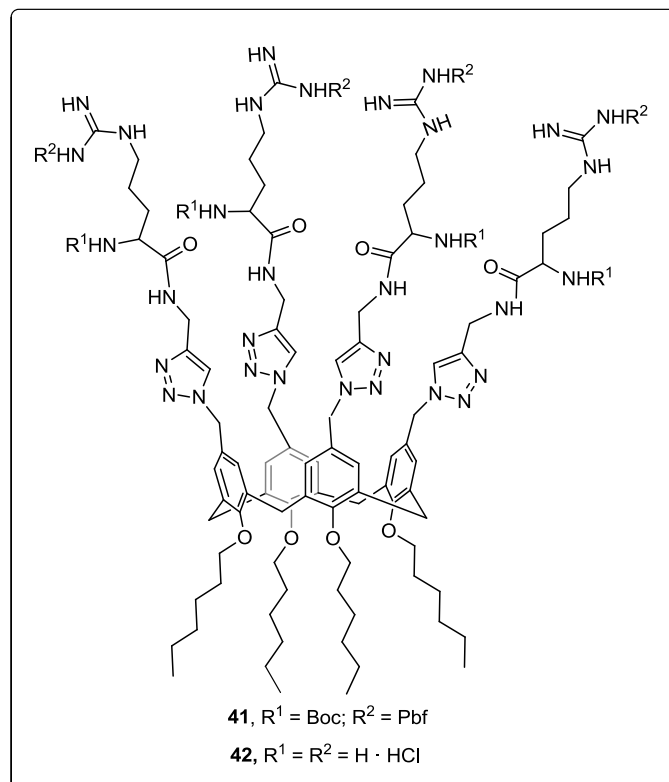
***N*_α-*tert*-butoxycarbonylamino-*N*_ω-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydro-benzofurane-5-sulfonyl)-L-arginine-*N*-propargylamide (38).** A mixture of *N*_α-Boc-*N*_ω-Pbf-L-arginine (1g, 1.9 mmol), DIPEA (0.78 mL, 4.5 mmol, 2.4 equiv) and HBTU (865 mg, 2.28 mmol, 1.2 equiv) were dissolved in dry DMF (15 mL), under Ar atmosphere. After stirring for 30 min at rt, propargylamine (0.146 mL, 2.28 mmol, 1.2 equiv) was added and the mixture was stirred for 15 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in EtOAc (15 mL), the organic layer was washed with aqueous saturated NaHCO_3 (15 mL), H_2O (15 mL), dried (MgSO_4), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (1:2 → 3:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 935 mg (87%); $R_f = 0.41$ (19:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_D = +0.9$ (*c* 1.0, MeOH). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.34 (bs, 1 H, NHCO), 6.27 (m, 3 H, NH), 5.59 (bs, 1 H, *NHBoc*), 4.20 (bs, 1 H, CH-2-Arg), 3.99 (m, 2 H, CH_2 -Alkyne), 3.27 (bs, 2 H, CH_2 -5-Arg), 2.96 (s, 2 H, CH_2 _{Pbf}), 2.51 (s, 3 H, Me_{Pbf}), 2.50 (s, 3 H, Me_{Pbf}), 2.18 (t, $J = 2.5$ Hz, 1 H, CH-Alkyne), 2.09 (s, 3 H, Me_{Pbf}), 1.81 (m, 2 H, CH_2 -3-Arg), 1.60 (m, 2 H, CH_2 -4-Arg), 1.46 (s, 6 H, CMe_2 _{Pbf}), 1.41 (s, 9 H, CMe_3). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3): δ 165.9 (CO amide), 159.0 (CAr), 156.8 (CN), 156.1 (CO carbamate), 138.3-117.6 (CAr),

86.4 (CMe₂), 80.2 (CMe₃), 79.6 (Cq alkyne), 71.4 (CH alkyne), 60.4 (CHNHBoc), 43.2 (CH₂ Pbf, CH₂-5-Arg), 29.9 (CH₂-4-Arg), 29.1 (CH₂-6-Arg), 28.6 (CMe₂), 28.3 (CMe₂), 19.3, 17.9, 12.5 (Me Pbf). ESI-MS: *m/z* 586.3 [M + Na]⁺, 602.1 [M + K]⁺. Anal. calcd for C₂₇H₄₁N₅O₆S: C 57.53, H 7.33, N 12.42, S 5.69. Found: C 57.58 H 7.24, N 12.31, S 5.36.

Heptakis[6-deoxy-2,3-di-*O*-hexanoyl-6-[4-(*N*_α-*tert*-butoxycarbonylamino-*N*_ω-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofurane-5-sulfonyl)-L-arginine-*N*-amide)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]cyclomalto-heptaose (39). To a solution of heptakis[6-azido-6-deoxy-2,3-di-*O*-hexanoyl]cyclomaltoheptaose (**160**, 88 mg, 33 μmol) in acetone (5 mL), *N*_α-*tert*-butoxycarbonylamino-*N*_ω-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofurane-5-sulfonyl)-L-arginine-*N*-propargylamide (**38**, 142 mg, 0.25 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (38 μL, 0.24 mmol) and CuI·P(EtO)₃ (8.0 mg, 25 μmol) were added. The reaction mixture was refluxed for 48 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (20:1 → 9:1 DCM–MeOH). Yield: quantitative; *R_f* = 0.60 (9:1 DCM–MeOH); [α]_D = +29.7 (*c* 1.0, MeOH). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.12 (bs, 7 H, CH_{triazole}), 7.84 (bs, 7 H, Ar), 6.69 (bs, 7 H, NH₂ guanidine), 6.55 (bs, 14 H, NH₂ guanidine), 5.48–5.35 (m, 14 H, H-3, H-1), 4.74–4.59 (m, 21 H, CH₂NHCO amide, H-2), 4.57–4.54 (m, 7 H, H-5), 4.41–4.36 (m, 7 H, H-6a), 4.23–4.11 (m, 7 H, H-6b), 3.95 (m, 7 H, CH_{Arg-2}), 3.61 (bt, 7 H, H-4), 3.09 (m, 14 H, CH₂ Arg-5), 2.96 (s, 14 H, CH₂ Pbf), 2.51 (s, 21 H, CH₃ Pbf), 2.46 (s, 21 H, CH₃ Pbf), 2.28–2.26 (m, 14 H, CH₂ Hex-2), 2.28–2.26 (m, 14 H, CH₂ Hex-2), 2.27–2.10 (m, 14 H, CH₂-2Hex), 2.03 (s, 21 H, CH₃ Pbf), 1.66–1.18 (217 H, CH₂ Arg-2, CH₂ Arg-4, CH₂-3Hex, CH₂-4Hex, CH₂-5Hex, CH₃ Pbf, C(CH₃)₃), 0.93–0.80 (bs, 21 H, CH₃-6Hex). ¹³C NMR (125.7 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.3, 175.1 (CO ester), 174.3 (CO amide), 160.6 (CN guanidine), 159.3 (CO carbamate), 147.6 (C4 triazole), 140.3–134.6, (Cq Pbf (Ar)), 127.8 (C5 triazole), 127.3, 119.3 (Cq Pbf (Ar)), 99.0 (C-1), 89.2 (C(CH₃)₃ carbamate), 81.3 (C(CH₃)₂ Pbf), 79.6 (C-4), 72.8 (C-3), 72.5 (C-5), 72.3 (C-2), 57.2 (CH₂ Arg-2), 52.6 (CH₂NHCO amide), 45.7 (CH₂ Pbf), 42.4 (CH Arg-5), 37.4 (C-6), 36.4, 36.3 (C-2Hex), 33.9, 33.7 (C-4Hex), 32.0 (CH₂ Arg-3), 31.3, 31.2 (C(CH₃)₂ Pbf, C(CH₃)₃ carbamate), 28.7 (CH₂ Arg-4), 26.9, 26.8 (C-3Hex),

24.8, 24.9 (C-5_{Hex}), 21.8 (CH₃ Pbf), 20.5 (CH₃ Pbf), 16.6 (C-6_{Hex}), 15.2 (CH₃ Pbf). ESI-MS: m/z 3355.6 [M + Cu + Na]²⁺. Anal. calcd for C₃₁₅H₄₉₀N₅₇O₈₄S₇: C 57.06, H 7.45, N 11.83, O 20.27, S 3.39. Found: C 56.78, H 7.20, N 11.47, 2.92.

Heptakis[6-deoxy-2,3-di-O-hexanoyl-6-[4-L-arginine-N-amide)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]cyclomal-to-heptaose (40). A solution of **39** (45.2 mg, 7 μmol), in TFA-TIS-H₂O (95 : 2.5 : 2.5, 4.5 mL) was stirred at rt for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure and coevaporated several times with water. The residue was dissolved in a 0.1 M HCl solution and freeze-dried to obtain the product as hydrochloride. Yield: 35.7 mg (quantitative); [α]_D = +46.5 (*c* 1 in DMF). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.99 (bs, 7 H, NH_{amide}), 7.99 (m, 21 H, CH_{triazole}, NH₂ arginine), 7.18 (bs, 21 H, NH₂ guanidine, NH_{guanidine}), 5.41-5.37 (m, 14 H, H-3, H-1), 4.68-4.63 (m, 21 H, H-2, CH₂NHCO amide), 4.51 (m, 7 H, H-5), 4.36-4.34 (m, 7 H, H-6a), 4.23-4.21 (m, 7 H, H-6b), 3.92 (m, 7 H, CH_{Arg-2}), 3.72 (bt, 7 H, H-4), 3.19 (m, 14 H, CH₂ Arg-5), 2.37-1.93 (m, 28 H, CH₂ Hex-2), 2.27-2.10 (m, 14 H, CH₂-2_{Hex}), 1.86-1.79 (m, 14 H, CH₂ Arg-2), 1.48-1.38 (m, 42 H, CH₂ Arg-4, CH₂-3_{Hex}), 1.37-2.20 (m, 56 H, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 0.94-0.80 (bs, 21 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (125.7 MHz, DMSO-d₆) δ 172.8, 171.8 (CO_{ester}), 169.1 (CO_{amide}), 157.7 (CN_{guanidine}), 144.2 (C₄ triazole), 125.7 (C₅ triazole), 102.5 (C-1), 77.3 (C-4), 70.3 (C-3), 70.1 (C-5), 69.7 (C-2), 52.5 (CH_{Arg-2}), 49.9 (CH₂NHCO_{amide}), 40.7 (CH_{Arg-5}), 34.9 (C-6), 33.8, 33.7 (C-4_{Hex}), 31.2, 31.1 (C-4_{Hex}), 28.5 (CH₂ Arg-3), 24.3, 24.2 (C-3_{Hex}CH₂ Arg-4), 22.2, 22.1 (C-5_{Hex}), 13.9 (C-6_{Hex}). MALDI-MS: m/z 4163.60 [M + H]⁺. Anal. calcd for C₃₁₅H₄₉₀N₅₇O₈₄S₇: C 48.57, H 7.25, Cl 10.62, N 16.78, O 16.78. Found: C 48.33, H 6.82, N 16.49.



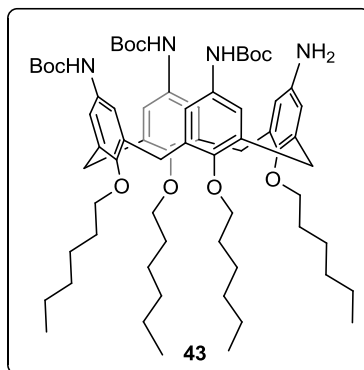
5,11,17,23-Tetra-[4-(*N*_α-*tert*-butoxycarbonylamino-*N*_ω-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofurane-5-sulfonyl)-L-arginine-*N*-amide)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (41). To a solution of **32** (35mg, 35.7 μmol) in acetone (5 mL), **38** (104.5 mg, 0.185 mmol), DIPEA (25 μL, 0.143 mmol) and CuI·P(EtO)₃ (5.1 mg, 14.3 μmol) were added. The reaction mixture was refluxed for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (99:1 → 9:1 DCM–MeOH). Yield: 82 mg (71%); R_f = 0.65 (9:1 DCM–MeOH); [α]_D = +2.69 (*c* 1.0, MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, 323 K): δ 7.79 (bs, 4 H, CH_{triazole}), 6.60 (bs, 8 H, Ar), 5.25 (bs, 8 H, CH₂NHCO amide), 4.50–4.36 (m, 12 H, CH₂Ar, ArCH_{ax}Ar), 4.02 (bs, 4 H, CH-2-Arg), 3.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 8 H, CH₂-1_{Hex}), 3.19–3.02 (m, 12 H, ArCH_{eq}Ar, CH₂-5-Arg), 2.96 (s, 8 H, CH₂_{Pbf}), 2.55 (s,

12 H, Me_{Pbf}), 2.50 (s, 12 H, Me_{Pbf}), 2.05 (s, 12 H, Me_{Pbf}), 1.94-1.85 (m, 8 H, CH₂-2_{Hex}), 1.79-1.29 (m, 100 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}, CMe₃, CMe₂ Pbf, CH₂-3-Arg, CH₂-4-Arg), 0.98-0.88 (m, 12 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ 173.5 (CO amide), 158.4 (CN guanidine), 156.4 (Ar), 156.2 (CO carbamate), 145.0 (C-4 triazole) 138.0-128.8 (Cq_{Pbf}, Ar), 127.9, 124.5 (Ar), 122.6 (C-5 triazole), 116.9 (Ar), 86.2 (CMe₂ Pbf), 79.1 (CMe₃), 75.1 (C-1_{Hex}), 54.2 (CH-2-Arg), 53.3 (CH₂NHCO), 42.4 (Me_{Pbf}), 39.8 (CH₂-5-Arg), 34.3 (CH₂Ar), 31.8 (C-3_{Hex}), 30.1 (ArCH₂Ar), 30.0 (C-2_{Hex}), 29.0 (CH₂-3-Arg), 27.2 (CMe₂ Pbf, CMe₃), 25.8 (C-4_{Hex}), 25.5 (CH₂-4-Arg), 22.5 (C-5_{Hex}), 18.2, 17.0 (Me_{Pbf}), 13.0 (C-6_{Hex}), 11.1 (Me_{Pbf}). ESI-MS: *m/z* 1640.4 [M + 2 Na]²⁺. Anal. calcd for C₁₆₄H₂₄₀N₃₂O₂₈S₄: C 60.87, H 7.48, N 13.85, S 3.96. Found: C 60.80, H 7.43, N 13.89, S 3.82.

5,11,17,23-Tetra-(4-(L-arginine-N-amide)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (42). A solution of **41** (20 mg, 6.18 μmol) in TFA-TIS-H₂O (95:2.5:2.5, 2 mL) was stirred at rt for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was washed with EtOAc (15 mL). Then the solid was dissolved in 0.1 M HCl solution followed by evaporation under reduced pressure to obtain the product as hydrochloride. Yield: 13 mg (99%). [α]_D = +21.4 (c 1.0, MeOH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.21 (bs, 4 H, CH triazole), 6.71 (bs, 8 H, Ar), 5.39 (bs, 8 H, CH₂NHCO amide), 4.75-4.50 (m, 8 H, ArCH₂), 4.44 (d, *J* = 13.2 Hz, ArCH_{ax}Ar), 4.00 (t, *J* = 7.39 Hz, 4 H, CH-2-Arg), 3.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 8 H, CH₂-1_{Hex}), 3.27-3.08 (m, 12 H, CH₂-5-Arg, ArCH_{eq}Ar), 2.08-1.82 (m, 16 H, CH₂-3-Arg, CH₂-4-Arg), 1.78-1.61 (m, 8 H, CH₂-2_{Hex}), 1.53-1.33 (m, 24 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 1.00-0.90 (m, 12 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 170.2 (CO amide), 158.6 (CN guanidine), 158.2, 137.0 (Ar), 136.8 (C-4 triazole), 130.0, 129.8 (Ar), 129.7 (C-5 triazole), 76.6 (C-1_{Hex}), 55.6 (CH-2-Arg), 54.1 (CH₂NHCO), 41.8 (CH-5-Arg), 35.5 (CH₂Ar), 33.3 (C-3_{Hex}), 31.6 (ArCH₂Ar), 31.5 (C-2_{Hex}), 29.6 (CH₂-3-Arg), 27.3 (C-4_{Hex}), 25.4 (CH-4-Arg), 24.0 (C-5_{Hex}), 14.5 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 610.0 [M + 3 H]³⁺, 914.4 [M + 2 H]²⁺, 936.3 [M + 2

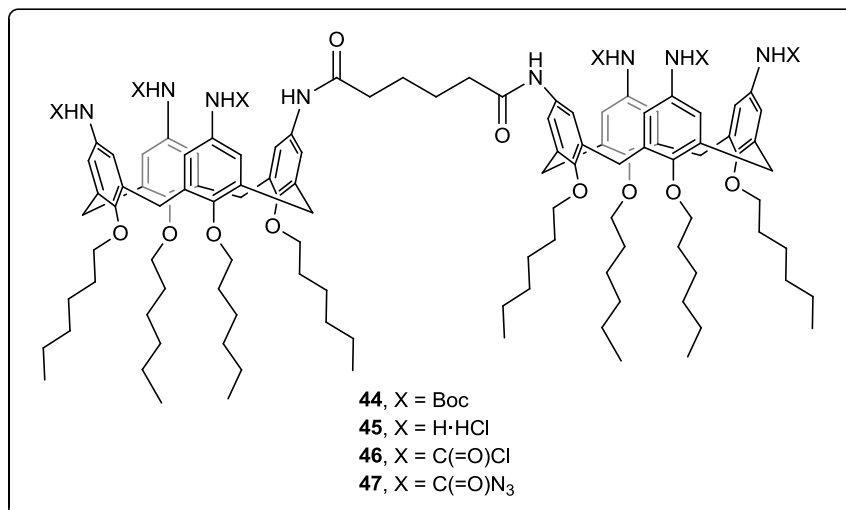
$\text{Na}]^{2+}$, 952.3 $[\text{M} + 2 \text{K}]^{2+}$. Anal. calcd for $\text{C}_{92}\text{H}_{152}\text{Cl}_8\text{N}_{32}\text{O}_8 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$: C 50.45, H 7.36, N 20.47. Found: C 50.48, H 7.34, N 20.51.

Dimeric polycationic amphiphilic calixarenes for gene transfection



5,11,17-Tris-[(*tert*-butoxycarbonyl)-amino]-23-amino-25,26,27,28-tetrakis-(*n*-hexyloxy) calix[4]arene (43). To a solution of 5,11,17,23-tetra-amino-25,26,27,28-tetrakis-(*n*-hexyloxy) calix[4]arene (**158**, 106 mg, 0.13 mmol) in dry DCM (8 mL), a solution of di-*tert*-butyl-dicarbonate (85 mg, 0.39 mmol) in dry DCM (2 mL) was added dropwise and it was stirred at rt, under Ar atmosphere, overnight. Then, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (1:4 \rightarrow 1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 78 mg (54%); $R_f = 0.49$ (1:2 EtOAc-petroleum ether). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.44 (bs, 2 H, NH_2), 7.09 (bs, 3 H, NHBoc), 6.83 (bs, 2 H, Ar), 6.35 (bs, 2 H, Ar), 6.07 (bs, 2 H, Ar), 5.70 (bs, 2 H, Ar), 4.34 (d, $J = 13.9$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_{\text{ax}}\text{Ar}$), 3.97-3.82 (m, 8 H, $\text{CH}_2-1_{\text{Hex}}$), 3.74-3.60 (m, 8 H, $\text{CH}_2-1_{\text{Hex}}$), 3.08 (d, $J = 13.2$ Hz, 2 H, $\text{ArCH}_{\text{eq}}\text{Ar}$), 3.01 (d, $J = 13.2$ Hz, 2 H, $\text{ArCH}_{\text{eq}}\text{Ar}$), 1.90-1.74 (m, 8 H, $\text{CH}_2-2_{\text{Hex}}$), 1.60-1.39 (m, 27 H, CMe_3), 1.38-1.15 (m, 24 H, $\text{CH}_2-3_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2-4_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2-5_{\text{Hex}}$), 0.97-0.84 (m, 12 H, $\text{CH}_3-6_{\text{Hex}}$). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3): δ 154.9-153.1 (CO), 155.1-115.4 (Ar), 80.1, 79.1 (CMe_3), 75.2-74.9 ($\text{C}-1_{\text{Hex}}$), 32.122.8 ($\text{C}-5_{\text{Hex}}$), 14.1, 14.0 (C-

6_{Hex}). ESI-MS: m/z 1143.57 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{67}\text{H}_{100}\text{N}_4\text{O}_{10}$: C 71.75, H 8.99, N 5.00. Found: C 71.83, H 9.10, N 4.77.



Adipic acid bis-[5,11,17-tris[(*tert*-butoxycarbonyl)-amino]-25,26,27,28-tetrakis-(*n*-hexyloxy)calix[4]arene-23 amide] (44). To a solution of **43** (302 mg, 0.27 mmol) in dry DCM (5 mL), DIPEA (111 μL , 0.54 mmol) and a catalytic amount of DMAP (3 mg) were added. Then, adipoyl chloride (19.6 μL , 0.14 mmol) in dry DCM (1 mL) was added. The mixture was stirred at rt, under Ar atmosphere, overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (1:4 \rightarrow 1:1 EtOAc-cyclohexane). Yield: 292 mg (92%); $R_f = 0.15$ (1:2 EtOAc-Hex). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.14 (bs, 2 H, NH), 6.91-6.72 (bs, 6 H, NHBoc), 6.45-6.29 (m, 16 H, Ar), 4.34 (d, $J = 13.9$ Hz, 8 H, $\text{ArCH}_{\text{ax}}\text{Ar}$), 3.95-3.81 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{-}1_{\text{Hex}}$), 3.76-3.62 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{-}1_{\text{Hex}}$), 3.14-2.96 (m, 8 H, $\text{ArCH}_{\text{eq}}\text{Ar}$), 2.27 (bs, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.93-1.74 (m, 16 H, $\text{CH}_2\text{-}2_{\text{Hex}}$), 1.71 (bs, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.56-1.39 (m, 54 H, CMe_3), 1.38-1.15 (m, 48 H, $\text{CH}_2\text{-}3_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-}4_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-}5_{\text{Hex}}$), 0.97-0.78 (m, 24 H, $\text{CH}_3\text{-}6_{\text{Hex}}$). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3): δ 177.2 (CO amide), 153.8-152.6 (CO

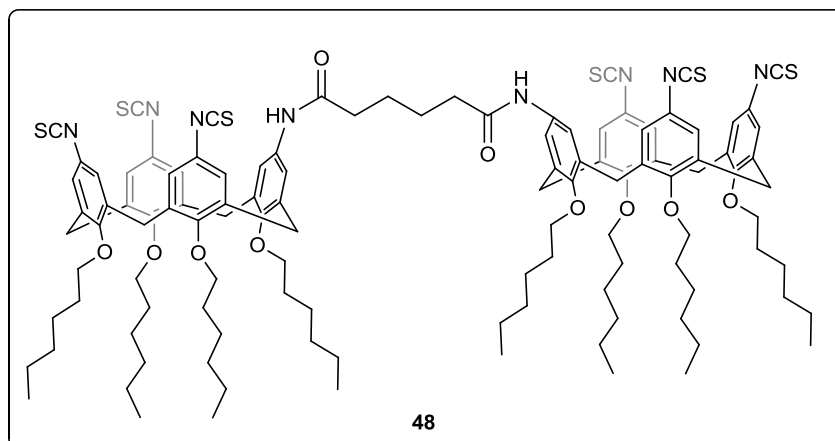
carbamate), 154.3-119.9 (Ar), 80.1 (CMe₃), 75.3-75.2 (C-1_{Hex}), 36.9 (CH₂CH₂CONH), 36.9, 32.2 (C-3_{Hex}), 32.1 (CH₂Ar), 31.3-29.5 (C-2_{Hex}), 28.6 (CMe₃), 26.2-25.9 (C-4_{Hex}), 25.1 (CH₂CH₂CONH), 23.0, 22.9 (C-5_{Hex}), 14.2 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 1199.4 [M + 2 Na]²⁺, 2375.8 [M + Na]⁺. Anal. calcd for C₁₄₀H₂₀₆N₈O₂₂: C 71.46, H 8.82, N 4.76. Found: C 71.68, H 8.84, N 4.53.

Adipic acid bis-[5,11,17-triamino]-25,26,27,28-tetrakis-(n-hexyloxy) calix[4]arene-23 amide (45). A solution of **44** (150 mg, 0.064 mmol) in 1:1 DCM-TFA (15 mL) was stirred overnight at rt. Then, the solvent was removed under reduced pressure. Yield: 156 mg (99%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.16 (bs, 4 H, Ar), 7.00 (bs, 4 H, Ar), 6.52 (bs, 4 H, Ar), 6.45 (bs, 4 H, Ar), 4.49 (t, *J* = 13.4 Hz, 8 H, ArCH_{ax}Ar), 4.49 (t, *J* = 7.06 Hz, 4 H, CH₂-1_{Hex}), 3.99 (t, *J* = 7.06 Hz, 4 H, CH₂-1_{Hex}), 3.84 (m, 8 H, CH₂-1_{Hex}), 3.29 (m, 4 H, ArCH_{eq}Ar), 3.20 (d, *J* = 13.4 Hz, 4 H, ArCH_{eq}Ar), 2.42 (bs, 4 H, CH₂CH₂CONH), 2.06-1.89 (m, 16 H, CH₂-2_{Hex}), 1.77 (bs, 4 H, CH₂CH₂CONH), 1.63-1.26 (m, 48 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 1.03-0.82 (m, 24 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ 174.1 (CO amide), 158.4-122.5 (Ar), 77.0-76.7 (C-1_{Hex}), 37.4 (CH₂CH₂CONH), 33.4, 33.3 (C-3_{Hex}), 31.9, 31.7 (CH₂Ar), 31.6-31.3 (C-2_{Hex}), 27.4-27.0 (C-4_{Hex}), 26.4 (CH₂CH₂CONH), 24.1, 23.9 (C-5_{Hex}), 14.5 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 876.38 [M + 2 H]²⁺, 1752.84 [M + H]⁺. Anal. calcd for C₁₁₀H₁₅₈N₈O₁₀·6TFA: C 60.14, H 6.78, N 4.60. Found: C 60.43, H 6.66, N 4.52.

Adipic acid bis-[5,11,17-trichloroacetamido]-25,26,27,28-tetrakis-(n-hexyloxy) calix[4]arene-23 amide (46). To a solution of **45** (50 mg, 0.029 mmol) and DIPEA (74 μL, 0.42 mmol) in dry DCM (3 mL), 2-chloroacetyl chloride (33 μL, 0.42 mmol) was added. The solution was stirred at rt, under Ar atmosphere, for 3 h. Then, a solution of sat NaHCO₃ (5 mL) was added and it was extracted with DCM. The organic phase was washed with water (5 mL), dried (MgSO₄), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (50:1 → 9:1 DCM-MeOH). Yield: 46 mg (74%); *R_f* =

0.37 (7:1 DCM-MeOH). ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 7.02-6.99 (m, 8 H, Ar), 6.86 (bs, 8 H, Ar), 4.54-4.41 (m, 8 H, $\text{ArCH}_{\text{ax}}\text{Ar}$), 4.26-3.75 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{-1}_{\text{Hex}}$, CH_2Cl), 3.19-3.08 (m, 8 H, $\text{ArCH}_{\text{eq}}\text{Ar}$), 2.39-2.26 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.09-1.86 (m, 16 H, $\text{CH}_2\text{-2}_{\text{Hex}}$), 1.74 (bs, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.58-1.12 (m, 48 H, $\text{CH}_2\text{-3}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-4}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-5}_{\text{Hex}}$), 0.98-0.91 (m, 24 H, $\text{CH}_3\text{-6}_{\text{Hex}}$). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD): δ 175.1 (CO amide), 163.9 (ClCH_2CO amide), 156.2-121.1 (Ar), 77.1-76.5 (C-1_{Hex}), 43.2 (CH_2Cl), 37.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 33.2, 33.3 (C-3_{Hex}), 31.9, 31.7 (CH_2Ar), 31.5-31.3 (C-2_{Hex}), 27.2-27.0 (C-4_{Hex}), 26.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 24.1, 23.6 (C-5_{Hex}), 14.4 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 1104.70 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$. Anal. calcd for $\text{C}_{122}\text{H}_{164}\text{Cl}_6\text{N}_8\text{O}_{16}$: C 66.26, H 7.48, N 5.07. Found: C 66.01, H 7.38, N 5.11.

Adipic acid bis-[5,11,17-triazidoacetamido]-25,26,27,28-tetrakis-(n-hexyloxy) calix[4]arene -23 amide] (47). To a solution of **46** (60 mg, 0.027 mmol) in dry DMF (4 mL), NaN_3 (16 mg, 0.024 mmol) was added. The mixture was stirred at rt, under Ar atmosphere, for 16 h. Then, a solution of sat NaHCO_3 (5 mL) was added and it was extracted with DCM. The organic phase was washed with water (5 mL), dried (MgSO_4), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (50:1 \rightarrow 9:1 DCM-MeOH). Yield: 53 mg (87%). $R_f = 0.47$ (15:1 DCM-MeOH). ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 7.12-7.01 (m, 8 H, Ar), 6.76 (bs, 8 H, Ar), 4.34-4.41 (m, 8 H, $\text{ArCH}_{\text{ax}}\text{Ar}$), 4.16-3.71 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{-1}_{\text{Hex}}$, CH_2N_3), 3.15-3.02 (m, 8 H, $\text{ArCH}_{\text{eq}}\text{Ar}$), 2.49-2.26 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.08-1.86 (m, 16 H, $\text{CH}_2\text{-2}_{\text{Hex}}$), 1.70 (bs, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.40-1.09 (m, 48 H, $\text{CH}_2\text{-3}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-4}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-5}_{\text{Hex}}$), 0.99-0.81 (m, 24 H, $\text{CH}_3\text{-6}_{\text{Hex}}$). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD): δ 175.1 (CO amide), 168.2 ($\text{N}_3\text{CH}_2\text{CO}$ amide), 151.2-120.4 (Ar), 77.5-76.5 (C-1_{Hex}), 51.2 (CH_2N_3), 36.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 33.2, 33.3 (C-3_{Hex}), 30.9, 31.5 (CH_2Ar), 30.5-31.7 (C-2_{Hex}), 28.2-27.0 (C-4_{Hex}), 26.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 24.3, 23.5 (C-5_{Hex}), 14.7 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 2273.57 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{112}\text{H}_{164}\text{N}_{26}\text{O}_{16}$: C 65.10, H 7.34, N 16.18. Found: C 66.21, H 7.38, N 15.98.

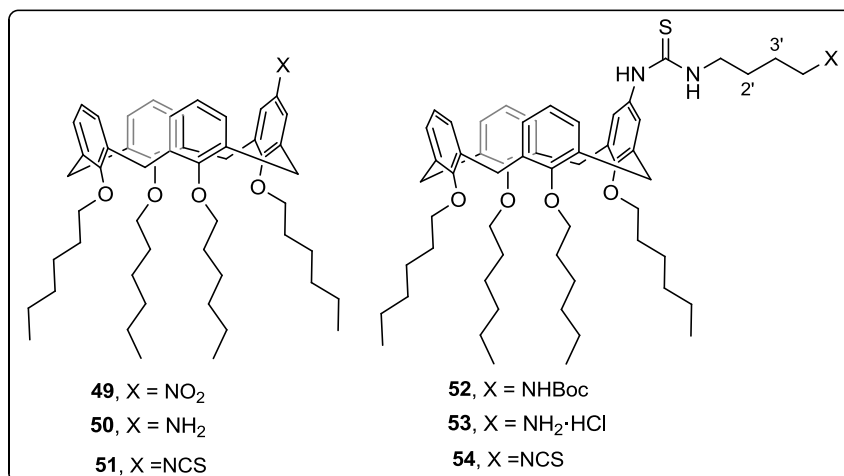


Adipic acid bis-[5,11,17-isothiocyanate]-25,26,27,28-tetrakis-(n-hexyloxy) calix[4]arene -23 amide (48). To a solution of **44** (50 mg, 0.029 mmol) in dry toluene (4 mL), Et₃N (72 μL, 0.513 mmol) and Cl₂CS (43 μL, 0.513 mmol) were added. The solution was stirred at rt, under Ar atmosphere, overnight. Then, the solvent was removed under reduced pressure, water was added (6 mL) and it was extracted with DCM (6 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (2:1 DCM-cyclohexane → DCM). Yield: 52 mg (90%); R_f = 0.37 (1:2 EtOAc-cyclohexane). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.12 (bs, 2 H, NH), 6.77 (bs, 4 H, Ar), 6.60-6.50 (m, 12 H, Ar), 4.38-4.28 (m, 8 H, ArCH_{ax}Ar), 3.89-3.73 (m, 16 H, CH₂-1_{Hex}), 3.11 (d, 4 H, *J* = 13.8 Hz, ArCH_{eq}Ar), 3.06 (d, 4 H, *J* = 13.8 Hz, ArCH_{eq}Ar), 2.43 (bs, 4 H, CH₂CH₂CONH), 1.83-1.64 (m, 20 H, CH₂-2_{Hex}, CH₂CH₂CONH), 1.42-1.07 (m, 48 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 0.98-0.88 (m, 24 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ 171.7 (CO amide), 136.8 (NCS), 155.8-121.1 (Ar), 75.8 (C-1_{Hex}), 37.1 (CH₂CH₂CONH), 32.1 (C-3_{Hex}), 31.0, 30.8 (CH₂Ar), 30.2 (C-2_{Hex}), 26.0-25.9 (C-4_{Hex}), 24.9 (CH₂CH₂CONH), 22.9 (C-5_{Hex}), 14.2 (C-6_{Hex}). ESI-MS:

m/z 1022.1 $[M + 2 Na]^{2+}$, 2027.1 $[M + Na]^+$. Anal. calcd for $C_{116}H_{146}N_8O_{10}S_6$: C 69.49, H 7.34, N 5.59, S 9.60. Found: C 69.53, H 7.45, N 5.37.

Hybrid self-assembling β CD—calix[4]arene systems for the preparation of nanospheres and nanocapsules

Preparation of neutral amphiphilic heterodimers CA_4 — β -CDs



11-Nitro-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (49). To a solution of 25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (**169**, 1 g, 1.32 mmol) in dry DCM (20 mL), glacial AcOH (1.7 mL, 39.60 mmol) was added. Then, 99.5% HNO₃ (356 μ L, 7.92 mmol) was added and the mixture was stirred 40 min at rt. After addition of H₂O (20 mL), the organic layer was separated, washed with sat. NaHCO₃ (20 mL), dried (MgSO₄), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (1:6 \rightarrow 1:2 DCM-cyclohexane). Yield: 811 mg (76%); R_f = 0.29 (1:15 EtOAc-cyclohexane). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.12 (s, 2 H, Ar), 6.94 (t, J = 6.9 Hz, 4 H, Ar), 6.83 (t, J = 7.2 Hz, 2 H, Ar), 6.23 (bs, 3 H, Ar), 4.47 (d, J = 13.6 Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.39 (d, J = 13.6 Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.05-3.84 (m, 6 H, CH₂-1_{Hex}), 3.76 (t, J = 6.9 Hz, 2 H, CH₂-1_{Hex}),

3.21 (d, $J = 11.7$ Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 3.16 (d, $J = 11.7$ Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 1.95-1.82 (m, 8 H, CH₂-2_{Hex}), 1.55-1.27 (m, 24 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 0.99-0.83 (m, 12 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 161.4-121.7 (Ar), 75.5, 75.2 (C-1_{Hex}), 32.1, 31.9 (C-2_{Hex}), 31.1, 30.9 (ArCH₂Ar), 30.4, 30.3 (C-3_{Hex}), 26.1, 26.0 (C-4_{Hex}), 22.9, 22.8 (C-5_{Hex}), 14.1, 14.2 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 828.5 [M + Na]⁺, 844.4 [M + K]⁺. Anal. calcd for C₅₂H₇₁NO₆: C 77.48, H 8.88, N 1.74. Found: C 77.57, H 9.03, N 1.65.

11-Amino-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (50). To a solution of **49** (429 mg, 0.53 mmol) in EtOH (20 mL), hydrazine monohydrate (518 μ L, 10.6 mmol) and Pd/C (43 mg, 10% w/w) were added. The mixture was refluxed for 6 h, the catalyst was filtrated off and the solvent was removed under reduced pressure. Yield: 381 mg (93%); $R_f = 0.41$ (DCM). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.68-6.53 (m, 9 H, Ar), 5.95 (s, 2 H, NH₂), 4.46 (d, $J = 13.2$ Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.37 (d, $J = 13.2$ Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 3.90-3.84 (m, 6 H, CH₂-1_{Hex}), 3.79 (m, 2 H, CH₂-1_{Hex}), 3.15 (d, $J = 13.2$ Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 3.03 (d, $J = 13.2$ Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 1.98-1.81 (m, 8 H, CH₂-2_{Hex}), 1.46-1.28 (m, 24 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 0.98-0.85 (m, 12 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 156.8-121.6 (Ar), 75.3, 75.2 (C-1_{Hex}), 32.1 (C-2_{Hex}), 31.1, 31.0 (ArCH₂Ar), 30.3 (C-3_{Hex}), 25.9 (C-4_{Hex}), 22.9 (C-5_{Hex}), 14.2 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 798.6 [M + Na]⁺, 814.5 [M + K]⁺. Anal. calcd for C₅₂H₇₃NO₄: C 80.47, H 9.48, N 1.80. Found: C 80.55, H 9.40, N 1.71.

11-Isothiocyanato-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (51). To a solution of **50** (382 mg, 0.49 mmol) in dry toluene (30 mL), Et₃N (412 μ L, 2.95 mmol) and Cl₂CS (113 μ L, 1.47 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 5 h at rt. Then, the solvent was removed under reduced pressure, DCM was added (15 mL) and the organic layer was washed with H₂O (15 mL), dried (MgSO₄), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (1:3 DCM-cyclohexane). Yield: 362 mg (90%); $R_f = 0.67$ (1:3 DCM-cyclohexane). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.93 (dd, J_1

= 7.5 Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, 2 H, Ar), 6.87 (dd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, 2 H, Ar), 6.81 (t, $J = 7.2$ Hz, 2 H, Ar), 6.49 (t, $J = 7.2$ Hz, 1 H, Ar), 6.32 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H, Ar), 6.12 (s, 2 H, Ar), 4.44 (d, $J = 12.7$ Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.40 (d, $J = 12.7$ Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.05-3.85 (m, 4 H, CH_{2-1Hex}), 3.80-3.73 (m, 4 H, CH_{2-1Hex}), 3.17 (d, $J = 13.7$ Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 3.09 (d, $J = 13.7$ Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 1.97-1.79 (m, 8 H, CH_{2-2Hex}), 1.60-1.13 (m, 24 H, CH_{2-3Hex}, CH_{2-4Hex}, CH_{2-5Hex}), 0.99-0.76 (m, 12 H, CH_{3-6Hex}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 157.2-133.9 (Ar), 131.1 (CS), 129.0-121.8 (Ar), 75.2, 75.1, 75.0 (C-1_{Hex}), 32.0, 31.9, 31.8 (C-2_{Hex}), 30.9, 30.8 (ArCH₂Ar), 30.3, 30.2, 30.0 (C-3_{Hex}), 26.0, 25.9, 25.6 (C-4_{Hex}), 22.8, 22.7, 22.6 (C-5_{Hex}), 14.0, 13.9 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 840.5 [M + Na]⁺, 856.5 [M + K]⁺. Anal. calcd for C₅₃H₇₁NO₄S: C 77.80, H 8.75, N 1.71, S 3.92. Found: C 77.86, H 8.66, N 1.50, S 3.68.

11-[N'-(4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)butyl)thioureido]-25,26,27,28-

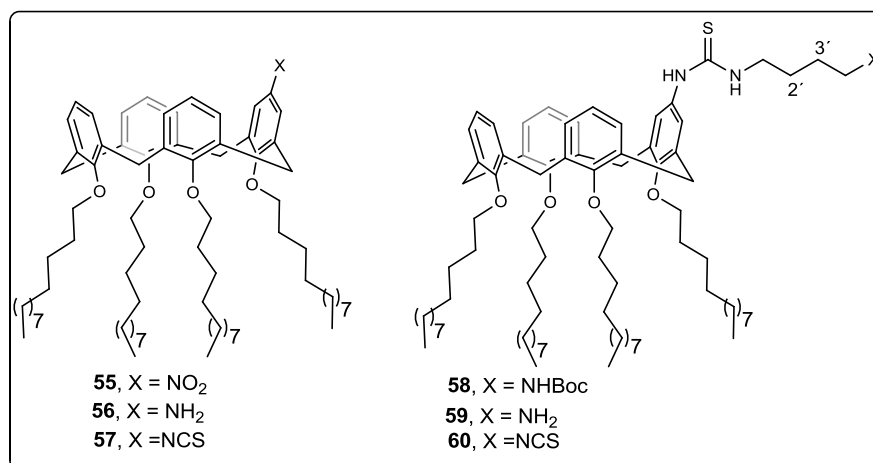
tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (52). To a solution of **51** (335 mg, 0.41 mmol) in dry DCM (5 mL), Et₃N (228 μ L, 1.64 mmol) and a solution of commercial *N'*-[4-(*tert*-butoxycarbonylamino)]butylamine (154 mg, 0.82 mmol) in dry DCM (2 mL) was added. The mixture was stirred overnight at rt under Ar atmosphere. The solvent was eliminated under vacuum and the residue was purified by column chromatography (1:5 \rightarrow 1:3 EtOAc-cyclohexane). Yield: 411 mg (99%). $R_f = 0.27$ (1:3 EtOAc-cyclohexane). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 6.99-6.70 (M, 4 H, Ar), 6.83-6.76 (m, 2 H, Ar), 6.37 (bs, 3 H, Ar), 6.22 (bs, 2 H, Ar), 4.49 (d, $J = 13.2$ Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.48 (d, $J = 13.2$ Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.07-3.95 (m, 4 H, CH_{2-1Hex}), 3.83-3.75 (m, 4 H, CH_{2-1Hex}), 3.44 (t, $J = 6.7$ Hz, 2 H, CH₂NHCS), 3.19 (d, $J = 13.2$ Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 3.17 (d, $J = 13.3$ Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 3.08 (t, $J = 6.5$ Hz, 2 H, CH₂NHBoc), 2.03-1.88 (m, 8 H, CH_{2-2Hex}), 1.63-1.31 (m, 37 H, CH_{2-3Hex}, CH_{2-4Hex}, CH_{2-5Hex}, CH₂CH₂CH₂NHCS, CMe₃), 0.98-0.88 (m, 12 H, CH_{3-6Hex}). ¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD) δ 180.8 (CS), 158.5 (CO), 158.4-122.8 (Ar), 76.6 (CMe₃), 76.4, 76.3 (C-1_{Hex}), 45.4 (CH₂NHCS), 41.1 (CH₂NHBoc), 33.5, 33.3 (C-3_{Hex}), 31.9, 31.8 (C-2_{Hex}), 31.7 (ArCH₂Ar), 31.4 (C-2_{Hex}), 28.8 (CMe₃), 28.3

(CH₂CH₂NHCS), 27.6, 27.5 (C-4_{Hex}), 27.2 (CH₂CH₂CH₂NHCS), 24.0, 23.9 (C-5_{Hex}), 14.6, 14.5 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 1028.7 [M +Na]⁺, 1044.6 [M +K]⁺. Anal. calcd for C₆₂H₉₁N₃O₆S: C 73.99, H 9.11, N 4.18, S 3.19. Found: C 74.05, H 9.20, N 4.09, S 2.98.

11-[N'-(4-(Amino)butyl)thioureido]-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (53). A solution of **52** (342 mg, 0.34 mmol) in TFA-DCM (1:10, 5 mL) was stirred at rt for 1 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and coevaporated several times with water. The residue was dissolved in 0.1 M HCl solution and freeze-dried to obtain **9** as the corresponding hydrochloride salt. Yield: 320 mg (99%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 6.90 (t, *J* = 7.6 Hz, 4 H, Ar), 6.74 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, Ar), 6.38 (s, 3 H, Ar), 6.24 (s, 2 H, Ar), 4.46 (d, *J* = 13.1 Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.45 (d, *J* = 13.1 Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.09-3.92 (m, 4 H, CH₂-1_{Hex}), 3.87-3.73 (m, 4 H, CH₂-1_{Hex}), 3.52 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H, CH₂NHCS), 3.15 (d, *J* = 13.3 Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 3.14 (d, *J* = 13.3 Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 3.01 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H, CH₂NH₂), 2.05-1.84 (m, 8 H, CH₂-2_{Hex}), 1.63-1.50 (m, 4 H, CH₂CH₂CH₂NHCS), 1.48-1.30 (m, 24 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 1.03-0.88 (m, 12 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 181.2 (CS), 158.4-122.8 (Ar), 76.5, 76.3 (CH₂-1_{Hex}), 44.5 (CH₂NHCS), 40.4 (CH₂NH₂), 33.5, 33.3 (C-3_{Hex}), 31.9 (C-2_{Hex}), 31.7 (ArCH₂Ar), 31.4 (C-2_{Hex}), 27.5 (CH₂CH₂NHCS), 27.3, 27.2 (C-4_{Hex}), 25.6 (CH₂CH₂CH₂NHCS), 24.1, 24.0 (C-5_{Hex}), 14.5 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 906.7 [M + H]⁺. Anal. calcd for C₅₇H₈₄ClN₃O₄S: C 72.61, H 8.98, N 4.46, S 3.40. Found: C 72.54, H 9.00, N 4.26, S 3.19.

11-[N'-(4-(Isothiocyanato)butyl)thioureido]-25,26,27,28-tetrakis(*n*-hexyloxy)calix[4]arene (54). To a solution of **53** (364 mg, 0.40 mmol) in absolute EtOH (10 mL), CS₂ (242 μL, 4.02 mmol) and Et₃N (168 μL, 1.22 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 2 h at rt and then cooled on an ice bath. A solution of Boc₂O (83.3 mg, 0.38 mmol) in absolute EtOH (3 mL) was added followed by the immediate addition of a catalytic amount of DMAP (1 mg, 8 μmol). The reaction mixture

was kept in an ice bath for 15 min, and then it was allowed to reach rt and stirred for further 2 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (1:3 \rightarrow 1:1 DCM-cyclohexane). Yield: 381 mg (99%); $R_f = 0.37$ (DCM). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.09 (d, $J = 6.6$ Hz, 2 H, Ar), 7.00 (d, $J = 6.6$ Hz, 2 H, Ar), 6.92-6.89 (m, 3 H, Ar, NH), 6.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 1 H, Ar), 6.22 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H, Ar), 5.95 (s, 2 H, Ar), 5.43 (bt, 1 H, NH), 4.44 (d, $J = 13.3$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_{\text{ax}}\text{Ar}$), 4.12-3.95 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-1}_{\text{Hex}}$), 3.78-3.69 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-1}_{\text{Hex}}$), 3.61 (t, $J = 6.2$ Hz, 2 H, CH_2NCS), 3.53 (q, $J = 6.6$ Hz, 2 H, CH_2NHCS), 3.17 (d, $J = 13.3$ Hz, 2 H, $\text{ArCH}_{\text{eq}}\text{Ar}$), 3.11 (d, $J = 13.3$ Hz, 2 H, $\text{ArCH}_{\text{eq}}\text{Ar}$), 1.98-1.81 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{-2}_{\text{Hex}}$), 1.75-1.68 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-3}'$), 1.66-1.60 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-2}'$), 1.58-1.45 (m, 6 H, $\text{CH}_2\text{-3}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-4}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-5}_{\text{Hex}}$), 1.42-1.19 (m, 18 H, $\text{CH}_2\text{-3}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-4}_{\text{Hex}}$, $\text{CH}_2\text{-5}_{\text{Hex}}$), 0.98-0.84 (m, 12 H, $\text{CH}_3\text{-6}_{\text{Hex}}$). $^{13}\text{C NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3) δ 180.0 (HNCS), 157.5-133.7 (Ar), 129.3 (NCS), 129.2-121.3 (Ar), 75.6, 75.5, 75.1 ($\text{CH}_2\text{-1}_{\text{Hex}}$), 44.8 (CH_2NCS), 44.1 (CH_2NHCS), 32.2, 32.0, 31.9 (C-3_{Hex}), 31.1, 31.0 (ArCH_2Ar), 30.5, 30.4, 30.0 (C-2_{Hex}), 27.2 ($\text{CH}_2\text{-3}'$), 26.4 ($\text{CH}_2\text{-2}'$), 26.2, 26.1, 25.7 (C-4_{Hex}), 22.9, 22.7 (C-5_{Hex}), 14.1, 14.0 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 970.4 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 986.5 [$\text{M} + \text{K}$] $^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{58}\text{H}_{81}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$: C 73.45, H 8.61, N 4.43, S 6.76. Found: C 73.13, H 8.87, N 4.13, S 6.44.



11-Nitro-25,26,27,28-tetrakis(*n*-dodecyloxy)calix[4]arene (55). To a solution of 25,26,27,28-tetrakis(*n*-docecyloxy)calix[4]arene (**170**, 1.24 g, 1.13 mmol) in dry DCM (24 mL), glacial AcOH (1.36 mL, 33.9 mmol) was added. Then, 99.5% HNO₃ (305 μL, 6.78 mmol) was added. The mixture was stirred 30 min at rt. Then, H₂O was added (24 mL) and the organic layer was separated, washed with sat. NaHCO₃ (24 mL), dried (MgSO₄), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (1:6 → 1:2 DCM-Hex). Yield: 968 mg (75%); R_f = 0.52 (1:15 EtOAc-Hex). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.12 (s, 2 H, Ar), 6.93 (t, *J* = 6.8 Hz, 3 H, Ar), 6.82 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H, Ar), 6.22 (bs, 3 H, Ar), 4.46 (d, *J* = 13.4 Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.41 (d, *J* = 13.4 Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.03-3.83 (m, 6 H, CH₂-1_{Dod}), 3.74 (t, *J* = 6.8 Hz, 2 H, CH₂-1_{Dod}), 3.19 (d, *J* = 11.9 Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 3.15 (d, *J* = 11.9 Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 1.92-1.83 (m, 8 H, CH₂-2_{Dod}), 1.58-1.08 (m, 74 H, CH₂-3_{Dod}, CH₂-4_{Dod}, CH₂-5_{Dod}, CH₂-6_{Dod}, CH₂-7_{Dod}, CH₂-8_{Dod}, CH₂-9_{Dod}, CH₂-10_{Dod}, CH₂-11_{Dod}), 0.89-0.85 (m, 10 H, CH₃-12_{Dod}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 161.5-21.7 (Ar), 75.5, 75.2, 75.1 (C-1_{Dod}), 32.0, 31.1, 31.0, 30.5-29.5 (ArCH₂Ar and C-2 to C-9_{Dod}) 26.6, 26.4, 26.1 (C-10_{Dod}), 22.7 (C-11_{Dod}), 14.1 (C-12_{Dod}). ESI-MS: *m/z* 1164.67 [M + Na]⁺. Anal. calcd for C₇₆H₁₁₉NO₆: C 79.88, H 10.50, N 1.23. Found: C 80.11, H 10.64, N 1.32.

11-Amino-25,26,27,28-tetrakis(*n*-dodecyloxy)calix[4]arene (56). To a solution of **55** (112 mg, 0.098 mmol) in EtOH (14 mL), hydrazine monohydrate (95 μL, 1.96 mmol) and Pd/C (12 mg, 10% w/w) were added. The mixture was refluxed overnight. The catalyst was filtrated and the solvent was removed under reduced pressure. Yield: 105 mg (97%); R_f = 0.38 (DCM). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.66-6.54 (m, 9 H, Ar), 5.97-5.92 (M, 2 H, Ar), 4.47 (d, *J* = 12.8 Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.39 (d, *J* = 12.8 Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 3.98-3.76 (m, 8 H, CH₂-1_{Dodec}), 3.16 (d, *J* = 13.2 Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 3.04 (d, *J* = 13.2 Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 2.01-1.83 (m, 8 H, CH₂-2_{Dod}), 1.56-1.83 (m, 72 H, CH₂-3_{Dod}, CH₂-4_{Dod}, CH₂-5_{Dod}, CH₂-6_{Dod}, CH₂-7_{Dod}, CH₂-8_{Dod}, CH₂-9_{Dod}, CH₂-10_{Dod}, CH₂-11_{Dodec}),

0.97-0.81 (m, 12 H, CH₃-12_{Dodec}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 156.7-113.1 (Ar), 75.3 (C-1_{Dod}), 32.1, 31.3, 31.2, 30.4-29.5 (ArCH₂Ar and C-2 to C-9_{Dod}), 26.5 (C-10_{Dod}), 22.8 (C-11_{Dod}), 14.2 (C-12_{Dod}). ESI-MS: *m/z* 1112.73 [M + H]⁺, 1134.56 [M + Na]⁺. Anal. calcd for C₇₆H₁₂₁NO₄: C 82.03, H 10.96, N 1.26. Found: C 82.18, H 11.10, N 1.13.

11-Isothiocyanato-25,26,27,28-tetrakis(*n*-dodecyloxy)calix[4]arene (57). To a solution of **56** (215 mg, 0.19 mmol) in dry toluene (10 mL), Et₃N (161 μL, 1.16 mmol) was added. Then, Cl₂CS (44 μL, 0.58 mmol) was added and the mixture was stirred at rt, under N₂, overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in DCM (15 mL), washed with H₂O (15 mL) and the organic phase was dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (1:3 DCM-Hex). Yield: 201 mg (92%); R_f = 0.63 (1:3 DCM-Hex). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.95 (d, *J* = 7.2 Hz, 2 H, Ar), 6.88 (d, *J* = 6.4 Hz, 2 H, Ar), 6.82 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H, Ar), 6.51 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H, Ar), 6.34 (d, *J* = 7.6 Hz, 2 H, Ar), 6.13 (s, 2 H, Ar), 4.46 (d, *J* = 12.4 Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.42 (d, *J* = 12.4 Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.03-3.89 (m, 4 H, CH₂-1_{Dod}), 3.80-3.76 (m, 4 H, CH₂-1_{Dod}), 3.18 (d, *J* = 13.6 Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 3.10 (d, *J* = 13.6 Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 1.93-1.84 (m, 8 H, CH₂-2_{Dod}), 1.59-1.20 (m, 72 H, CH₂-3_{Dod}, CH₂-4_{Dod}, CH₂-5_{Dod}, CH₂-6_{Dod}, CH₂-7_{Dod}, CH₂-8_{Dod}, CH₂-9_{Dod}, CH₂-10_{Dod}, CH₂-11_{Dod}), 0.91 (t, *J* = 6.6 Hz, 12 H, CH₃-12_{Dodec}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 157.3-155.4 (Ar), 136.6 (NCS), 136.1-122.0 (Ar), 75.3, 75.2 (C-1_{Dod}), 32.0, 31.0, 30.9, 30.5-29.5 (ArCH₂Ar and C-2 to C-9_{Dod}), 26.6, 26.5, 26.1 (C-10_{Dod}), 22.8 (C-11_{Dod}), 14.2 (C-12_{Dod}). ESI-MS: *m/z* 1176.50 [M + Na]⁺, 1193.46 [M + K]⁺. Anal. calcd for C₇₇H₁₁₉NO₄S: C 80.08, H 10.39, N 1.21, S 2.78. Found: C 80.24, H 10.60, N 1.30, S 2.56.

11-[N²-(4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)butyl)thioureido]-25,26,27,28-tetrakis(*n*-dodecyloxy)calix[4]arene (58). To a solution of **57** (160 mg, 0.14 mmol) in dry DCM (6 mL), Et₃N (77 μL, 0.56 mmol) was added. Then, a solution of commercial

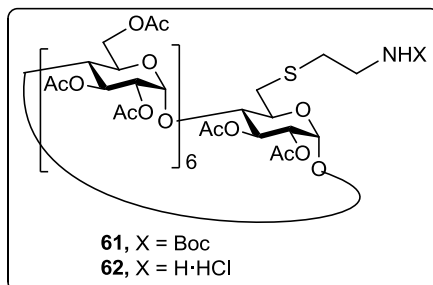
N'-[4-(*tert*-butoxycarbonylamino)]butylamine (52 mg, 0.28 mmol) in dry DCM (2 mL) was added. The mixture was stirred overnight at rt, under N₂ atmosphere. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (1:3 → 1:1 EtOAc-Hex). Yield: 188 mg (99%); *R*_f = 0.32 (1:3 EtOAc-Hex). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.07 (d, *J* = 7.6 Hz, 2 H, Ar), 6.97 (d, *J* = 7.2 Hz, 2 H, Ar), 6.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H, Ar), 6.30 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H, NH), 6.20 (d, *J* = 7.6 Hz, 2 H, Ar), 5.94 (s, 2 H, Ar), 5.43 (m, 1 H, NH), 4.64 (m, 1 H, NH), 4.42 (d, *J* = 13.2 Hz, 4 H, ArCH_{ax}Ar), 4.08-3.95 (m, 4 H, CH₂-1_{Dod}), 3.73-3.68 (m, 4 H, CH₂-1_{Dod}), 3.52-3.45 (m, 2 H, CH₂NHCS), 3.16 (d, *J* = 13.5 Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 3.10 (d, *J* = 13.5 Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 1.94-1.85 (m, 8 H, CH₂-2_{Dod}), 1.57-1.19 (m, 85 H, CH₂CH₂CH₂NHBoc, CMe₃, CH₂-3_{Dod}, CH₂-4_{Dod}, CH₂-5_{Dod}, CH₂-6_{Dod}, CH₂-7_{Dod}, CH₂-8_{Dod}, CH₂-9_{Dod}, CH₂-10_{Dod}, CH₂-11_{Dod}), 0.93-0.84 (m, 12 H, CH₃-12_{Dod}). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 179.7 (CS), 157.5 (CO), 156.0-121.4 (Ar), 79.1 (CMe₃), 75.6, 75.4, 75.1 (C-1_{Dod}), 44.8 (NHCSCH₂), 40.1 (CH₂NHBoc), 32.0 (C-4_{Dod}), 31.1, 31.0 (ArCH₂Ar), 31.9-29.4 (C-3_{Dod}, C-4_{Dod}, C-5_{Dod}, C-6_{Dod}, C-7_{Dod}), 29.8 (CMe₃), 28.5-26.5 (C-9_{Dod}, C-10_{Dod}), 26.4 (CSNHCH₂CH₂), 26.2 (NHCH₂CH₂CH₂), 26.1 (C-10_{Dod}), 22.7 (C-11_{Dod}), 14.1 (C-12_{Dod}). ESI-MS: *m/z* 1344.19 [M + H]⁺, 1366.04 [M + Na]⁺. Anal. calcd for C₈₆H₁₃₉N₃O₆S: C 76.91, H 10.43, N 3.13, S 2.39. Found: C 76.78, H 10.39, N 2.99, S 2.58.

11-[*N'*-(4-(Aminobutyl)thioureido)-25,26,27,28-tetrakis(*n*-dodecyloxy)calix[4]arene (59). To a solution of **59** (140 mg, 0.10 mmol) TFA-DCM (1:1, 5 mL) was stirred for 1 h at rt. The solvent was evaporated under reduced pressure and coevaporated several times with H₂O to give **16** as the corresponding trifluoroacetate salt. Yield: 134 mg (99%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.86 (m, 3 H, NH), 7.07 (d, *J* = 7.2 Hz, 2 H, Ar), 7.00 (d, *J* = 7.2 Hz, 2 H, Ar), 6.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 2 H, Ar), 6.21 (s, 3 H, Ar), 6.01 (s, 2 H, Ar), 5.46 (m, 1 H, NH), 4.46 (d, *J* = 12.3 Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.43 (d, *J* = 13.3 Hz, 2 H, ArCH_{ax}Ar), 4.09-3.99 (m, 4 H, CH₂-1_{Dod}), 3.71 (bs, 4 H, CH₂-1_{Dod}), 3.53-3.43 (m, 2 H, CH₂NHCS), 3.17 (d, *J* = 13.3 Hz, 2 H, ArCH_{eq}Ar), 3.12 (d, *J* = 13.3 Hz, 2

H, ArCH_{eq}Ar), 1.99-1.83 (m, 8 H, CH₂-2_{Dod}), 1.71 (m, 2 H, CH₂CH₂CH₂NH₂), 1.60-1.20 (m, 74 H, CH₂CH₂CH₂NH₂, CH₂-3_{Dod}, CH₂-4_{Dod}, CH₂-5_{Dod}, CH₂-6_{Dod}, CH₂-7_{Dod}, CH₂-8_{Dod}, CH₂-9_{Dod}, CH₂-10_{Dod}, CH₂-11_{Dod}), 0.88-0.87 (m, 12 H, CH₃-12_{Dod}). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 179.0 (CS), 162.1-121.4 (Ar), 75.7, 75.5, 75.2 (C-1_{Dod}), 43.6 (NHCSCH₂), 39.5 (CH₂NH₂), 32.0, 31.0, 30.6, 30.2-29.4 (ArCH₂Ar and C-2 to C-9_{Dod}), 26.6, 26.1 (C-10_{Dod}), 25.9 (CSNHCH₂CH₂), 23.9 (CSNHCH₂CH₂CH₂), 22.7 (C-11_{Dod}), 14.1 (C-12_{Dod}). ESI-MS: *m/z* 1243.06 [M + H]⁺, 1265.02 [M + Na]⁺, 1280.93 [M + K]⁺. Anal. calcd for C₈₃H₁₃₂F₃N₃O₆S: C 73.46, H 9.80, N 3.10, S 2.36. Found: C 73.32, H 9.67, N 2.96, S 2.09.

11-[N'-(4-(Isothiocyanatobutyl)thioureido)-25,26,27,28-tetrakis(*n*-dodecyloxy)calix[4]arene (60). To a solution of **59** (134 mg, 0.108 mmol) in absolute EtOH (8 mL), CS₂ (390 μL, 6.48 mmol) and Et₃N (451 μL, 3.24 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 1 h at rt and then cooled on an ice bath. A solution of Boc₂O (22.3 mg, 0.103 mmol) in absolute EtOH (6 mL) was added followed by the immediate addition of a catalytic amount of DMAP (0.3 mg, 3 μmol). The reaction mixture was kept in the ice bath for 30 min. Then it was allowed to reach rt and stirred for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (5:1 DCM-Hex → DCM). Yield: 128 mg (93%); R_f = 0.47 (DCM). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.09 (d, *J* = 6.4 Hz, 2 H, Ar), 7.00 (d, *J* = 6.4 Hz, 2 H, Ar), 6.94-6.88 (m, 3 H, Ar), 6.29 (t, *J* = 8.0, 1 H, NH), 6.21 (d, *J* = 7.2 Hz, 2 H, Ar), 5.94 (s, 2 H, Ar), 5.41 (t, *J* = 5.6, 1 H, NH), 4.43 (d, *J* = 13.2 Hz, 4 H, ArCH_{ax}Ar), 4.09-3.96 (m, 4 H, CH₂-1_{Dod}), 3.74-3.69 (m, 4 H, CH₂-1_{Dod}), 3.60 (t, *J* = 6.4 Hz, 2 H, CH₂NCS), 3.54 (q, *J* = 6.4 Hz, 2 H, CH₂NHCS), 3.16 (d, 2 H, *J* = 13.2 Hz, ArCH_{eq}Ar), 3.11 (d, 2 H, *J* = 13.2 Hz, ArCH_{eq}Ar), 1.95-1.83 (m, 8 H, CH₂-2_{Dod}), 1.72-1.65 (m, 4 H, CH₂-2', CH₂-3'), 1.60-1.20 (m, 72 H, CH₂-3_{Dod}, CH₂-4_{Dod}, CH₂-5_{Dod}, CH₂-6_{Dod}, CH₂-7_{Dod}, CH₂-8_{Dod}, CH₂-9_{Dod}, CH₂-10_{Dod}, CH₂-11_{Dod}), 0.89-0.85 (m, 12 H, CH₃-12_{Dod}). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 180.1 (CS), 157.7 (NCS), 155.9-121.5 (Ar), 75.8, 75.7, 75.3 (C-1_{Dod}), 45.0 (NHCSCH₂), 44.3 (CH₂NCS), 32.2, 32.2, 31.3, 31.2-29.6 (ArCH₂Ar and C-2 to C-9_{Dod}),

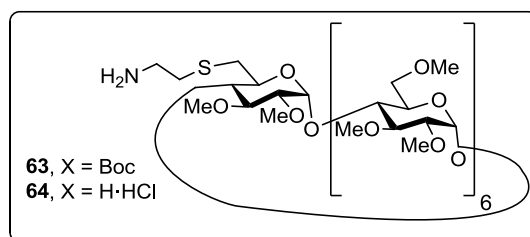
26.7 (CH₂-2'), 26.6 (CH₂-3'), 26.3 (C-10_{Dod}), 22.9 (C-11_{Dod}), 14.3 (C-12_{Dod}). ESI-MS: *m/z* 1307.12 [M + Na]⁺, 1323.08 [M + K]⁺. Anal. calcd for C₈₂H₁₂₉N₃O₄S₂: C 76.64, H 10.12, N 3.27, S 4.99. Found: C 76.29, H 9.93, N 3.33, S 5.11.



6^I-[2-*tert*-butoxycarbonylaminoethylthio]-6^I-desoxy-6^{II-VII}-hexa-*O*-acetyl-heptakis-(2,3-di-*O*-acetyl)cyclomaltoheptaose (61). To a solution of 6^I-[2-*tert*-butoxycarbonylaminoethylthio]-6^I-desoxy-cyclomaltoheptaose (175 mg, 0.14 mmol) in dry pyridine (6 mL) at 0 °C, DMAP (650 mg, 5.40 mmol) and Ac₂O was added. It was stirred overnight at rt. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was solved in DCM (10 mL), washed with 2N H₂SO₄, saturated NaHCO₃ (10 mL) and water. The organic layer was dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (50:1 → 9:1 DCM-MeOH). Yield: 148 mg (75%); R_f = 0.33 (15:1 DCM-MeOH); [α]_D = +133.9 (*c* 0.7 in MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5.33-5.18 (m, 7 H, H-3^{I-VII}), 5.13-5.04 (m, 6 H, H-1^{II-VII}), 5.02 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 3.8 Hz, H-1^I), 4.83-4.72 (m, 7 H, H-2^{I-VII}), 4.63-4.41 (m, 6 H, H-6a^{II-VII}), 4.34-4.21 (m, 6 H, H-6b^{II-VII}), 4.19-4.04 (m, 7 H, H-5^{I-VII}), 3.85 (t, 1 H, *J*_{3,4} = 8.7 Hz, H-4^I), 3.75-3.63 (m, 6 H, H-4^{II-VII}), 3.32-3.23 (m, 2 H, CH₂NH), 3.09 (d, 1 H, *J*_{6a,6b} = 14.3 Hz, H-6a^I), 2.98 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 4.3 Hz, H-6b^I), 2.77-2.61 (m, 2 H, CH₂S), 2.15-1.98 (m, 60 H, (COMe), 1.41 (CMe₃). ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ 170.9-169.4 (CO ester), 155.9 (CO carbamate), 96.9-96.7 (C-1^{I-VII}), 79.2-76.4 (C-4^{I-VII}), 71.6-69.5 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}, C-5^{I-VII}, CMe₃), 62.8-62.5 (C-6^{II-VII}), 39.8 (CH₂N), 33.6 (CH₂S), 32.4 (C-6^I), 28.4 (CMe₃), 19.5 (COMe). ESI-

MS: m/z 1090.3 $[M + 2 Na]^{2+}$, 2156.7 $[M + Na]^+$. Anal. calcd. for $C_{89}H_{123}NO_{56}S_2$: C 50.07, H 5.81, N 0.66, S 1.50. Found: C 49.82, H 5.75, N 0.43, S 1.16.

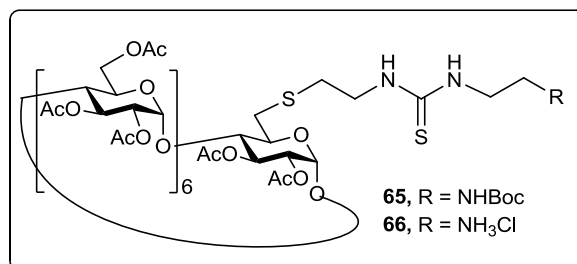
6^I-[2-Aminoethylthio]-6^I-desoxy-6^{II-VII}-hexa-*O*-acetyl-heptakis-(2,3-di-*O*-acetyl)cyclomaltoheptaose (62). A solution of **61** (1.07 g, 0.50 mmol) in 1:1 DCM-TFA (12 mL) was stirred at rt for 1 h. Yield: 969 mg (90%); $R_f = 0.51$ (9:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_D = +150.4$ (c 1 in MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 313 K): δ 5.37-5.27 (m, 7 H, H-3^{I-VII}), 5.13-5.03 (m, 7 H, H-1^{I-VII}), 4.82-4.74 (m, 7 H, H-2^{I-VII}), 4.65-4.37 (m, 6 H, H-6a^{II-VII}), 4.32-4.06 (m, 6 H, H-6b^{II-VII}, H-5^{I-VII}), 3.08-3.69 (m, 7 H, H-4^{I-VII}), 3.38-3.31 (m, 2 H, CH₂NH), 3.24 (d, 1 H, $J_{6a,6b} = 14.0$ Hz, H-6a^I), 3.13-3.08 (m, 1 H, H-6b^I), 2.95-2.83 (m, 2 H, CH₂S), 2.32-1.88 (m, 60 H, (COMe). ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ 172.0-169.9 (CO_{ester}), 97.3-96.7 (C-1^{I-VII}), 79.0 (C-4^I), 76.1 (C-4^{II-VII}), 71.5-69.3 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}, C-5^{I-VII}), 63.1-62.4 (C-6^{II-VII}), 39.2 (CH₂N), 32.7 (C-6^I), 30.7 (CH₂S), 20.7 (COMe). ESI-MS: m/z 1029.5 [M + Na + H]²⁺, 2056.9 [M + Na]⁺. Anal. calcd. for C₈₆H₁₁₆F₃NO₅₆S: C 48.07, H 5.44, N 0.65, S 1.49. Found: C 49.37, H 5.49, N 0.55, S 1.18.



6^I-[2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)ethylthio]-6^I-desoxy-6^{II-VII}-hexa-*O*-methyl-heptakis-(2,3-di-*O*-methyl)-cyclomaltoheptaose (63). To a suspension of 6^{II-VII}-hexa-*O*-methyl-6^I-*p*-toluensulfonyl-heptakis-(2,3-di-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose (**173**, 534 mg, 0.34 mmol) and Cs₂CO₃ (142 mg, 0.44 mmol) in dry DMF (6 mL), *tert*-butyl *N*-(2-mercaptoethyl)carbamate (75 μ L, 0.44 mmol) was added. The suspension was heated, under Ar atmosphere, at 70 °C for 24 h. Solvents were evaporated and DCM (15 mL) was added. The organic phase was washed with water (2 x 10 mL), and dried (Na₂SO₄). The

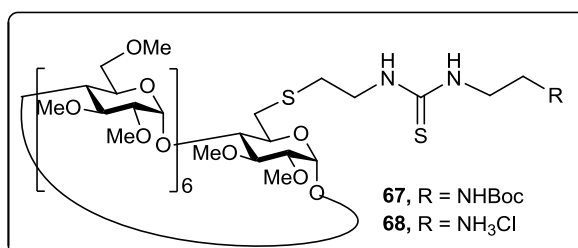
residue was purified by column chromatography (25:1 → 20:1 DCM-MeOH) to give **63**. Yield: 519 mg (97%); $R_f = 0.52$ (9:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_D = +148.8$ (c 1.0 in CHCl_3). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.18\text{--}5.12$ (m, 7 H, $\text{H-1}^{\text{I-VII}}$), 4.19 (m, 13 H, $\text{H-5}^{\text{I-VII}}$, $\text{H-6a}^{\text{II-VII}}$), 3.67 (m, 21 H, OMe), 3.66–3.54 (m, 20 H, $\text{H-3}^{\text{I-VII}}$, $\text{H-4}^{\text{I-VII}}$, $\text{H-6b}^{\text{II-VII}}$), 3.53 (m, 21 H, OMe), 3.41 (m, 18 H, OMe), 3.32 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{Cyst}}$), 3.21 (m, 7 H, $\text{H-2}^{\text{I-VII}}$), 3.09 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 13.6$ Hz, $J_{5,6a} = 2.9$ Hz, H-6a^{I}), 3.02 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.0$ Hz, H-6b^{I}), 2.73 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cyst}}$), 1.48 (s, 9 H, CMe_3). ^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.4$ (CO), 99.0–98.2 ($\text{C-1}^{\text{I-VII}}$), 83.0–81.4 ($\text{C-2}^{\text{I-VII}}$, $\text{C-3}^{\text{I-VII}}$), 80.4–80.0 ($\text{C-4}^{\text{I-VII}}$), 79.0 (CMe_3), 71.5–70.7 ($\text{C-5}^{\text{I-VII}}$, $\text{C-6}^{\text{II-VII}}$), 61.4–61.3 (OMe), 59.0–58.0 (OMe), 39.5 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{Cyst}}$), 33.6 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cyst}}$), 33.2 (C-6^{I}), 28.3 (CMe_3); ESI-MS: m/z 809.9 [$\text{M} + 2 \text{Na}$] $^{2+}$, 1596.7 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$. Anal. Calcd. for $\text{C}_{69}\text{H}_{123}\text{NO}_{36}\text{S}$: C 52.63, H 7.87, N 0.89. Found: C 52.55, H 7.79, N 0.79.

6^I-(2-Aminoethylthio)-6^{II-VII}-hexa-O-methyl-heptakis-(2,3-di-O-methyl)cyclomaltoheptaose heptahydrochloride (64). Compound **64** was obtained by treatment of carbamate **63** (400 mg, 0.25 mmol) with TFA-DCM (1:1, 3 mL) for 2 h, followed by evaporation of the solvent and purification of the residue by column chromatography DCM-MeOH (20:1 → 9:1). Yield: 365 mg (95%); $R_f = 0.41$ (9:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_D = +57.8$ (c 0.2 in CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.16\text{--}5.05$ (m, 7 H, $\text{H-1}^{\text{I-VII}}$), 3.94 (m, 1 H, H-5^{I}), 3.91–3.77 (m, 12 H, $\text{H-5}^{\text{II-VII}}$, $\text{H-6a}^{\text{II-VII}}$), 3.64 (m, 21 H, OMe), 3.63–3.53 (m, 22 H, $\text{H-3}^{\text{I-VII}}$, $\text{H-4}^{\text{I-VII}}$, $\text{H-6b}^{\text{II-VII}}$, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{Cyst}}$), 3.52 (m, 21 H, OMe), 3.39 (m, 18 H, OMe), 3.20 (m, 7 H, $\text{H-2}^{\text{I-VII}}$), 3.17 (m, 1 H, H-6a^{I}), 3.09 (m, 1 H, H-6b^{I}), 2.91 (bt, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cyst}}$). ^{13}C NMR (100.3 MHz, CDCl_3): $\delta = 99.2\text{--}98.4$ ($\text{C-1}^{\text{I-VII}}$), 83.4–81.4 ($\text{C-2}^{\text{I-VII}}$, $\text{C-3}^{\text{I-VII}}$), 81.0–79.6 ($\text{C-4}^{\text{I-VII}}$), 71.3–70.9 ($\text{C-5}^{\text{I-VII}}$, $\text{C-6}^{\text{II-VII}}$), 61.4–61.3 (OMe), 59.2–58.2 (OMe), 38.5 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{Cyst}}$), 33.6 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{Cyst}}$), 29.5 (C-6^{I}); ESI-MS: m/z 1474.8 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$. Anal. Calcd. for $\text{C}_{64}\text{H}_{116}\text{ClNO}_{34}\text{S}$: C 50.87, H 7.74, N 0.93. Found: C 50.80, H 7.57, N 0.87.



6-[2-(*N'*-(2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)ethyl)thioureido)ethylthio]-6^I-desoxy-6^{II}-^{VII}-hexa-*O*-acetyl-heptakis-(2,3-di-*O*-acetyl)cyclomaltoheptaose (65). To a solution of **62** (132 mg, 0.065 mmol) in DCM (5 mL) and Et₃N (45 μL, 0.325 mmol), 2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl isothiocyanate (40 mg, 0.195 mmol) in dry DCM (1 mL) was added and the mixture was stirred overnight at rt under Ar atmosphere. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (3:1 EtOAc: cyclohexane → 20:1 DCM-MeOH). Yield: 132 mg (91%); $R_f = 0.53$ (9:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_d = +82.5$ (c 1.1 in MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 313 K): δ 5.36-5.22 (m, 7 H, H-3^{I-VII}), 5.13-5.09 (m, 6 H, H-1^{II-VII}), 5.07 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1^I), 4.83-4.74 (m, 7 H, H-2^{I-VII}), 4.68-4.39 (m, 6 H, H-6a^{II-VII}), 4.32-4.21 (m, 6 H, H-6b^{II-VII}), 4.20-4.04 (m, 7 H, H-5^{I-VII}), 3.79 (t, 1 H, $J_{4,3} = 8.6$ Hz, H-4^I), 3.75-3.66 (m, 8 H, H-4^{II-VII}, SCH₂CH₂NHCS), 3.65-3.58 (m, 2 H, BocNHCH₂CH₂NHCS), 3.29 (t, 2 H, $J = 5.5$ Hz, BocNHCH₂CH₂NHCS), 3.16 (d, 1 H, $J_{6a,6b} = 14.7$ Hz, H-6a^I), 2.88 (m, 1 H, H-6b^I), 2.78-2.91 (m, 2 H, CH₂S), 2.17-1.99 (m, 60 H, COMe), 1.44 (m, 9 H, CMe₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ 182.3 (CS), 171.3-169.4 (CO_{ester}), 156.7 (CO_{carbamate}), 96.9-96.5 (C-1^{I-VII}), 79.0-76.2 (C-4^{I-VII}), 70.9-69.3 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}, C-5^{I-VII}, CMe₃), 63.1-63.3 (C-6^{II-VII}), 44.9 (BocNHCH₂CH₂NHCS), 43.1 (SCH₂CH₂NHCS), 40.1 (CH₂NHBoc), 32.7 (C-6^I), 31.5 (CH₂S), 29.6 (CMe₃), 20.7 (COMe). ESI-MS: m/z 1141.1 [M + 2 Na]²⁺, 2259.1 [M + Na]⁺. Anal. calcd. for C₉₂H₁₂₉N₃O₅₆S₂: C 49.39, H 5.81, N 1.88, S 2.87. Found: C 49.57, H 5.90, N 1.88, S 2.96.

6^I-[2-(*N'*-(2-aminoethyl)thioureido)ethylthio]-6^I-desoxy-6^{II-VII}-hexa-*O*-acetyl-heptakis-(2,3-di-*O*-acetyl)cyclomaltoheptaose (66). Compound **66** was obtained by treatment of **65** (215 mg, 0.096 mmol) with 1:1 TFA-DCM (8 mL) for 2 h and purification by column chromatography (20:1 → 9:1 DCM-MeOH). Yield: 187 mg (99%); $R_f = 0.61$ (9:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_D = +98.9$ (c 1.2 in MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.96 (t, 1 H, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, H-3), 5.72 (t, 1 H, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, H-3), 5.60-5.35 (m, 5 H, H-3), 5.31 (d, 1 H, $J = 3.5$ Hz, H-1), 5.29-5.06 (m, 6 H, H-1), 5.02-4.71 (m, 7 H, H-2^{I-VII}), 4.70-4.47 (m, 6 H, H-6a^{II-VII}), 4.48-4.30 (m, 6 H, H-6b^{II-VII}), 4.26-4.02 (m, 7 H, H-5^{I-VII}), 3.98-3.64 (m, 9 H, H-4^{I-VII}, CH₂NH₂), 3.28-3.04 (m, 4 H, NH₂CH₂CH₂NHCS, SCH₂CH₂NHCS), 2.95-2.65 (m, 4 H, CH₂S, H-6a^I, H-6b^I), 2.30-1.85 (m, 60 H, COMe). ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ 187.1 (CS), 175.0-170.7 (CO_{ester}), 100.7-95.8 (C-1^{I-VII}), 81.2-77.4 (C-4^{I-VII}), 74.4-70.0 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}, C-5^{I-VII}), 65.6-63.3 (C-6^{II-VII}), 43.3 (BocNHCH₂CH₂NHCS), 42.7 (SCH₂CH₂NHCS), 40.9 (CH₂NH₂), 33.5 (C-6^I), 30.7 (CH₂S), 21.9-20.2 (COMe). ESI-MS: m/z 1080.5 [M + H + Na]²⁺, 2137.9 [M + Na]⁺. Anal. calcd. for C₈₇H₁₂₁N₃O₅₄S₂: C 48.90, H 5.71, N 1.97, S 3.00. Found: C 48.65, H 5.56, N 1.86, S 2.78.

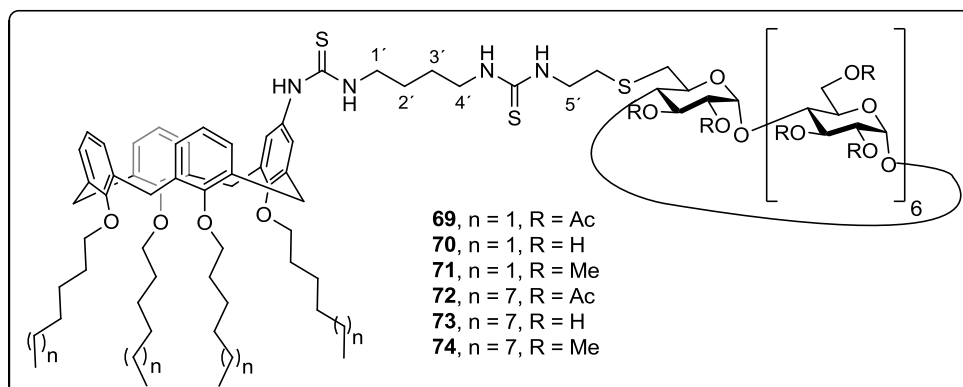


6^I-[2-(*N'*-(2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)ethyl)thioureido)ethylthio]-6^I-desoxy-6^{II-VII}-hexa-*O*-methyl-heptakis-(2,3-di-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose (67). To a solution of **66** (783 mg, 0.53 mmol) in DCM (10 mL), under Ar atmosphere, Et₃N (111 μ L, 0.796 mmol) and 2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl isothiocyanate³⁴ (161 mg, 0.796 mmol) in DCM (2 mL) were added and the mixture was stirred overnight at rt. The

solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (3:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow 20:1 DCM-MeOH). Yield: 827 mg (93%); $R_f = 0.36$ (9:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_D = +125.2$ (c 1 in MeOH). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.22-5.06 (m, 7 H, $\text{H-1}^{\text{I-VII}}$), 4.00-3.89 (m, 3 H, H-5^{I} , $\text{BocNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 3.88-3.73 (m, 14 H, $\text{H-5}^{\text{II-VII}}$, $\text{H-6a}^{\text{II-VII}}$, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 3.67-3.44 (m, 62 H, $\text{H-3}^{\text{I-VII}}$, $\text{H-4}^{\text{I-VII}}$, $\text{H-6b}^{\text{II-VII}}$, OMe), 3.42-3.33 (m, 20 H, OMe, CH_2NHBoc), 3.23-3.12 (m, 7 H, $\text{H-2}^{\text{I-VII}}$), 3.06 (d, 1 H, $J_{6a,6b} = 12.1$ Hz, H-6a^{I}), 3.02-2.96 (m, 1 H, H-6b^{I}), 2.85-2.74 (m, 2 H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 1.42 (s, 9 H, CMe_3). $^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ 182.3 (CS), 157.1 (CO), 99.1-98.3 ($\text{C-1}^{\text{I-VII}}$), 82.7-81.6 ($\text{C-2}^{\text{I-VII}}$, $\text{C-3}^{\text{I-VII}}$), 80.4-79.8 ($\text{C-4}^{\text{I-VII}}$), 79.7 (CMe_3), 71.7-70.8 ($\text{C-5}^{\text{I-VII}}$, $\text{C-6}^{\text{II-VII}}$), 61.4-61.3 (OMe), 59.2-58.4 (OMe), 45.4 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 43.7 ($\text{BocNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 40.1 (CH_2NHBoc), 34.0 (C-6^{I}), 32.1 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 28.6 (CMe_3). ESI-MS: m/z 860.9 $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$, 1698.9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. calcd. for $\text{C}_{72}\text{H}_{129}\text{N}_3\text{O}_{36}\text{S}_2$: C 51.57, H 7.75, N 2.51, S 3.82. Found: C 51.26, H 8.06, N 2.61, S 3.59.

6^I-[2-(2-Aminoethylthioureido)ethylthio]-6^I-deoxy-6^{II-VII}-hexa-*O*-methyl-heptakis-(2,3-di-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose (68). Compound **68** was obtained by treatment of **67** (560 mg, 0.334 mmol) with 1:1 TFA-DCM (8 mL) for 2 h and purification by column chromatography (9:1 DCM-MeOH \rightarrow MeOH). Yield: 526 mg (99%); $R_f = 0.35$ (6:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_D = +130.2$ (c 1.1 in MeOH). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 333 K): δ 5.18 (d, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, 1 H, H-1), 5.14-5.09 (m, 5 H, H-1), 5.07 (d, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, 1 H, H-1), 4.03-3.94 (m, 3 H, H-5^{I} , $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 3.93-3.78 (m, 12 H, $\text{H-5}^{\text{II-VII}}$, $\text{H-6a}^{\text{II-VII}}$), 3.77-3.71 (m, 2 H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$), 3.68-3.46 (m, 62 H, $\text{H-3}^{\text{I-VII}}$, $\text{H-4}^{\text{I-VII}}$, $\text{H-6a}^{\text{II-VII}}$, OMe), 3.42-3.35 (m, 18 H, OMe), 3.34-3.26 (m, 2 H, CH_2NH_2), 3.22-3.13 (m, 7 H, $\text{H-2}^{\text{I-VII}}$), 3.07 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 14.1$ Hz, $J_{5,6a} = 3.0$ Hz, H-6a^{I}), 3.04-2.97 (m, 1 H, H-6b^{I}), 2.84 (t, $J = 6.2$ Hz, 2 H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$). $^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , 313 K): δ 184.1 (CS), 99.3-98.7 ($\text{C-1}^{\text{I-VII}}$), 82.7-83.1-81.9 ($\text{C-2}^{\text{I-VII}}$, $\text{C-3}^{\text{I-VII}}$), 80.4-80.1 ($\text{C-4}^{\text{I-VII}}$), 71.9-71.3 ($\text{C-5}^{\text{I-VII}}$, $\text{C-6}^{\text{II-VII}}$), 61.4-58.7 (OMe), 44.9, 44.1 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}$,

NH₂CH₂CH₂NHCS), 40.8 (CH₂NH₂), 34.0 (C-6^I), 32.4 (SCH₂ CH₂). ESI-MS: *m/z* 1576.89 [M + H]⁺, 1598.95 [M + Na]⁺. Anal. calcd. for C₆₇H₁₂₁N₃O₃₄S₂: C 51.03, H 7.73, N 2.66, S 4.07. Found: C 49.27, H 7.39 N 2.67, S 3.83.



Amphiphilic CA₄-βCD Heterodimer (69). To a solution of **62** (143 mg, 0.067 mmol) in dry DCM (4 mL), under Ar atmosphere, Et₃N (37 μL, 0.268 mmol) and a solution of **54** (70 mg, 0.074 mmol) in dry DCM (2 mL) were added. The mixture was stirred overnight at rt, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (1:1 EtOAc → 20:1 DCM-MeOH). Yield: 190 mg (95%); *R_f* = 0.31 (15:1 DCM-MeOH); [α]_d = +174.7 (*c* 0.5 in MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.06 (t, 2 H, *J* = 7.0 Hz, Ar), 6.99 (d, 2 H, *J* = 6.3 Hz, Ar), 6.88 (t, 2 H, *J* = 6.3 Hz, Ar), 6.61-6.55 (m, 1 H, NH), 6.51-6.44 (m, 1 H, NH), 6.27 (t, 1 H, *J* = 7.0 Hz, Ar), 6.23-6.18 (m, 2 H, Ar), 5.96 (s, 2 H, Ar), 5.43-5.36 (m, 1 H, NH), 5.21-5.16 (m, 7 H, H-3^{I-VII}), 5.11-5.04 (m, 6 H, H-1^{II-VII}), 5.03 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 3.5 Hz, H-1^I), 4.84-4.73 (m, 7 H, H-2^{I-VII}), 4.67-4.49 5.03 (m, 6 H, H-6a^{II-VII}), 4.82-4.37 (d, 4 H, *J* = 13.2 Hz, ArCH_{ax}Ar), 4.34-4.21 (m, 6 H, H-6b^{II-VII}), 4.20-3.96 (m, 11 H, H-5^{I-VII}, CH₂-1_{Hex}), 3.82 (t, 1 H, *J*_{4,3} = 9.2 Hz, H-4^I), 3.83-3.66 (m, 12 H, H-4^{II-VII}, CH₂-1_{Hex}, CH₂-5'), 3.60-3.52 (m, 4 H, CH₂NHCS), 3.20-3.07 (m, 5 H, H-6a^I, ArCH_{eq}Ar), 2.93 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 14.5 Hz, *J*_{5,6} =

4.9 Hz, H-6b^I), 2.89-2.76 (m, 2 H, CH₂S), 2.19-1.98 (m, 60 H, COMe), 1.97-1.76 (m, 8 H, CH₂-2_{Hex}), 1.63-1.47 (m, 8 H, CH₂-2', CH₂-3', CH₂-3_{Hex}), 1.40-1.19 (m, 20 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 0.95-0.83 (bs, 12 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 179.7 (CS), 171.4-169.4 (CO_{ester}), 157.5-121.5 (Ar), 97.0-96.7 (C-1^{I-VII}), 79.0 (C-4^I), 76.3-75.6 (C-4^{II-VII}), 75.2 (C-1_{Hex}), 71.4-70.2 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}), 69.8-69.5 (C-5^{I-VII}), 63.3-62.5 (C-6^{I-VII}), 44.5 (CH₂-5'), 43.8, 43.3 (CH₂NHCS), 32.7 (CH₂S), 32.6 (C-6^I), 32.3-32.0 (C-3_{Hex}), 31.1, 31.0 (ArCH₂Ar), 30.5-30.1 (C-2_{Hex}), 27.0 (CH₂-3'), 26.5-26.2 (C-4_{Hex}), 26.0 (CH₂-2'), 25.7 (C-5_{Hex}), 23.0-22.8 (COMe), 14.3-14.1 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 1514.4 [M + 2 Na]²⁺, 3006.7 [M + Na]⁺. Anal. calcd for C₁₄₂H₁₉₆N₄O₅₈S₃: C 57.17, H 6.62, N 1.88, S 3.22. Found: C 57.28, H 6.74, N 1.62, S 2.97.

Amphiphilic CA₄βCD Heterodimer (70). To a solution of **69** (108 mg, 36 μmol) in MeOH (4 mL), a solution of MeONa in MeOH (0.1 M, 1 mL) was added and the mixture was stirred at rt overnight. Then, DMF (5 mL) and cation exchange Amberlite IR-120 (H⁺) resin was added and the mixture was stirred for 15 min. The resin was filtrated and the solvent was evaporated under reduced pressure. Yield: 77 mg (99%); [α]_d = +42.9 (c 1 in DMF). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.98 (s, 1 H, OH), 7.58 (s, 1 H, NHCS), 7.44 (s, 1 H, NH_{cyst}), 6.77-6.45 (m, 11 H, Ar), 5.84-5.64 (m, 7 H, H-3^{I-VII}), 4.90-4.78 (m, 7 H, H-1^{I-VII}), 4.45 (m, 6 H, H-5^{II-VII}), 4.32 (t, 4 H, *J* = 14.1 Hz, ArCH_{ax}Ar), 3.89-3.74 (m, 9 H, H-5^I, CH₂-1_{Hex}), 3.72-3.49 (m, 26 H, H-4^{I-VII}, CH₂NH_{cyst}, H-6a^{II-VII}, H-6b^{II-VII}, OH), 3.45-3.24 (m, 25 H, H-2^{I-VII}, CH₂NHCS, OH), 3.14 (dd, 4 H, *J* = 13.9 Hz, ArCH_{eq}Ar), 3.02 (d, 1 H, *J* = 12.2 Hz, H-6a^I), 2.82 (m, 1 H, H-6b^I), 2.76-2.63 (m, 2 H, CH₂S), 1.93-1.82 (m, 8 H, CH₂-2_{Hex}), 1.52-1.28 (m, 26 H, CH₂-3', CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 1.23 (t, 2 H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-2'), 0.89 (bs, 12 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 180.0 (CS), 157.4-121.5 (Ar), 102.2-101.7 (C-1^{I-VII}), 81.6 (C-4^I), 74.6, 74.5 (C-1_{Hex}), 73.0-71.1 (C-4^{I-VII}, C-2^{II-VII}, C-3^{I-VII}, C-5^{I-VII}), 59.9 (C-6^{I-VII}), 52.1 (CH₂NHCS), 43.5-43.0 (CH₂NHCS), 32.8 (C-6^I), 31.8 (CH₂S), 31.5 (C-3_{Hex}), 30.1 (ArCH₂Ar), 29.7, 29.6 (C-2_{Hex}), 26.2 (CH₂-2'), 26.1 (CH₂-3'), 25.4, 25.3 (C-4_{Hex}), 22.1

(C-5_{Hex}), 13.7 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 2164.7 [M +Na]⁺, 1093.8 [M +2 Na]²⁺. Anal. calcd for C₁₀₂H₁₅₆N₄O₃₈S₃: C 57.18, H 7.34, N 2.61, S 4.49. Found: C 56.83, H 7.10, N 2.35, S 4.17.

Amphiphilic CA₄βCD Heterodimer (71). To a solution of **57** (45 mg, 0.03 mmol) in DCM (4 mL), under Ar atmosphere, Et₃N (21 μL, 0.16 mmol) and **64** (31.8 mg, 0.03 mmol) were added and the mixture was stirred overnight at rt, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (EtOAc → 20:1 DCM-MeOH). Yield: 65 mg (87%); R_f = 0.44 (9:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_D$ = +85.1 (*c* 0.4 in MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.10 (d, 2 H, J = 6.7 Hz, Ar), 7.03 (d, 2 H, J = 7.1 Hz, Ar), 6.90 (d, 2 H, J = 7.1 Hz, Ar), 6.58 (bs, 1 H, NH), 6.42-6.31 (m, 3 H, Ar), 6.04-5.96 (m, 2 H, Ar), 5.18-5.03 (m, 7 H, H-1^{I-VII}), 4.44 (d, 4 H, J = 13.0 Hz, ArCH_{ax}Ar), 4.11-3.90 (m, 6 H, CH₂-1_{Hex}), 3.91-3.75 (m, 9 H, H-5^{I-VII}, CH₂-1_{Hex}), 3.76-3.78 (m, 4 H, CH₂NH_{Cyst}, SCNHCH₂CH₂CH₂CH₂), 3.69-3.54 (m, 31 H, H-4^{I-VII}, H-6a^{II-VII}, OCH₃), 3.55-3.41 (m, 36 H, H-3^{I-VII}, H-6b^{II-VII}, CH₂-4[′], OCH₃), 3.42-3.29 (m, 21 H, OCH₃), 3.23-3.06 (m, 13 H, H-2^{I-VII}, H-6a^I, H-6b^I, ArCH_{eq}Ar), 2.74 (m, 2 H, CH₂S), 2.03-1.80 (m, 10 H, CH₂-2_{Hex}, CH₂-2[′]), 1.66-1.17 (m, 26 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}, CH₂-3[′]), 0.76 (bs, 12 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 182.5, 179.8 (CS), 157.5-121.5 (Ar), 99.2-98.6 (C-1^{I-VII}), 83.4-80.2 (C-4^{I-VII}, C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}), 75.8 (CH₂NH_{Cyst}), 75.6 (SCNHCH₂CH₂CH₂CH₂), 75.2 (C-1_{Hex}), 71.2-71.7 (C-5^{I-VII}), 61.6 (OCH₃), 59.5-58.9 (C-6^{I-VII}, OCH₃), 58.8-58.4 (OCH₃), 44.1 (CH₂-1[′], CH₂-4[′]), 37.6 (C-6^I), 34.0 (CH₂SH_{Cyst}), 32.3, 32.1 (C-3_{Hex}), 31.2, 30.5 (ArCH₂Ar), 30.1, 29.8 (C-2_{Hex}), 26.6 (CH₂-2[′]), 26.2 (CH₂-3[′]), 25.8, 25.6 (C-4_{Hex}), 23.1, 22.8 (C-5_{Hex}), 14.1 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 2445.3 [M +Na]⁺, 1234.2 [M +2Na]²⁺. Anal. calcd for C₁₂₂H₁₉₆N₄O₃₈S₃: C 60.47, H 8.15, N 2.31, S 3.97. Found: C 60.11, H 7.98, N 2.06, S 3.64.

Amphiphilic CA₄βCD Heterodimer (72). To a solution of **62** (155 mg, 0.072 mmol) in DCM (4 mL), under Ar atmosphere, Et₃N (30 μL, 0.288 mmol) and a solution of **57** (185 mg, 0.077 mmol) in DCM (2 mL) were added. The mixture was stirred

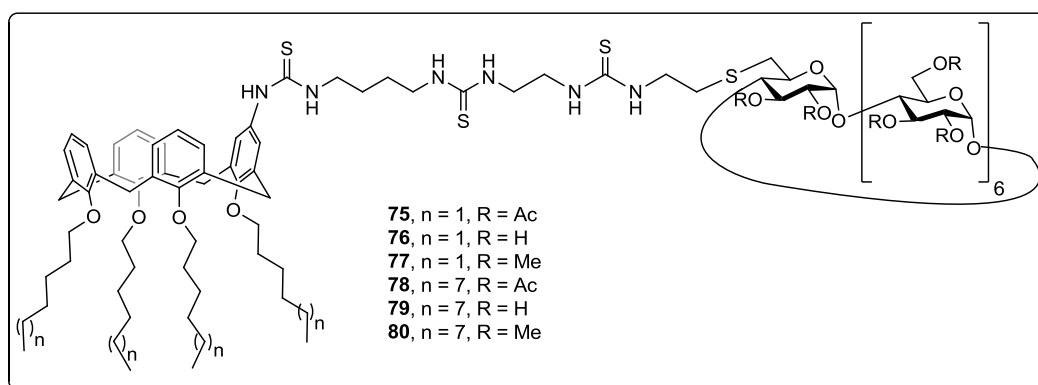
overnight at rt, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (1:1 EtOAc → 20:1 DCM-MeOH). Yield: 215 mg (90%); $R_f = 0.60$ (15:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_D = +52.6$ (c 1 in MeOH). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.05 (t, 2 H, $J = 7.2$ Hz, Ar), 6.98 (d, 2 H, $J = 7.2$ Hz, Ar), 6.88 (t, 2 H, $J = 7.2$ Hz, Ar), 6.5 (bt, 1 H, NH), 6.45-6.38 (m, 1 H, NH), 6.29 (t, 1 H, $J = 7.2$ Hz, Ar), 6.22 (d, 1 H, $J = 7.2$ Hz, Ar), 5.98 (s, 2 H, Ar), 5.43 (bt, 1 H, $J = 5.3$ Hz, NH), 5.36-5.23 (m, 7 H, H-3^{I-VII}), 5.16-5.06 (m, 6 H, H-1^{I-VII}), 5.05 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1^I), 4.85-4.74 (m, 7 H, H-2^{I-VII}), 4.67-4.38 (m, 10 H, H-6a^{II-VII}, ArCH_{ax}Ar), 4.34-4.22 (m, 6 H, H-6b^{II-VII}), 4.22-3.96 (m, 11 H, H-5^{I-VII}, CH₂-1_{Dod}), 3.83 (t, 1 H, $J_{4,3} = 9.3$ Hz, H-4^I), 3.79-3.67 (m, 12 H, H-4^{II-VII}, CH₂-1_{Dod}, CH₂NHCS), 3.62-3.54 (m, 2 H, CH₂NHCS), 3.53-3.45 (m, 2 H, CH₂NHCS), 3.21-3.07 (m, 5 H, H-6a^I, ArCH_{eq}Ar), 2.96 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 13.9$ Hz, $J_{5,6} = 5.1$ Hz, H-6b^I), 2.90-2.77 (m, 2 H, CH₂S), 2.18-1.99 (m, 60 H, COMe), 1.96-1.81 (m, 8 H, CH₂-2_{Dod}), 1.81-1.47 (m, 12 H, CH₂-2', CH₂-3', CH₂-3_{Dod}), 1.44-1.20 (m, 64 H, CH₂-4_{Dod}, CH₂-5_{Dod}, CH₂-6_{Dod}, CH₂-7_{Dod}, CH₂-8_{Dod}, CH₂-9_{Dod}, CH₂-10_{Dod}, CH₂-11_{Dod}), 0.92-0.83 (m, 12 H, CH₃-6_{Dod}). $^{13}\text{C NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3) δ 182.9, 180.0 (CS), 171.3-169.4 (CO_{ester}), 157.5-121.5 (Ar), 97.1-96.8 (C-1^{I-VII}), 79.2 (C-4^I), 76.5-75.5 (C-4^{II-VII}), 75.2 (C-1_{Dod}), 71.5-70.3 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}), 69.9-69.6 (C-5^{I-VII}), 63.4-62.6 (C-6^{II-VII}), 44.6 (CH₂NHCS), 43.9, 43.5 (CH₂NHCS), 32.1 (CH₂S, C-6^I), 32.0-31.1 (C-3_{Hex}), 30.9, 30.7 (ArCH₂Ar), 30.2-29.6 (CH₂-2', CH₂-3', C-2_{Dod}, C-4_{Dod}, C-5_{Dod}, C-6_{Dod}, C-7_{Dod}, C-8_{Dod}, COMe), 26.7-26.1 (C-9_{Dod}), 22.8 (C-10_{Dod}), 21.1-20.9 (C-11_{Dod}), 13.7 (C-12_{Dod}). ESI-MS: m/z 1683.1 $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$, 3343.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Anal. calcd for C₁₆₆H₂₄₄N₄O₅₈S₃: C 60.06, H 7.41, N 1.69, S 2.90. Found: C 60.21, H 7.55, N 1.54, S 2.73.

Amphiphilic CA₄βCD Heterodimer (73). To a solution of **72** (101 mg, 0.030 mmol) in MeOH (4 mL), MeONa in MeOH (0.1 M, 1 mL) was added and the mixture was stirred at rt overnight. Then, DMF (5 mL) and cation-exchange Amberlite IR-120 (H⁺) resin was added and the mixture was stirred for 15 min. The resin was filtrated and the solvent was eliminated under reduced pressure. Yield: 75 mg (99%); $[\alpha]_D = +54.9$ (c

0.8 in DMF). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 343 K) δ 7.84-7.75 (m, 2 H, NH), 7.73-7.63 (m, 1 H, NH), 7.35-7.24 (m, 1 H, NH), 6.72-6.48 (m, 11 H, Ar), 4.90-4.80 (m, 7 H, H-1^{I-VII}), 4.36 (d, 2 H, $J = 12.9$ Hz, ArCH_{ax}Ar), 4.33 (d, 2 H, $J = 13.1$ Hz, ArCH_{ax}Ar), 3.90-3.80 (m, 8 H, CH₂-1_{Dod}), 3.79-3.52 (m, 28 H, H-3^{I-VII}, H-5^{I-VII}, H-6a^{II-VII}, H-6b^{II-VII}, CH₂NHCS), 3.47-3.28 (m, 24 H, H-2^{I-VII}, H-4^{I-VII}, CH₂NHCS, OH), 3.24-2.95 (m, 19 H, ArCH_{eq}Ar, H-6a^I, OH), 2.87 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 13.9$ Hz, $J_{6,5} = 6.3$ Hz, H-6b^I), 2.78-2.69 (m, 2 H, CH₂S), 1.91-1.82 (m, 8 H, CH₂-2_{Dod}), 1.56-1.47 (m, 4 H, CH₂-2', CH₂-3'), 1.46-1.19 (m, 72 H, CH₂-3_{Dod}, CH₂-4_{Dod}, CH₂-5_{Dod}, CH₂-6_{Dod}, CH₂-7_{Dod}, CH₂-8_{Dod}, CH₂-9_{Dod}, CH₂-10_{Dod}, CH₂-11_{Dod}), 0.91-0.81 (m, 12 H, CH₃-12_{Dod}). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6 , 333 K) δ 180.2 (CS), 155.8-121.3 (Ar), 101.7 (C-1^{I-VII}), 84.2 (C-4^I), 81.4 (C-4^{II-VII}), 74.3 (C-1_{Dod}), 72.9-71.9 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}, C-5^{I-VII}), 59.9 (C-6^{II-VII}), 48.2 (CH₂NHCS), 32.9 (C-6^I), 31.7 (CH₂S), 31.0 (C-3_{Dod}), 30.1 (ArCH₂Ar), 29.6-28.4 (CH₂-2', CH₂-3', C-2_{Dod}, C-4_{Dod}, C-5_{Dod}, C-6_{Dod}, C-7_{Dod}, C-8_{Dod}, C-9_{Dod}), 26.1-25.7 (C-10_{Dod}), 21.7 (C-11_{Dod}), 13.4 (C-12_{Dod}). ESI-MS: m/z 1262.4 [M + 2 Na]²⁺. Anal. calcd for C₁₂₆H₂₀₄N₄O₃₈S₃: C 61.04, H 8.29, N 2.26, S 3.88. Found: C 60.87, H 7.98, N 1.95, S 3.50.

Amphiphilic CA₄ β CD Heterodimer (74). To a solution of **60** (93 mg, 0.058 mmol) in DCM (4 mL), under Ar atmosphere, Et₃N (32 μ L, 0.230 mmol) and a solution of **60** (103 mg, 0.080 mmol) in DCM (4 mL) were added and the mixture was stirred overnight at rt, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow 20:1 DCM-MeOH). Yield: 135 mg (90%); $R_f = 0.36$ (15:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_D = +78.5$ (c 0.5 in DCM). ^1H NMR (500 MHz, CDCl₃, 313 K) δ 7.15 (bs, 1 H, NH), 7.07 (d, 2 H, $J = 6.5$ Hz, Ar), 6.99 (d, 2 H, $J = 7.3$ Hz, Ar), 6.87 (t, 2 H, $J = 7.3$ Hz, Ar), 6.51 (bs, 2 H, NH), 6.26-6.20 (m, 3 H, Ar), 5.99 (s, 2 H, Ar), 5.38 (bt, 1 H, NH), 5.17-5.07 (m, 7 H, H-1^{I-VII}), 4.44 (d, 4 H, $J = 13.3$ Hz, ArCH_{ax}Ar), 4.11-3.99 (m, 4 H, CH₂-1_{Dod}), 3.97-3.93 (m, 1 H, H-5^I), 3.91-3.76 (m, 14 H, H-5^{II-VII}, H-6a^{II-VII}, SCH₂CH₂NH), 3.75-3.70 (m, 4 H, CH₂-1_{Dod}), 3.69-3.55 (m, 36 H, H-4^{I-VII}, H-6b^{II-VII}, CH₂NHCS, OMe), 3.54-3.42 (m, 30 H, CH₂NHCS, H-3^{I-VII},

OMe), 3.41-3.34 (m, 18 H, OMe), 3.21-3.05 (m, 13 H, H-2^{I-VII}, H-6a^I, H-6b^I, ArCH_{eq}Ar), 2.90-2.76 (m, 2 H, CH₂S), 1.98-1.82 (m, 8 H, CH₂-2_{Dod}), 1.67-1.58 (m, 4 H, CH₂-2', CH₂-3'), 1.57-1.22 (m, 72, CH₂-3_{Dod}, CH₂-4_{Dod}, CH₂-5_{Dod}, CH₂-6_{Dod}, CH₂-7_{Dod}, CH₂-8_{Dod}, CH₂-9_{Dod}, CH₂-10_{Dod}, CH₂-11_{Dod}), 0.93-0.84 (m, 12 H, CH₃-12_{Dod}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 313 K) δ 182.7, 180.0 (CS), 157.6-121.5 (Ar), 99.3-98.7 (C-1^{I-VII}), 82.2-81.7 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}), 80.5-80.0 (C-4^{I-VII}), 75.9-75.2 (C-1_{Dod}), 71.8-71.1 (C-5^{I-VII}, C-6^{II-VII}), 61.6-61.4 (OCH₃), 59.4-58.6 (OCH₃), 44.1-43.7 (CH₂NHCS), 34.1 (C-6^I), 32.8 (CH₂S), 32.1 (C-4_{Dod}), 31.3, 31.2 (ArCH₂Ar), 30.6 (C-2_{Dod}), 30.2-29.9 (CH₂-2', CH₂-3', C-3_{Dod}, C-5_{Dod}, C-6_{Dod}, C-7_{Dod}), 26.7 (C-8_{Dod}), 26.6 (C-9_{Dod}), 25.6 (C-10_{Dod}), 22.8 (C-11_{Dod}), 14.2 (C-12_{Dod}). ESI-MS: *m/z* 1402.6 [M + 2 Na]²⁺, 2781.3 [M + Na]⁺. Anal. calcd for C₁₄₆H₂₄₄N₄O₃₈S₃: C 63.54, H 8.91, N 2.03, S 3.49. Found: C 63.68, H 8.66, N 1.80, S 3.79.



Amphiphilic CA₄-βCD Heterodimer (75). To a solution of **66** (76.4 mg, 0.033 mmol) in DCM (4 mL), under Ar atmosphere, Et₃N (18 μL, 0.132 mmol) and a solution of **54** (45 mg, 0.047 mmol) in DCM (2 mL) were added. The mixture was stirred overnight at rt, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (1:1 EtOAc → 30:1 DCM-MeOH). Yield: 94 mg (92%); *R_f* = 0.39 (15:1 DCM-MeOH); [α]_D = +64.2 (*c* 1.2 in MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 6.98-6.91 (m, 4 H, Ar), 6.80 (t, 2 H, *J* = 7.5 Hz, Ar), 6.37 (s, 3 H, Ar), 6.22 (s,

2 H, Ar), 5.43-5.32 (m, 7 H, H-3^{I-VII}), 5.21-5.10 (m, 7 H, H-1^{I-VII}), 4.83-4.74 (m, 7 H, H-2^{I-VII}), 4.59-4.51 (m, 6 H, H-6a^{II-VII}), 4.47-4.43 (m, 4 H, ArCH_{ax}Ar), 4.42-4.32 (m, 6 H, H-6b^{II-VII}), 4.24-4.11 (m, 7 H, H-5^{I-VII}), 4.07-3.99 (m, 4 H, CH₂-1_{Hex}), 3.95 (t, 1 H, $J_{4,3} = 9.2$ Hz, H-4^I), 3.89-3.77 (m, 10 H, H-4^{II-VII}, CH₂-1_{Hex}), 3.72-3.60 (m, 6 H, CH₂NHCS) 3.53-3.46 (m, 4 H, CH₂NHCS), 3.25-3.14 (m, 5 H, H-6a^I, ArCH_{eq}Ar), 3.10 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 14.4$ Hz, $J_{5,6} = 5.8$ Hz, H-6b^I), 2.93-2.76 (m, 2 H, CH₂S), 2.17-2.03 (m, 60 H, COMe), 2.00-1.87 (m, 8 H, CH₂-2_{Hex}), 1.66-1.51 (m, 8 H, CH₂-2', CH₂-3', CH₂-3_{Hex}), 1.46-1.25 (m, 20 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 0.98-0.85 (bs, 12 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 180.8 (CS), 172.5-171.4 (CO_{ester}), 158.4-122.8 (Ar), 98.1-98.0 (C-1^{I-VII}), 80.1 (C-4^I), 78.4-77.9 (C-4^{II-VII}), 76.7-76.3 (C-1_{Hex}), 73.4-71.8 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}), 71.2 (C-5^{I-VII}), 64.8-64.4 (C-6^{II-VII}), 45.8-44.7 (CH₂NHCS), 34.1 (CH₂S), 33.6 (C-6^I), 33.4, 33.3 (C-3_{Hex}), 31.9 (ArCH₂Ar), 31.7-30.4 (C-2_{Hex}, CH₂-2', CH₂-3'), 27.7-27.1 (C-4_{Hex}), 24.0-23.9 (C-5_{Hex}), 21.2-21.0 (COMe), 14.5 (C-6_{Hex}). ESI-MS: m/z 3109.2 [M +Na]⁺. Anal. calcd for C₁₄₅H₂₀₂N₆O₅₈S₄: C 56.44, H 6.60, N 2.72, S 4.16. Found: C 56.53, H 6.72, N 2.65, S 3.91.

Amphiphilic CA₄ β CD Heterodimer (76). To a solution of **75** (110 mg, 0.036 mmol) in MeOH (4 mL), MeONa in MeOH (0.1 M, 1 mL) was added and the mixture was stirred at rt overnight. Then, DMF (5 mL) and cation-exchange Amberlite IR-120 (H⁺) resin was added and the mixture was stirred for 15 min. The resin was filtrated and the solvent was evaporated under reduced pressure. Yield: 80 mg (99%); $[\alpha]_D = +81.5$ (c 1 in DMF). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.97 (bs, 1 H, NH), 7.86 (bs, 1 H, NH), 7.74-7.58 (m, 3 H, NH), 7.14 (bt, 1 H, NH), 6.69-6.50 (m, 11 H, Ar), 4.91-4.81 (m, 7 H, H-1^{I-VII}), 4.35 (t, 4 H, $J = 13.4$ Hz, ArCH_{ax}Ar), 3.90-3.81 (m, 8 H, CH₂-1_{Hex}), 3.79-3.49 (m, 28 H, H-3^{I-VII}, H-5^{I-VII}, H-6a^{II-VII}, H-6b^{II-VII}, CH₂NHCS), 3.47-3.28 (m, 28 H, H-2^{I-VII}, H-4^{I-VII}, CH₂NHCS, OH), 3.21-2.99 (m, 19 H, ArCH_{eq}Ar, H-6a^I, OH), 2.87 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 13.9$ Hz, $J_{6,5} = 6.3$ Hz, H-6b^I), 2.78-2.69 (m, 2 H, CH₂S), 1.93-1.83 (m, 8 H, CH₂-2_{Hex}), 1.55-1.49 (m, 4 H, CH₂-2', CH₂-3'), 1.46-1.30 (m, 24 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}),

0.95-0.86 (m, 12 H, CH₃-12_{Hex}). ¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, 323 K) δ 182.8, 180.1 (CS), 156.0-121.5 (Ar), 102.2-101.7 (C-1^{I-VII}), 84.4 (C-4^I), 81.6 (C-4^{II-VII}), 74.6 (C-1_{Dod}), 74.5-71.1 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}, C-5^{I-VII}), 60.0 (C-6^{II-VII}), 43.4-43.0 (CH₂NHCS), 33.0 (C-6^I), 31.7 (CH₂S), 31.4 (C-3_{Hex}), 30.2, 30.1 (ArCH₂Ar), 29.6 (C-2_{Hex}), 26.2, 26.1 (CH₂-2', CH₂-3'), 25.3 (C-4_{Hex}), 22.1 (C-5_{Hex}), 13.7 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 1121.0 [M - 2 H]²⁻, 2243.2 [M - H]⁻. Anal. calcd for C₁₀₅H₁₆₂N₆O₃₈S₄: C 56.18, H 7.27, N 3.74, S 5.71. Found: C 55.91, H 6.95, N 3.44, S 5.36.

Amphiphilic CA₄βCD Heterodimer (77). To a solution of **68** (198 mg, 0.117 mmol) in DCM (4 mL), under Ar atmosphere, Et₃N (65 μL, 0.230 mmol) and a solution of **54** (166 mg, 0.175 mmol) in DCM (4 mL) were added and the mixture was stirred overnight at rt. Then, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane → 9:1 DCM-MeOH). Yield: 278 mg (94%); R_f = 0.44 (15:1 DCM-MeOH); [α]_D = +84.5 (*c* 1.1 in DCM). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.11-7.04 (m, 2 H, Ar), 7.03-6.96 (m, 2 H, Ar), 6.93-6.84 (m, 2 H, Ar), 6.37-6.31 (m, 2 H, NH), 6.29-6.16 (m, 3 H, Ar), 6.02-5.94 (m, 2 H, Ar), 5.54-5.39 (m, 1 H, NH), 5.19-5.07 (m, 7 H, H-1^{I-VII}), 4.42 (d, 4 H, *J* = 12.8 Hz, ArCH_{ax}Ar), 4.11-3.97 (m, 4 H, CH₂-1_{Hex}), 3.96-3.74 (m, 15 H, H-5^{I-VII}, H-6a^{II-VII}, CH₂NH), 3.73-3.68 (m, 4 H, CH₂-1_{Hex}), 3.67-3.55 (m, 38 H, H-4^{I-VII}, H-6b^{II-VII}, CH₂NHCS, OMe), 3.54-3.45 (m, 32 H, CH₂NHCS, H-3^{I-VII}, OMe), 3.42-3.29 (m, 18 H, OMe), 3.24-3.11 (m, 11 H, H-2^{I-VII}, ArCH_{eq}Ar), 3.09-2.98 (m, 2 H, H-6a^I, H-6b^I), 2.89-2.75 (m, 2 H, CH₂S), 2.00-1.79 (m, 8 H, CH₂-2_{Hex}), 1.62-1.44 (m, 8 H, CH₂-2', CH₂-3', CH₂-3_{Hex}), 1.42-1.18 (m, 20 H, CH₂-3_{Hex}, CH₂-4_{Hex}, CH₂-5_{Hex}), 0.97-0.84 (m, 12 H, CH₃-6_{Hex}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 179.5, 179.4, 177.9 (CS), 157.5-121.4 (Ar), 99.0-98.6 (C-1^{I-VII}), 83.4-81.5 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}), 80.4-79.9 (C-4^{I-VII}), 75.8-75.2 (C-1_{Hex}), 71.5-71.1 (C-5^{I-VII}, C-6^{II-VII}), 61.6-61.4 (OCH₃), 59.4-58.6 (OCH₃), 45.9-43.9 (CH₂NHCS), 34.6 (C-6^I), 31.1 (CH₂S), 32.3, 32.1 (C-3_{Hex}), 31.2, 31.1 (ArCH₂Ar), 30.6, 30.5 (C-2_{Hex}), 26.6-26.2 (CH₂-2', CH₂-3', C-4_{Hex}), 23.8, 22.8 (C-5_{Hex}), 14.9, 14.2 (C-6_{Hex}). ESI-MS: *m/z* 2547.5 [M + Na]⁺. Anal. calcd

for $C_{125}H_{202}N_6O_{38}S_4$: C 59.45, H 8.06, N 3.33, S 5.08. Found: C 59.57, H 8.23, N 3.40, S 5.26.

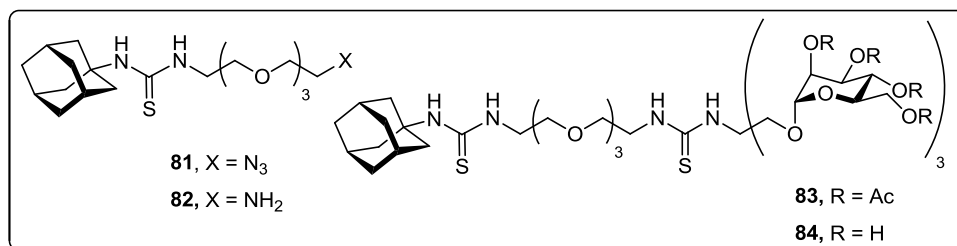
Amphiphilic CA₄βCD Heterodimer (78). To a solution of **66** (207 mg, 0.092 mmol) in DCM (4 mL), under Ar atmosphere, Et₃N (51 μL, 0.132 mmol) and a solution of **60** (236 mg, 0.184 mmol) in DCM (4 mL) were added. The mixture was stirred overnight at rt. Then, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (1:1 EtOAc → 30:1 DCM-MeOH). Yield: 290 mg (92%); $R_f = 0.40$ (15:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_D^{25} = +58.1$ (c 1 in MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.12-6.94 (m, 6 H, Ar), 6.93-6.83 (m, 2 H, Ar), 6.81-6.69 (m, 1 H, NH), 6.30-6.17 (m, 2 H, Ar), 6.05-5.95 (m, 1 H, Ar), 5.39-5.21 (m, 7 H, H-3^{I-VII}), 5.17-5.01 (m, 7 H, H-1^{I-VII}), 5.89-5.60 (m, 7 H, H-2^{I-VII}), 4.68-4.37 (m, 10 H, H-6a^{II-VII}, ArCH_{ax}Ar), 4.34-3.94 (m, 17 H, H-6b^{II-VII}, H-5^{I-VII}, CH₂-1_{Dod}), 3.90-3.61 (m, 17 H, H-4^{I-VII}, CH₂-1_{Dod}, CH₂NHCS), 3.57-3.39 (m, 4 H, CH₂NHCS), 3.34-3.06 (m, 5 H, H-6a^I, ArCH_{eq}Ar), 2.98-2.65 (m, 3 H, H-6b^I, CH₂S), 2.19-1.97 (m, 60 H, COMe), 1.95-1.78 (m, 8 H, CH₂-2_{Dod}), 1.72-1.48 (m, 12 H, CH₂-2', CH₂-3', CH₂-3_{Dod}), 1.40-1.11 (m, 64 H, CH₂-4_{Dod}, CH₂-5_{Dod}, CH₂-6_{Dod}, CH₂-7_{Dod}, CH₂-8_{Dod}, CH₂-9_{Dod}, CH₂-10_{Dod}, CH₂-11_{Dod}), 0.97-0.75 (m, 12 H, CH₃-6_{Dod}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 313 K) δ 179.9 (CS), 173.6-169.5 (CO_{ester}), 157.6-121.6 (Ar), 97.1-96.8 (C-1^{I-VII}), 79.3 (C-4^I), 79.8-75.6 (C-4^{II-VII}), 75.2 (C-1_{Dod}), 71.5-70.4 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}), 69.8-67.0 (C-5^{I-VII}), 63.0-62.7 (C-6^{II-VII}), 44.7-43.1 (CH₂NHCS), 33.1 (CH₂S, C-6^I), 32.4-31.9 (C-3_{Hex}), 31.1, 30.6 (ArCH₂Ar), 30.5-29.1 (CH₂-2', CH₂-3', C-2_{Dod}, C-4_{Dod}, C-5_{Dod}, C-6_{Dod}, C-7_{Dod}, C-8_{Dod}, COMe), 26.7-26.2 (C-9_{Dod}), 23.1-22.8 (C-10_{Dod}), 20.8 (C-11_{Dod}), 14.1 (C-12_{Dod}). ESI-MS: m/z 3445.0 [M + Na]⁺. Anal. calcd for $C_{169}H_{250}N_6O_{58}S_4$: C 59.32, H 7.36, N 2.46, S 3.75. Found: C 59.27, H 7.33, N 2.27, S 3.54.

Amphiphilic CA₄βCD Heterodimer (79). To a solution of **78** (115 mg, 0.029 mmol) in MeOH (4 mL), MeONa in MeOH (0.1 M, 1 mL) was added and it was stirred at rt overnight. Then, DMF (5 mL) and cation exchange Amberlite IR-120 (H⁺) resin was

added and the mixture was stirred for 15 min. The resin was filtrated and the solvent was evaporated under reduced pressure. Yield: 75 mg (99%); $[\alpha]_D = +37.4$ (*c* 1 in DMF). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 353 K) δ 7.24-7.17 (m, 1 H, NH), 7.12-7.06 (m, 1 H, NH), 6.99-6.94 (m, 1 H, NH), 6.91-6.79 (m, 3 H, NH), 6.72-6.49 (m, 11 H, Ar), 4.94-4.81 (m, 7 H, H-1^{I-VII}), 4.36 (t, 2 H, *J* = 12.5 Hz, ArCH_{ax}Ar), 3.93-3.81 (m, 8 H, CH₂-1_{Dod}), 3.79-3.60 (m, 28 H, H-3^{I-VII}, H-5^{I-VII}, H-6a^{II-VII}, H-6b^{II-VII}, SCH₂CH₂NHCS), 3.47-3.29 (m, 28 H, H-2^{I-VII}, H-4^{I-VII}, CH₂NHCS, OH), 3.28-2.83 (m, 19 H, ArCH_{eq}Ar, H-6a^I, OH), 2.70-2.87 (m, 1 H, H-6b^I), 2.78-2.69 (m, 2 H, CH₂S), 1.95-1.79 (m, 8 H, CH₂-2_{Dod}), 1.57-1.47 (m, 4 H, CH₂-2', CH₂-3'), 1.50-1.13 (m, 72 H, CH₂-3_{Dod}, CH₂-4_{Dod}, CH₂-5_{Dod}, CH₂-6_{Dod}, CH₂-7_{Dod}, CH₂-8_{Dod}, CH₂-9_{Dod}, CH₂-10_{Dod}, CH₂-11_{Dod}), 0.91-0.81 (m, 12 H, CH₃-12_{Dod}). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6 , 313 K) δ 180.1 (CS), 155.9-121.5 (Ar), 101.9 (C-1^{I-VII}), 84.1 (C-4^I), 81.5 (C-4^{II-VII}), 74.5 (C-1_{Dod}), 73.0-71.9 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}, C-5^{I-VII}), 59.9 (C-6^{II-VII}), 43.6-41.3 (CH₂NHCS), 32.7 (C-6^I), 31.9 (CH₂S), 31.4-28.2 (C-3_{Dod}, ArCH₂Ar, CH₂-2', CH₂-3', C-2_{Dod}, C-4_{Dod}, C-5_{Dod}, C-6_{Dod}, C-7_{Dod}, C-8_{Dod}, C-9_{Dod}), 26.0 (C-10_{Dod}), 23.0-22.0 (C-11_{Dod}), 13.3-13.4 (C-12_{Dod}). ESI-MS: *m/z* 1289.2 [M - 2H]²⁻, 2578.5 [M - H]. Anal. calcd for C₁₂₉H₂₁₀N₆O₃₈S₄: C 60.02, H 8.20, N 3.26, S 4.97. Found: C 59.91, H 7.84, N 2.91, S 4.62.

Amphiphilic CA₄βCD Heterodimer (80). To a solution of **68** (101 mg, 0.06 mmol) in DCM (4 mL), under Ar atmosphere, Et₃N (33 μL, 0.230 mmol) and a solution of **60** (117 mg, 0.091 mmol) in DCM (4 mL) were added and the mixture was stirred overnight at rt. Then, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (1:1 EtOAc-cyclohexane → 20:1 DCM-MeOH). Yield: 149 mg (87%); *R_f* = 0.65 (15:1 DCM-MeOH); $[\alpha]_D = +74.3$ (*c* 0.4 in DCM). ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.09-7.00 (m, 2 H, Ar), 6.98-6.91 (m, 2 H, Ar), 6.88-6.78 (m, 2 H, Ar), 6.44-6.32 (m, 2 H, NH), 6.29-6.15 (m, 3 H, Ar), 6.14 (bs, 2 H, Ar), 5.58-5.53 (m, 1 H, NH), 5.18-5.00 (m, 7 H, H-1^{I-VII}), 4.39 (d, 4 H, *J* = 12.6 Hz, ArCH_{ax}Ar), 4.09-3.91 (m, 4 H, CH₂-1_{Dod}), 3.89-3.72 (m, 15 H, H-5^{I-VII}, H-6a^{II-VII}, CH₂NH), 3.71-3.65 (m, 4

H, CH₂-1_{Dod}), 3.63-3.51 (m, 38 H, H-4^{I-VII}, H-6b^{II-VII}, CH₂NHCS, OMe), 3.50-3.41 (m, 32 H, CH₂NHCS, H-3^{I-VII}, OMe), 3.40-3.25 (m, 18 H, OMe), 3.22-2.98 (m, 13 H, H-2^{I-VII}, ArCH_{eq}Ar, H-6a^I, H-6b^I), 2.82-2.74 (m, 2 H, CH₂S), 1.97-1.76 (m, 8 H, CH₂-2_{Dod}), 1.60-1.42 (m, 8 H, CH₂-2', CH₂-3', CH₂-3_{Dod}), 1.40-1.04 (m, 68 H, CH₂-3_{Dod}, CH₂-4_{Dod}, CH₂-5_{Dod}, CH₂-6_{Dod}, CH₂-7_{Dod}, CH₂-8_{Dod}, CH₂-9_{Dod}, CH₂-10_{Dod}, CH₂-11_{Dod}), 0.92-0.73 (m, 12 H, CH₃-12_{Dod}). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 179.7, 177.8 (CS), 157.5-121.2 (Ar), 99.0-98.5 (C-1^{I-VII}), 83.1-81.4 (C-2^{I-VII}, C-3^{I-VII}), 80.2-79.9 (C-4^{I-VII}), 75.7-75.2 (C-1_{Hex}), 71.5-71.0 (C-5^{I-VII}, C-6^{II-VII}), 61.5-61.3 (OCH₃), 59.3-58.5 (OCH₃), 46.4-43.0 (CH₂NHCS), 33.9 (C-6^I), 32.5 (CH₂S), 32.0 (C-3_{Dod}), 31.0 (ArCH₂Ar), 30.6-29.5 (CH₂-2', CH₂-3', C-2_{Dod}, C-4_{Dod}, C-5_{Dod}, C-6_{Dod}, C-7_{Dod}, C-8_{Dod}, C-9_{Dod}), 26.7-26.1 (C-10_{Dod}), 22.7 (C-11_{Dod}), 14.1 (C-12_{Dod}). ESI-MS: *m/z* 2885.2 [M + Na]⁺. Anal. calcd for C₁₄₉H₂₅₀N₆O₃₈S₄: C 62.53, H 8.80, N 2.94, S 4.48. Found: C 62.67, H 9.00, N 3.11, S 4.62.



N-adamantan-1-yl-N'-[ω-azidotetra(ethyleneglycol)] thiourea (81). A solution of α-amino-ω-azidotetra(ethyleneglycol) (**174**, 121 mg, 0.56 mmol), 1-adamantylisothiocyanate (161 mg, 0.83 mmol) and Et₃N (0.15 mL, 1.08 mmol) in dry DMF (3 mL) was stirred at rt for 3 days. The solvent were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by chromatography (EtOAc-petroleum ether 1:1) to give **81** as colorless oil. Yield: 121 mg (53%). *R_f* = 0.51 (EtOAc-petroleum ether 3:1). IR (ATR): 2904, 2098 cm⁻¹ (N₃), 1087 cm⁻¹. UV (DCM): 254 nm (ε_{mM} 12.7). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 3.80-3.62 (m, 14 H, CH₂-1-7), 3.43 (t, 2 H, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, CH₂-8),

2.22 (m, 6 H, α H), 2.11 (m, 3 H, β H), 1.76 (m, 6 H, γ H). ^{13}C NMR (75.4 MHz, CD_3OD): $\delta = 182.9$ (CS), 73.4-71.7 (CH_2 -2-7), 52.6 (C_q Ad), 50.0 (CH_2 -8), 44.7 (CH_2 -1), 43.6 (α C), 38.3 (γ C), 31.9 (β C). MS (ESI): m/z 424.3 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 410.2 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$, 446.1 [$\text{M} + \text{Cl}$] $^-$. Anal. Calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$: C 55.45, H 8.08, N 17.02, S 7.79 Found C 55.61, H 8.11, N 16.88, S 7.54.

***N*-adamantan-1-yl-*N'*-[ω -amino-tetra(ethyleneglycol)]thiourea (82).** A solution of **81** (121 mg, 0.29 mmol), 1,3-propanedithiol (65 μL , 0.65 mmol), and Et_3N (90 μL , 0.65 mmol) in MeOH (4 mL) under Ar atmosphere was stirred overnight at rt. 1,3-Propanedithiol (65 μL , 0.65 mmol), and Et_3N (90 μL , 0.65 mmol) were added and the reaction mixture was further stirred for 6 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (10:1 CH_3CN - H_2O \rightarrow 10:1:1 CH_3CN - H_2O - NH_4OH) to give **82** as colorless oil. Yield: 72 mg (65%). $R_f = 0.24$ (10:1:1 CH_3CN - H_2O - NH_4OH). IR (ATR): 3298, 2902, 1088 cm^{-1} . UV (DCM): 254 nm (ϵ_{mM} 14.0). ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): $\delta = 3.72$ -3.60 (m, 12 H, CH_2 -1-6), 3.56 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, CH_2 -7), 2.84 (t, 2 H, CH_2 -8), 2.23 (d, 6 H, $^3J_{\text{H,H}} = 2.7$ Hz, α H), 2.11 (m, 3 H, β H), 1.76 (t, 6 H, $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, γ H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): $\delta = 182.2$ (CS), 73.1 (CH_2 -7) 71.6-70.9 (CH_2 -1-6) 54.7 (C_q Ad), 45.0 (CH_2 -1), 42.9 (α C), 42.0 (CH_2 -8), 37.4 (γ C), 31.1 (β C). MS(ESI): m/z 386.4 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$. Anal. Calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: C 59.19, H 9.15, N 10.90, S 8.32 Found C 59.22, H 9.33, N 10.92, S 8.40.

***N*-[Tris(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxymethyl)methyl]-*N'*-[ω -[3-(adamant-1-yl)thioureido]tetra(ethyleneglycol)]thiourea (83).** To a solution of **82** (19 mg, 45 μmol) and NaHCO_3 (7.6 mg, 90 μmol) in H_2O (0.5 mL), a solution of tris(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxymethyl)methyl isothiocyanate (**175**, 101 mg, 90 μmol) in acetone (2.5 mL) was added, and the reaction mixture was stirred overnight. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in DCM (10 mL)

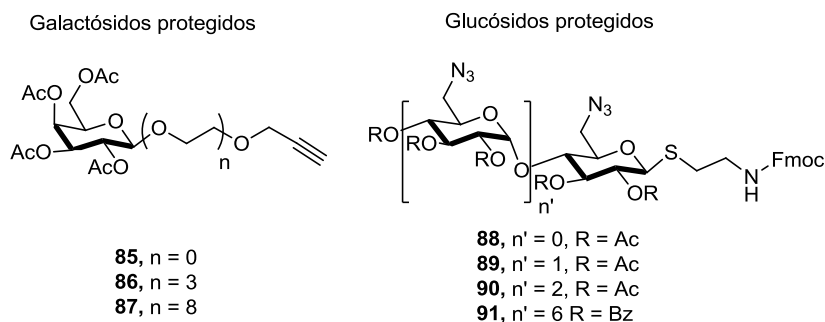
then washed with H₂O (3 x 3 mL). The organic layer was dried, filtered and concentrated and the residue was purified by column chromatography (EtOAc-petroleum ether 1:1→2:1). Yield: 64 mg (92%). $R_f = 0.34$ (DCM-MeOH 30:1). $[\alpha]_D = +17.1$ (c 0.9 in DCM). IR: 2915, 1743, 1042 cm⁻¹. UV (MeOH): 254 nm (ϵ_{mM} 4.8). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 313 K): $\delta = 7.98$ (s, 1 H, NH), 6.67 (s, 1 H, NH), 6.36 (t, 1 H, ³ $J_{H,H} = 4.7$ Hz, NH), 5.27 (t, 3 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.8$ Hz, H-4), 5.20 (dd, 3 H, $J_{2,3} = 3.4$ Hz, H-3), 5.18 (dd, 3 H, $J_{1,2} = 1.2$ Hz, H-2), 4.90 (d, 3 H, H-1), 4.37 (d, 3 H, ³ $J_{H,H} = 10.0$ Hz, CHH-OMan), 4.31 (dd, 3 H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, $J_{5,6a} = 4.7$ Hz, H-6a), 4.12 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 2.3$ Hz, H-6b), 4.04 (ddd, 3 H, H-5), 4.01 (d, 3 H, CHH-OMan), 3.70-3.50 (m, 18 H, CH₂-1-8, CH₂NHCS), 2.12, 2.08, 2.01, 1.96 (4 s, 36 H, COCH₃), 2.05 (bs, 6 H, α H), 2.04 (s, 3 H, β H), 1.67 (bs, 6 H, γ H). ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 313 K): $\delta = 182.6$, 181.0 (2 CS), 170.8, 170.2, 170.0, 169.5 (4 CO), 98.2 (C-1), 70.4-69.4 (CH₂-1-8), 69.4 (C-2), 69.3 (C-3), 69.0 (C-5), 66.3 (CH₂-OMan), 65.9 (C-4), 62.2 (C-6), 61.0 (C_{q,Tris}), 53.9 (C_q Ad), 44.8, 43.8 (CH₂NHCS), 42.0 (α C), 36.1 (γ C), 29.5 (β C), 20.7, 20.6 (COCH₃). MS (ESI): m/z 1562.2 [M + Na]⁺. Anal. Calcd. for C₆₆H₉₈N₄O₃₃S₂: C 51.49, H 6.42, N 3.64, S 4.17. Found C 51.57, H 6.62, N 3.70, S 3.89.

***N*-[Tris(α -D-mannopyranosyloxymethyl)methyl]-*N'*-[ω -[3-(adamant-1-yl)thioureido]tetra(ethyleneglycol)]thiourea (84).** Compound **83** (30 mg, 19 μ mol) was deacetylated using Zemplén procedure. The residue was freeze-dried to yield **84** as white foam. Yield: 19.7 mg (quantitative). $R_f = 0.71$ (CH₃CN-H₂O-NH₄OH 6:3:1). $[\alpha]_D = +36.9$ (c 0.3 in MeOH). IR (ATR): 3306, 2911, 1036 cm⁻¹. UV (MeOH): 246 nm (ϵ_{mM} 18.3). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): $\delta = 4.83$ (d, 3 H, $J_{5,6a} = 1.6$ Hz, H-1), 4.10, 4.06 (2 d, 6 H, ³ $J_{H,H} = 10.0$ Hz, 3.90 (d, 3 H, $J_{6a,6b} = 11.9$ Hz, H-6a), 3.88 (dd, 3 H, $J_{2,3} = 3.3$ Hz, H-2), 3.76-3.63 (m, 28 H, H-3, H-4, H-5, H-6b, 2 CH₂NHCS, CH₂-1-8), 2.23 (bs, 6 H, α H), 2.11 (bs, 3 H, β H), 1.76 (bs, 6 H, γ H). ¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD): $\delta = 183.6$, 181.1 (2 CS), 103.2 (C-1), 75.9 (C-3), 73.5 (C-5), 72.8 (C-2), 72.5-71.5 (CH₂-1-8), 69.6 (C-4),

68.6 ($\text{CH}_{2,\text{tris}}$), 63.7 (C-6), 62.9 ($\text{C}_{\text{q,tris}}$), 55.6 ($\text{C}_{\text{q Ad}}$), 46.3, 45.8 (CH_2NHCS), 43.6 (αC), 38.3 (γC), 32.0 (βC). MS (ESI): m/z 1058 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1073.9 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 1033.8 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1059.8 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$. Anal. Calcd. for $\text{C}_{42}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_{21}\text{S}_2$: C 48.73, H 7.21, N 5.41, S 6.20 Found C 48.72, H 7.53, N 5.04, S 5.84.

Preparation of multivalent systems based on oligosaccharide scaffolds

Sistemas multivalentes sobre plataformas oligosacáridicas

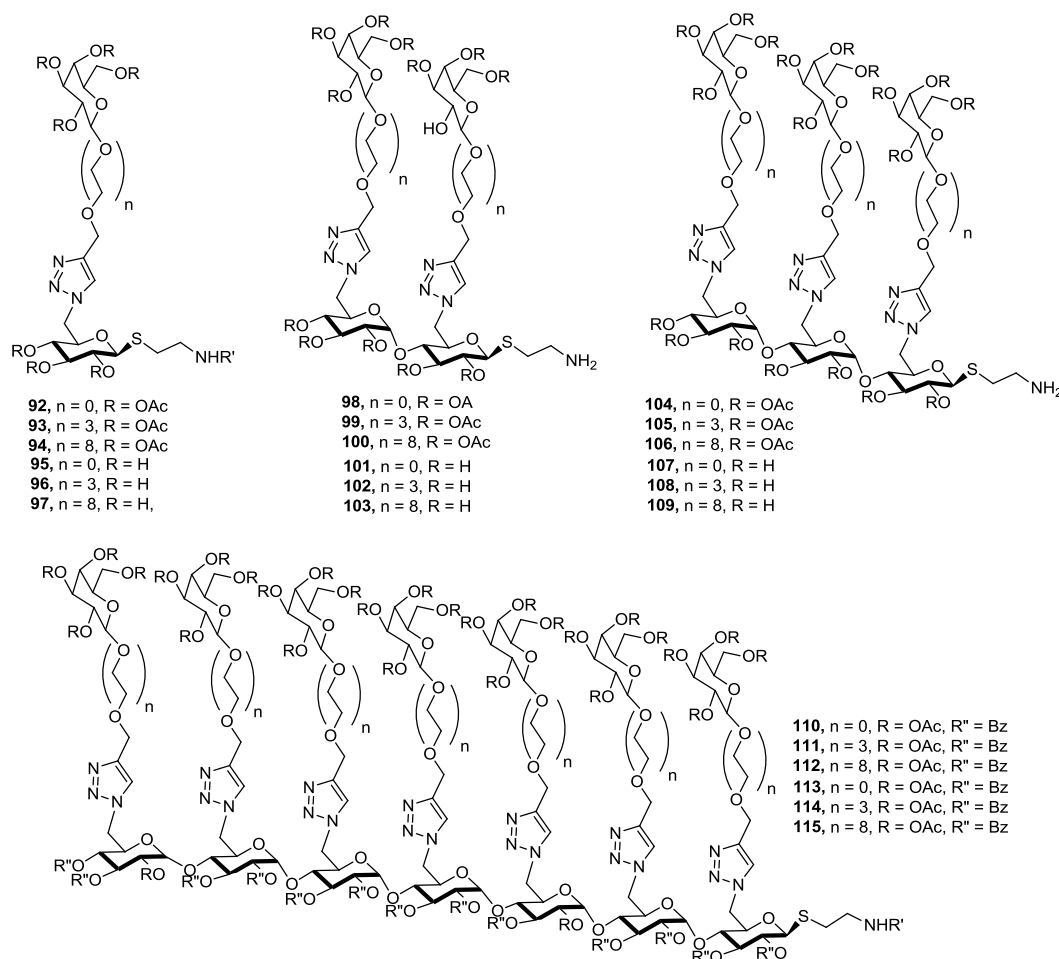


General procedure for the synthesis of galactosides: 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-galactopyranosyl trichloroacetimidate (3.00g, 6.1 mmol) and propargyl alcohol (409 mg, 7.3mmol) were dissolved in dry DCM (40 mL) and the solution was stirred at rt for 1 h, under Ar atmosphere. TMSOTf (35 μL , 0.2 mmol) was added and after 15 min the mixture was quenched with NaHCO_3 (35 mg). After filtration and evaporation to dryness, the residue was chromatographed on a silica gel column with EtOAc -cyclohexane (1:1) as eluent to give 1 (2.0 g, 85%).

Analytical and spectroscopical data of compounds **85**³⁵ and **86**³⁶ were according with previously described.

Compound **87** ($n = 8$). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +77$ (c 1, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) $\delta = 5.34$ (1 H, m, *H*-2), 5.17 (1 H, dd, J 10.5 Hz, J 7.9 Hz, *H*-2), 5.00 (1H, dd, J 3.4 Hz, *H*-4), 4.57 (1 H, d, Hz, *H* 1 β), 4.20-4.10 (4 H, *H*-6, OCH_2CCH), 3.88 (1 H, m, *H*-5), 3.65 (32 H, m, 16 x CH_2O), 2.41 (1 H, t, J 2.4 Hz, CCH), 2.01, 2.00, 1.97, 1.95 (12H, s, 4 x CH_3), $^{13}\text{C NMR}$

(75 MHz, CDCl₃): δ = 170.4, 170.0, 169.9, 169.4(O-CO-CH₃); 101.3 (C-1), 79.6 (CCH), 74.6 (CCH), 70.9, 70.5, 70.3, 70.2, 69.1, 68.8, 67.1 (C-2,3,4,5, CH₂O), 61.2 (C-6), 58.3 (CH₂CCH), 20.6, 20.5 (OCH₃); HRMS (ES⁺): Found 761.3173 C₃₃H₅₄O₁₈Na requires 635.1788.



General procedure for the CuAAC. Compound **88** (100 mg, 0.16 mmol), compound **85** (7.6 mg, 0.20 mmol), CuSO₄ (7 mg, 0.05 mmol) and sodium ascorbate (20

mg, 0.1 mmol) were dissolved in a mixture of dioxane (2 mL) and H₂O (0.5 mL). The mixture was stirred under MW irradiation at 70°C for 30 minutes. After evaporation under reduced pressure, the residue was dissolved in DCM (5mL) and the solution filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure and the mixture chromatographed on a silica gel column with 1:1 EtOAc-cyclohexane to EtOAc as eluent to afford **92** as a white powder (127 mg, 81%). $[\alpha]_{20}^D +80$ (c 1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.98-7.32 (10 H, m, Htrz, 9 x HFmoc), 5.32 (2 H, m, H-3, H-2gal), 5.14 (1 H, dd, J 20 Hz, J 7 Hz, H-3gal), 4.99-4.71 (5 H, m, H-1, H-1gal, H-4, H-4gal, H-2, H-6gal), 4.63 (2 H, m, H-6bgal, H-6a), 4.52 (1 H, m, H-6b), 4.33 (2 H, m, CH₂-OFmoc), 4.23-4.04 (5 H, m, CH-CH₂ Fmoc, O-CH₂ trz, H-5gal, H-5), 3.43 (2 H, m, CH₂-NH), 3.08 (H, m, CHH-S), 2.65 (H, m, CHH-S); 2.10, 2.05, 2.01, 2.00, 1.97, 1.95 (21 H, 7s, 7 x CH₃), ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 170.8, 170.7, 170.4, 170.3, 170.1, 169.9 (7 OCO- CH₃), 156.8 (O-COFmoc), 144.7, 143.7, 141.6, 128.6, 128.5, 127.9, 126.1, 126.0, 121.2, 120.9 (13 x CFmoc, C=CHtrz, CH=Ctrz); 100.0 (C-1gal), 82.7 (C-1), 75.6 (C-5), 73.8 (C-3), 71.1, 70.8, 70.6, 70.3, 69.4, 69.1 (C-2, C-4, C-2gal, C-3gal, C-4gal, C-5gal), 66.2 (CH₂-OFmoc), 62.9 (O-CH₂-trz), 62.5 (C-6gal), 50.9 (C-6), 47.5 (CH-CH₂-O), 40.6 (CH₂-NH), 31.4 (CH₂-S), 21.0, 20.6 (7 x CH₃-CO), MS (ES⁺): 1021 [M+Na]⁺.

Compound 93 (n = 3). Chromatography with 7:3 EtOAc-cyclohexane to EtOAc as eluent to afford **93** as a white powder (70%). $[\alpha]_{20}^D +85$ (c 1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.75-7.29 (10 H, m, Htrz, 9 x HFmoc); 5.39-5.08 (3 H, m, H-3, H-2gal, H-3gal); 5.06-4.77 (3H, m, H-4, H-4gal H-2); 4.67 – 4.38 (5H, m, H-1, H-1gal, H-6bgal, H-6a, H-6bgal); 4.33-3.77 (8H, m, H-5gal, H-5, H-6b, CH₂-OFmoc, CH-CH₂ Fmoc, O-CH₂ triazole); 3.68-3.42 (12H, m, 6 x CH₂O) 3.12 (2H, m, CH₂-NH); 2.65 (2H, m, CH₂-S); 2.11, 2.09, 2.01, 1.99, 1.95 (21H, 7s, 7 x CH₃), ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 170.3, 170.2, 170.1, 169.7 (O-CO-CH₃); 156.3 (O-COFmoc); 145.1, 143.9, 141.2, 127.6, 127.0, 124.9, 124.7, 119.9 (CHFmoc, C=CHtriazole, CH=Ctriazole), 100.9 (C-1Gal), 83.6 (C-1), 76.1 (C-5); 73.2 (C-3); 70.8, 70.5, 70.3, 70.1, 69.7, 68.9, 68.7 (C-2, C-

4, C-2Gal, C-3Gal, C-4Gal, C-5Gal, 6 x CH₂O); 66.1 (CH₂-OFmoc); 64.4 (O-CH₂-trz); 61.6 (C-6Gal); 50.6 (C-6); 47.3 (CH-CH₂-O); 41.1 (CH₂-NH); 30.5 (CH₂-S); 20.7, 20.6 (CH₃-CO), MS (ES⁺): 1153 [M+Na] ⁺.

Compound 94 (n = 8). Chromatography with 7:3 EtOAc-cyclohexane to EtOAc as eluent to afford **94** as a white powder (78%). [α]₂₀^D +83 (c 1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.75-7.29 (10 H, m, Htrz, 9 HFmoc), 5.31- 4.99 (3 H, m, H-3, H-2Gal, H-3Gal); 4.95-4.76 (3 H, m, H-4, H-4Gal, H-2), 4.53-4.28 (5 H, m, H-1, H-1Gal, H-6bGal, H-6a, H-6bGal); 4.24-3.70 (8 H, m, H-5Gal, H-5, H-6b, CH₂-OFmoc, CH-CH₂Fmoc, O-CH₂trz); 3.68-3.32 (32 H, m, 16 x CH₂O) 3.04 (2 H, m, CH₂-NH); 2.45 (2 H, m, CH₂-S); 2.02, 2.01, 1.99, 1.95, 1.87 (21 H, s, 7 x CH₃), ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 170.7, 170.6, 170.4, 170.0, 169.7 (O-CO-CH₃); 156.6 (O-COFmoc); 145.4, 144.2, 141.6, 128.0, 127.4, 125.3, 124.7, 120.3 (CHFmoc, C=CHtriazole, CH=Ctriazole); 101.5 (C-1Gal); 83.9 (C-1); 77.5 (C-5); 73.2 (C-3); 70.8, 70.5, 70.3, 70.1, 69.7, 68.9, 68.7 (C-2, C-4, C-2Gal, C-3Gal, C-4Gal, C-5Gal, 6 CH₂O); 66.1 (CH₂-OFmoc); 64.4 (O-CH₂Trz); 61.6 (C-6Gal); 50.6 (C-6); 47.3 (CH-CH₂-O); 41.1 (CH₂-NH); 30.5 (CH₂-S); 20.7, 20.6 (CH₃-CO), MS (ES⁺): 698 [M+2Na] ²⁺/2.

Compound 97. Chromatography with 7:3 EtOAc-cyclohexane to 1:9 MeOH-EtOAc as eluent to afford **99** as a white powder (78%). [α]₂₀^D +87 (c 1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.78-7.30 (11 H, m, 2 x HTrz, 9 x HFmoc); 5.63-5.02 (11 H, m, H-1I-II, H-2I-II, 2 x H-1Gal, 2 x H-2Gal, 2 x H-3Gal, 2 x H-4Gal); 4.99-3.55 (46 H, m, H-1I, H-3I-II, H-4I-II, H-5I-II, 2 x H-6I-II, 2 x H-5Gal, 4 x H-6Gal, CH₂-OFmoc, CH-CH₂, 2 OCH₂Trz, 12 x CH₂O); 3.11 (2 H, m, CH₂-NH); 2.35 (2 H, m, CH₂-S); 2.1, 2.0, 1.9 (39 H, s, 13 x CH₃) ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 170.4, 170.3, 170.2, 170.1, 169.8, 169.6, 169.4 (13 x O-CO-CH₃); 156.3 (O-COFmoc); 143.9, 141.3, 127.7, 127.1, 125.2, 125.0, 124.9, 124.8, 119.9 (7 x CHFmoc, 2 x C=CHtriazole, 2 x CH=Ctriazole); 101.3 (2 x C-1Gal); 95.3 (C-1II); 83.5 (C-1I); 75.9, 75.6, 73.1, 70.9, 70.6, 70.5, 70.2, 70.1,

69.8, 69.0, 68.8 (C-2I-II, C-3I-II, C-4I-II, C-5I-II, 2 x C-2Gal, 2 x C-3Gal, 2 x C-4Gal, 2 x C-5Gal, 12 x CH₂O); 66.2 (CH₂-OFmoc); 64.5, 61.2 (2 x O-CH₂Trz, 2 x C-6Gal); 50.5, 50.0 (C-6I-II); 47.3 (CH-CH₂-O); 41.1 (CH₂-NH); 30.6 (CH₂-S); 20.8, 20.5 (13 x CH₃-CO) MS (ES⁺): 982 [M+2Na]²⁺/2.

Compound 98. Chromatography with 1:1 EtOAc-cyclohexane to EtOAc as eluent to afford **98** as a white powder (75%). $[\alpha]_{20}^D +85$ (c 1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.86-7.29 (11 H, m, 2 x HTrz, 9 x HFmoc); 5.45- 5.12 (11 H, m, H-1I-II, H-2I-II, 2 x H-1Gal, 2 x H-2Gal, 2 x H-3Gal, 2 x H-4Gal); 4.99-3.49 (26 H, m, H-1I, H-3I-II, H-4I-II, H-5I-II, 2 x H-6I-II, 2 x H-5Gal, 4 x H-6Gal, CH₂-OFmoc, CH-CH₂, 2 x O-CH₂Trz, CH₂-NH); 2.65 (2 H, m, CH₂-S); 2.10, 2.05, 2.01, 2.00, 1.97, 1.95 (39 H, s, 13 x CH₃), ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 170.5, 170.3, 170.0, 169.9 (O-CO-CH₃); 156.8 (OCOFmoc); 144.9, 143.9, 141.8, 128.9, 128.6, 128.0, 126.8, 126.4, 121.2, 120.9 (CFmoc, C=CHtriazole, CH=Ctriazole); 100.0, 99.6 (C-1Gal); 95.8 (C-1II); 82.4 (C-1I); 75.9, 75.6 (C-5I-II); 72.5, 70.7, 69.7, 69.3, 68.9, 68.6, 67.0 (C-2I-II, C-3I-II, C-4I-II, C-2Gal, C-3Gal, C-4Gal, C-5Gal); 66.2 (CH₂-OFmoc); 62.6, 62.4, 61.2, 60.3 (O-CH₂Trz, C-6Gal); 50.4, 49.9 (C-6I-II); 47.2 (CH-CH₂-O); 41.2 (CH₂-NH); 31.2 (CH₂-S); 20.8, 20.5 (CH₃-CO), MS (ES⁺): 850 [M+2Na]²⁺/2.

Compound 100. Chromatography with EtOAc to 1:9 MeOH-EtOAc as eluent to afford **100** as a white powder (70%). $[\alpha]_{20}^D +84$ (c 1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.33-7.24 (11 H, m, 2 x HTrz, 9 x HFmoc); 5.75-4.97 (11 H, m, H-1I-II, H-2I-II, 2 x H-1Gal, 2 x H-2Gal, 2 x H-3Gal, 2 x H-4Gal); 4.92-3.18 (92 H, m, H-1I, H-3I-II, H-4I-II, H-5I-II, 2 x H-6I-II, 2 x H-5Gal, 4 x H-6Gal, CH₂-OFmoc, CH-CH₂, 2 x O-CH₂Trz, 32 x CH₂O); 2.97 (2 H, m, CH₂-NH); 2.54 (2 H, m, CH₂-S); 2.1, 2.0, 1.9 (39 H, s, 13 x CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 170.8, 170.7, 170.6, 170.3, 170.1, 170.0 (13 O-COCH₃); 156.8 (O-COFmoc) 144.7, 141.6, 128.4, 127.9, 126.1, 126.0, 125.9, 120.9 (7 x CHFmoc, 2 x C=CHTrz, 2 x CH=CTrz), 100.9 (2 x C-1Gal), 96.3 (C-1II), 82.6

(C-1I), 75.9, 75.6, 71.7, 71.2, 71.1, 70.9, 70.8, 70.6, 70.4, 70.3, 70.2, 70.1, 70.07, 69.9, 69.8, 69.5, 69.4, 69.1, 68.2 (C-2I-II, C-3I-II, C-4I-II, C-5I-II, 2 x C-2Gal, 2 x C-3Gal, 2 x C-4Gal, 2 x C-5Gal, 16 x CH₂O), 66.3 (CH₂-OFmoc), 64.2, 64.0, 62.1 (2 O-CH₂-triazole, 2 C-6Gal), 50.5 (C-6I-II), 47.6 (CH-CH₂-O), 40.9 (CH₂-NH), 30.1 (CH₂-S), 21.5, 21.3, 21.2, 21.1 (13 CH₃-CO); MS (ES⁺): 1181 [M+2Na]²⁺/2.

Compound 104. Chromatography with 8:2 EtOAc-cyclohexane to 1:19 MeOH-EtOAc as eluent to afford **104** as a white powder (72%) [α]_D²⁰ +89 (c 1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.93-7.38 (12 H, m, 3 x HTrz, 9 x HFmoc); 5.72-5.14 (17 H, m, H-1II-III, H-2I-III, 3 x H-1Gal, 3 x H-2Gal, 3 x H-3Gal, 3 x H-4Gal); 3.44 (36H, m, H-1I, H-3I-III, H-4I-III, H-5I-III, 2 x H-6I-III, 3 x H-5Gal, 6 x H-6Gal, CH₂-OFmoc, CH-CH₂, 3 x OCH₂Trz, CH₂-NH); 2.60 (2 H, m, CH₂-S); 2.09, 2.04, 2.01, 2.00, 1.98, 1.94 (57 H, s, 19 x CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 170.8, 170.7, 170.4, 170.3, 170.1, 169.9 (O-CO-CH₃); 156.3 (O-COFmoc); 144.2, 143.8, 141.4, 129.1, 128.7, 128.2, 126.1, 125.9, 122.2, 121.1 (CFmoc, 3 x C=CHTrz, CH=CTrz); 101.7, 101.0 (C-1Gal); 100.1 (C-1II-III); 82.7 (C-1I); 76.1, 75.7 (C-5I-III); 72.8, 71.1, 70.9, 70.6, 70.1, 69.9, 69.6, 69.1, 68.9, 68.6, 67.5 (C-2I-III, C-3I-III, C-4I-III, C-2Gal, C-3Gal, C-4Gal, C-5Gal); 66.6 (CH₂-OFmoc); 62.9, 62.3, 61.7, 60.9 (O-CH₂Trz, C-6Gal); 51.1, 50.2 (C-6I-III); 47.4 (CH-CH₂-O); 41.0 (CH₂-NH); 31.4 (CH₂-S); 20.8, 20.5, 20.2, 19.9 (CH₃-CO); MS (ES⁺): 1179 [M+2 Na]²⁺/2.

Compound 105 (n = 3). Chromatography with 8:2 EtOAc-cyclohexane to 1:9 MeOH-EtOAc as eluent to afford **105** as a white powder (67%) [α]_D²⁰ +89 (c 1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.10-7.35 (12 H, m, 3 x HTrz, 9 x HFmoc); 5.29-4.97 (17 H, m, H-1II-III, H-2I-III, 3 x H-1Gal, 3 x H-2Gal, 3 x H-3Gal, 3 x H-4Gal); 4.92-3.34 (70 H, m, H-1I, H-3I-III, H-4I-III, H-5I-III, 2 x H-6I-III, 3 x H-5Gal, 6 x H-6Gal, CH₂-OFmoc, CHCH₂, 3 x O-CH₂Trz, 18 CH₂O); 2.90 (2 H, m, CH₂-NH); 2.51 (2 H, m, CH₂-S); 2.12, 2.02, 2.01, 2.00, 1.97, 1.95 (57 H, s, 19 x CH₃); ¹³C NMR (125 MHz,

DMSO- d_6): δ = 170.9, 170.7, 170.4, 170.1, 170.0 (O-CO-CH₃); 156.8 (O-COFmoc); 144.7, 141.6, 128.7, 128.5, 127.9, 126.5, 126.4, 126.0, 120.9 (CFmoc, C=CHtriazole, CH=Ctriazole); 101.0, 100.9 (C-1Gal); 96.2 (C-1II-III); 82.3 (C-1I); 71.1, 70.8, 70.7, 70.6, 70.6, 70.5, 70.2, 70.0, 69.9, 69.8, 69.8, 69.1, 69.0, 68.3 (C-2I-III, C-3I-III, C-4I-III, C-5I-III, C-2Gal, C-3Gal, C-4Gal, C-5Gal, CH₂O); 64.2 (CH₂-OFmoc); 62.1 (OCH₂Trz, C-6Gal); 50.9 (C-6I-III); 47.6 (CH-CH₂-O); 41.0, 40.9 (CH₂-NH); 29.4 (CH₂-S); 21.4, 21.3, 21.2, 20.8, 20.5 (CH₃-CO); MS (ES⁺): 1378 [M+2Na]²⁺/2.

Compound 106. Chromatography with 8:2 EtOAc-cyclohexane to 2:8 MeOH-EtOAc as eluent to afford **106** as a white powder (65%). $[\alpha]_D^{20} +98$ (c 1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.90-7.34 (12 H, m, HTrz, 9 x HFmoc); 5.27-4.90 (17 H, m, H-1II-III, H-2I-III, 3 x H-1Gal, 3 x H-2Gal, 3 x H-3Gal, 3 x H-4Gal); 3.18 (130 H, m, H-1I, H-3I-III, H-4I-III, H-5I-III, 2 x H-6I-III, 3 x H-5Gal, 6 x H-6Gal, CH₂-OFmoc, CH-CH₂, 3 x O-CH₂Trz, 48 x CH₂O); 2.51 (4 H, m, CH₂-NH, CH₂-S); 2.12, 2.02, 2.01, 2.00, 1.97, 1.95 (57 H, s,x CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 170.8, 170.7, 170.3, 170.1, 170.0 (O-COCH₃); 156.8 (O-COFmoc); 144.9, 144.7, 141.6, 128.4, 127.9, 126.4, 126.0, 125.9, 120.9 (CFmoc, 3 x C=CHtriazole, 3 x CH=Ctriazole); 100.9 (3 x C-1Gal); 96.5, 96.2 (C-1II-III); 82.2 (C-1I); 75.9, 75.3, 75.2, 73.1, 71.6, 71.5, 71.4, 71.1, 70.7, 70.6, 70.4, 70.2, 70.1, 70.0, 69.9, 69.8, 69.7, 69.5, 69.4, 69.1, 68.2 (C-2I-III, C-3I-III, C-4I-III, C-5I-III, 3 x C-2Gal, C-3Gal, C-4Gal, C-5Gal, CH₂O); 64.2, 64.0 (CH₂-OFmoc); 62.1, 61.0 (O-CH₂Trz, C-6Gal); 50.5, 50.4, 49.4 (C-6I-III); 47.6 (CH-CH₂-O); 41.0, 40.9 (CH₂-NH); 30.0 (CH₂-S); 21.4, 21.3, 21.2, 20.8, 20.5 (CH₃-CO); MS (ES⁺): 1378 [M+2Na]²⁺/2.

General procedure for the deprotections: Compound **92** (120 mg, 0.12 mmol) was dissolved in methanolic ammonia 7 N (20 mL), and the mixture was stirred at rt for 24 h. After evaporation under reduced pressure, the residue was dissolved in diethyl ether (10 mL) and water (10 mL). The aqueous phase was extracted with diethyl ether (2 x

20mL) and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by HPLC (conditions A) to afford **95** (58 mg, 72%, $t_r = 20$ min).

Compound 95. $[\alpha]_D^{20} +26$ (c 1, H₂O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) $\delta = 8.06$ (1 H, s, HTrz), 4.96 (1 H, m, H-6aGal), 4.80 (2 H, m, H-6bGal, H-6a); 4.52 (1 H, m, H-6b); 4.40 (2 H, m, H-1, H-1Gal); 3.90-3.20 (10 H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-2Gal, H-3Gal, H-4Gal, H-5Gal, CH₂Trz); 2.50 (4 H, m, CH₂-NH₂, CH₂-S); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 143.6$ (C=CHtriazole); 126.3 (CH=Ctriazole); 102.1 (C-1Gal); 85.7 (C-1); 77.4 (C-5); 75.2 (C-3); 72.7, 72.1, 70.9, 70.1, 68.6 (C-2, C-4, C-2Gal, C-3Gal, C-4Gal, C-5Gal) 61.8 (O-CH₂Trz); 61.0 (C-6Gal); 51.2 (C-6); 40.4 (CH₂-NH₂); 32.8 (CH₂-S); HRMS (ES⁺): Found 505.1588 C₁₇H₃₀N₄O₁₀SNa requires 505.1580.

Compound 96 (n = 3). Purification by HPLC (conditions A) to afford **96** (78%, $t_r = 34$ min). $[\alpha]_D^{20} +26$ (c 1, H₂O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) $\delta = 8.02$ (1 H, s, HTrz); 4.82 (4 H, m, 2 x H-6, 2 x H-6Gal); 4.35 (2 H, m, H-1, H-1Gal); 3.90-3.20 (10 H, m, H-2, 3, 4, 5, H-2Gal, 3Gal, 4Gal, 5Gal, 6 x CH₂O, CH₂Trz); 2.50 (4 H, m, CH₂-NH₂, CH₂-S); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta = .9$ (C=CHtriazole); 126.1 (CH=Ctriazole); 102.8 (C-1Gal); 85.6 (C-1); 77.4 (C-5); 76.9, 75.1, 72.7, 72.1, 70.8, 70.7, 69.7, 69.5, 69.0, 68.9, 68.6 (C-2, C-3, C-4, C-2Gal, C-3Gal, C-4Gal, C-5Gal, 6 x CH₂O) 63.0 (C-6Gal); 60.9 (O-CH₂Trz); 51.2 (C-6); 40.2 (CH₂-NH); 32.1 (CH₂-S); HRMS (ES⁺): Found 637.2352 C₂₃H₄₂N₄O₁₃SNa requires 637.2367.

Compound 97 (n = 8). Purification by HPLC (conditions A) to afford **97** (70%, $t_r = 48$ min). $[\alpha]_D^{20} +21$ (c 1, H₂O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) $\delta = 7.98$ (1 H, s, HTrz); 4.73-4.33 (4 H, m, 2 x H-6, 2 x H-6Gal); 4.31-4.28 (2 H, m, H-1, H-1Gal); 3.90-3.14 (42 H, m, H-2, 3, 4, 5, H-2Gal, 3Gal, 4Gal, 5Gal, 16 x CH₂O, CH₂Trz); 2.50 (4 H, m, CH₂-NH₂, CH₂-S); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 144.6$ (C=CHTrz); 125.8 (CH=Ctriazole); 104.4 (C-1Gal); 85.8 (C-1); 78.8, 78.9, 76.7, 74.2, 73.2, 73.0, 72.9, 72.6,

72.3, 71.7, 71.3, 70.6, 70.5, 70.4, 69.9, 69.8, 69.7, 69.5, 68.9, 68.5 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2Gal, C-3Gal, C-4Gal, C-5Gal, 16 x CH₂O) 64.3 (C-6Gal); 60.9 (O-CH₂Trz); 51.9 (C-6); 41.0 (CH₂-NH₂); 30.1 (CH₂-S); HRMS (ES⁺): Found 857.3663 C₃₃H₆₂N₄O₁₈SNa requires 857.3677.

Compound 101. Purification by HPLC (conditions A) to afford **23** (74%, t_r = 24 min). [α]_D²⁰ +32 (c 1, H₂O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.06, 7.95 (2 H, s, 2 x HTrz); 5.28 (1 H, d, J 3 Hz, H-1II); 5.08 – 4.25 (11 H, m, H-1I, 2 x H-6I-II, 2 x H-1Gal, 4 x H-6Gal); 4.12-3.14 (20 H, m, H-2I-II, H-3I-II, H-4I-II, H-5I-II, 2 x H-2Gal, 2 x H-3Gal, 2 x H-4Gal, 2 x H-5Gal, 2 x O-CH₂Trz); 2.47 (4 H, m, CH₂-S, CH₂-NH₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 143.7, 143.6 (2 C=CHtriazole); 126.7, 126.0 (2 x CH=Ctriazole); 102.3, 102.1 (2 x C-1Gal); 100.9 (C-1II); 85.6 (C-1I); 75.3, 75.0 (C-5I-II); 72.8, 72.7, 72.4, 71.9, 71.7, 71.5, 70.9, 70.6, 68.6, 68.6 (C-2I-II, C-3I-II, C-4I-II, 2 x C-2Gal, 2 x C-3Gal, 2 x C-4Gal, 2 x C-5Gal); 61.8, 61.5, 61.0 (2 x O-CH₂Trz, 2 x C-6Gal); 51.4, 50.6 (C-6I-II); 40.2 (CH₂-NH); 32.1 (CH₂-S); HRMS (ES⁺): Found 910.2957 C₃₂H₅₃N₇O₂₀SNa requires 910.2964.

Compound 102 (n = 3). Purification by HPLC (conditions A) to afford **102** (72%, t_r = 34 min). [α]_D²⁰ +30 (c 1, H₂O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.03, 7.91 (2 H, s, 2 x HTrz); 5.29 (1 H, d, J 3 Hz, H-1II); 4.92-4.29 (11 H, m, H-1I, 2 x H-1Gal, 2 x H-6I-II, 4 x H-6Gal); 4.05-3.12 (44 H, m, H-2I-II, H-3I-II, H-4I-II, H-5I-II, 2 x H-2Gal, 2 x H-3Gal, 2 x H-4Gal, 2 x H-5Gal, 12 x CH₂O, 2 x OCH₂Trz); 2.40 (4 H, m, CH₂-S, CH₂-NH₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 143.9, 143.7 (2x C=CHtriazole); 126.4, 125.9 (2 x CH=Ctriazole); 102.8, 102.3 (2 x C-1Gal); 100.9 (C-1II); 85.4 (C-1I); 77.4, 77.0, 75.9, 75.6, 75.5, 75.1, 73.1, 72.7, 72.4, 72.1, 71.4, 71.5, 70.9, 70.7, 69.7, 69.6, 69.2, 69.0, 68.6, 68.0 (C-2I-II, C-3I-II, C-4I-II, C-5I-II, 2 x C-2Gal, 2 x C-3Gal, 2 x C-4Gal, 2 x C-5Gal, 12 x CH₂O); 63.0, 62.8, 61.5, 60.9 (2 x O-CH₂Trz, 2 x C-6Gal); 51.4, 50.6 (2 x

C-6I-II); 40.2 (CH₂-NH); 32.7 (CH₂-S); HRMS (ES⁺): Found 1174.4562 C₄₄H₇₇N₇O₂₆SNa requires 1174.4536.

Compound 103 (n = 8). Purification by HPLC (conditions A) to afford **103** (72%, *t_r* = 49 min). [α]_D²⁰ +35 (c 1, H₂O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.99, 7.89 (2 H, s, 2 x HTrz); 5.19 (1 H, d, J 3 Hz, H-1II); 4.80-3.88 (11 H, m, H-1I, 2 x H-6I-II, 2 x H-1Gal, 4 x H-6Gal); 3.86- 2.89 (84 H, m, H-2I-II, H-3I-II, H-4I-II, H-5I-II, 2 x H-2Gal, 2 x H-3Gal, 2 x H-4Gal, 2 x H-5Gal, 32 x CH₂O, 2 x OCH₂Trz); 2.47 (4 H, m, CH₂-S, CH₂-NH₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 144.5, 144.4 (2C=CHTrz); 125.8 (2 x CH=Ctriazole); 104.4 (2 x C-1Gal); 101.6 (C-1II); 85.5 (C-1I); 81.8, 78.2, 76.5, 76.0, 74.3, 73.5, 73.2, 72.9, 72.6, 72.0, 71.3, 70.6, 70.5, 69.8, 69.0, 68.5 (C-2I-II, C-3I-II, C-4I-II, C-5I-II, 2 x C-2Gal, 2 x C-3Gal, 2 x C-4Gal, 2 x C-5Gal, 32 x CH₂O); 64.3, 64.1, 61.3, 61.0 (2 x OCH₂Trz, 2 x C-6Gal); 51.6 (C-6I-II); 40.5 (CH₂-NH); 32.7 (CH₂-S); HRMS (ES⁺): Found 1592.7389 C₆₄H₁₁₇N₇O₃₆SH requires 1592.7339.

Compound 107. Purification by HPLC (conditions A) to afford **107** (60%, *t_r* = 24 min). [α]_D²⁰ +26 (c 1, H₂O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.16, 7.92 (3 H, s, 3 x HTrz); 5.25-5.16 (2 H, d, H-1II-III); 4.93-3.91 (16 H, m, H-1I, 3 x H-1Gal, 2 x H-6I-III, 6 x H-6Gal); 3.71- 2.85 (30 H, m, H-2I-III, H-3I-III, H-4I-III, H-5I-III, 3 x H-2Gal, 3 x H-3Gal, 3 x H-4Gal, 3 x H-5Gal, 3 x O-CH₂Trz); 2.37 (4 H, m, CH₂-S, CH₂-NH₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 144.5, 144.4 (3 x C=CHtriazole); 126.2, 126.1 (3 x CH=CTrz); 103.7, 103.6, 103.5 (3 x C-1Gal); 101.7, 101.1 (C-1II-III); 85.6 (C-1I); 77.9, 76.1 (C-5I-III); 74.2, 73.6, 73.2, 72.9, 72.5, 72.2, 71.9, 71.4, 70.6, 69.1 (C-2I-III, C-3I-III, C-4I-III, C-2Gal, C-3Gal, C-4Gal, C-5Gal); 62.3, 62.0, 61.4 (O-CH₂Trz, C-6Gal); 51.5, 50.8 (C-6III); 40.2 (CH₂-NH₂); 32.1 (CH₂-S); HRMS (ES⁺): Found 1315.4285 C₃₂H₅₃N₇O₂₀SNa requires 1315.4347.

Compound 108 (n = 3). Purification by HPLC (conditions A) to afford **108** (76%, $t_r = 37$ min). $[\alpha]_D^{20} +36$ (c 1, H₂O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) $\delta = 8.16, 7.92$ (3 H, s, 3 x HTrz); 5.25-5.16(2 H, d, H-1II-III); 4.93- 3.91 (16 H, m, H-1I, 3 x H-1Gal, 2 x H-6I-III, 6 x H-6Gal); 3.71-2.85 (68 H, m, H-2I-III, H-3I-III, H-4I-III, H-5I-III, 3 x H-2Gal, 3 x H-3Gal, 3 x H-4Gal, 3 x H-5Gal, 18 x CH₂-O, 3 x OCH₂Trz); 2.37 (4 H, m, CH₂-S, CH₂-NH₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 144.5, 144.4$ (3x C=CHTrz); 126.0, 125.8 (3 x CH=CTrz); 103.9 (3 x C-1Gal); 99.6 (C-1II-III); 85.4 (C-1I); 81.7, 77.9, 77.7, 77.5, 76.2, 74.2, 73.5, 73.2, 72.9, 72.5, 72.2, 71.9, 70.9, 70.6, 70.3, 70.1, 70.5, 70.4, 69.8, 69.7, 68.6 (C-2I-III, C-3I-III, C-4I-III, C-5I-III, 3 x C-2Gal, 3 x C-3Gal, 3 x C-4Gal, 3 x C-5Gal, 18 x CH₂O); 64.4, 64.1 (3 x C-6Gal); 61.9 (3 x O-CH₂Trz); 51.6, 50.8 (C-6I-III); 40.8 (CH₂-NH); 30.9 (CH₂-S); HRMS (ES⁺): Found 1711.6668 C₆₅H₁₁₂N₁₀O₃₉SNa requires 1711.6707.

Compound 109 (n = 8). Purification by HPLC (conditions A) to afford **109** (76%, $t_r = 48$ min). $[\alpha]_D^{20} +36$ (c 1, H₂O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) $\delta = 8.16, 7.92$ (3 H, s, 3 x HTrz); 5.27-5.19(2 H, d, H-1II-III); 4.97-3.86 (16 H, m, H-1I, 3 x H-1Gal, 2 x H-6I-III, 6 x H-6Gal); 3.65-2.79 (128 H, m, H-2I-III, H-3I-III, H-4I-III, H-5I-III, 3 x H-2Gal, 3 x H-3Gal, 3 x H-4Gal, 3 x H-5Gal, 48 x CH₂-O, 3 x O-CH₂Trz); 2.45 (4 H, m, CH₂-S, CH₂-NH₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 144.4$ (3 x C=CHTrz); 125.7 (3 x CH=CTrz); 104.4 (3 x C-1Gal); 101.8, 101.1 (C-1II-III); 85.4 (C-1I); 81.8, 76.0, 74.3, 73.2, 71.3, 70.6, 69.8, 69.0, 68.5 (C-2I-III, C-3I-III, C-4I-III, C-5I-III, 3 x C-2Gal, 3 x C-3Gal, 3 x C-4Gal, 3 x C-5Gal, 48 x CH₂O); 64.1 (3 x C-6Gal); 61.3 (3 x O-CH₂-Trz); 51.6, 50.8 (C-6I-III); 40.8 (CH₂-NH₂); 30.1 (CH₂-S); HRMS (ES⁺): Found 2372.0616 C₉₅H₁₇₁N₁₀O₅₄SNa requires 2372.0640.

General procedure for the synthesis of heptavalent derivatives 113-115:

Compound **91** (100 mg, 0.03 mmol), compound **85** (100 mg, 0.26 mmol), CuSO₄ (21 mg, 0.15 mmol) and sodium ascorbate (60 mg, 0.30 mmol) were dissolved in dioxane (2 mL) and water (0.5 mL). The mixture was stirred under MW irradiation at 70°C for 30

minutes. After evaporation to dryness, the residue was dissolved in DCM (5 mL) and filtered. After evaporation under reduced pressure, the residue was dissolved in DCM (2 mL) and a solution of ammonia 7N in MeOH was added (20 mL). The mixture was stirred at room temperature for 24 h. After evaporation under reduced pressure, the residue was dissolved in water (10 mL) and the aqueous layer washed with diethyl ether (3 x 20 mL). The aqueous phase was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by HPLC with conditions A to afford **113** (46 mg, 52%, t_r : 20 min).

$[\alpha]_D^{20} +40$ (c 1, H₂O); ¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ = 7.88 (7 H, s, 7 x Htrz); 5.27 (6 H, m, H-1II-VII); 4.59-3.06 (106 H, m, H-1I, H-2I-VII, H-3I-VII, H-4I-VII, H-5I-VII, 2 x H-6I-VII, 7 x H-1Gal, 7 x H-2Gal, 7 x H-3Gal, 7 x H-4Gal, 7 x H-5Gal, 14 x H-6Gal, 7 x O-CH₂-trz); 2.84-2.61 (4 H, m, CH₂-NH, CH₂-S); ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): δ = 143.8, 143.3 (7 x C=CHtrz); 127.2, 126.9, 125.8 (7 x CH=Ctriazol); 104.4 (7 x C-1Gal); 102.9, 101.8, 100.4 (C-1II-VII); 85.4 (C-1I); 80.1, 79.8, 75.9, 75.6, 75.3, 75.2, 75.1, 73.1, 72.7, 72.6, 71.5, 71.3, 71.0, 70.7, 70.6, 69.7, 69.5, 69.4, 69.3, 69.2, 69.1, 69.0, 68.6 (C-2I-VII, C-3I-VII, C-4I-VII, C-5I-VII, 7 x C-2Gal, 7 x C-3Gal, 7 x C-4Gal, 7 x C-5Gal); 62.4, 62.0 (7 x C-6Gal); 60.9 (7 x O-CH₂trz); 51.4, 50.6 (C-6I-VII); 39.3 (CH₂-NH); 27.5 (CH₂-S); MS: [M+2Na]⁺ /2: 1480.

Compound 114. Purification by HPLC (conditions A) to afford **114** (51%, t_r = 35 min). $[\alpha]_D^{20} +45$ (c 1, H₂O); ¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ = 7.88 (7 H, 7 s, Htrz); 5.23 (6 H, m, H-1II-VII); 4.51-3.14 (190 H, m, H-1I, H-2I-VII, H-3I-VII, H-4I-VII, H-5I-VII, 2 x H-6I-VII, 7 x H-1Gal, 7 x H-2Gal, 7 x H-3Gal, 7 x H-4Gal, 7 x H-5Gal, 14 x H-6Gal, 7 x O-CH₂-trz, 42 x CH₂O); 2.84-2.61 (4 H, m, CH₂-NH, CH₂-S); ¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ = 143.6 (C=CHtrz); 126.2, 125.9, 125.8 (CH=Ctrz); 103.2 (C-1Gal); 100.6, 100.4 (C-1II-VII); 85.4 (C-1I); 80.1, 79.8, 75.9, 75.6, 75.3, 75.2, 75.1, 73.1, 72.7, 72.6, 71.5, 71.3, 71.0, 70.7, 70.6, 69.7, 69.5, 69.4, 69.3, 69.2, 69.1, 69.0, 68.6 (C-2I-VII, C-3I-VII, C-4I-VII, C-5I-VII, C-2Gal, C-3Gal, C-4Gal, C-5Gal, CH₂O); 64.4, 64.0 (C-6Gal); 61.4 (O-CH₂-

trz); 51.4, 50.6 (C-6I-VII); 34.3 (CH₂-NH); 27.5 (CH₂-S); HRMS (ES⁺): Found : 3860.5386 C₁₄₉H₂₄₉N₂₂O₉₁SNa₃ requires 2372.0640.

Compound 115. Purification by HPLC (conditions A) to afford **115** (58%, t_r = 49 min). [α]_D²⁰ +41 (c 1, H₂O); ¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ = 7.88 (7 H, 7 x s, Htrz); 5.27 (6 H, m, H-1IIVII); 5.43-3.13 (330 H, m, H-1I, H-2I-VII, H-3I-VII, H-4I-VII, H-5I-VII, 2 x H-6I-VII, 7 x H-1Gal, 7 x H-2Gal, 7 x H-3Gal, 7 x H-4Gal, 7 x H-5Gal, 14 x H-6Gal, 7 x O-CH₂-trz, 112 x CH₂O); 2.84-2.61 (4 x H,m, CH₂-NH, CH₂-S); ¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ = 143.6 (C=CHtrz); 126.2, 125.9, 125.8 (CH=Ctrz); 103.2 (C-1Gal); 100.6, 100.4 (C-1II-VII); 85.4 (C-1D); 80.1, 79.8, 75.9, 75.6, 75.3, 75.2, 75.1, 73.1, 72.7, 72.6, 71.5, 71.3, 71.0, 70.7, 70.6, 69.7, 69.5, 69.4, 69.3, 69.2, 69.1, 69.0, 68.6 (C-2I-VII, C-3I-VII, C-4I-VII, C-5I-VII, 7 x C-2Gal, 7 x C-3Gal, 7 x C-4Gal, 7 x C-5Gal, 112 x CH₂O); 64.4, 64.0 (7 x C-6Gal); 61.4 (7 x O-CH₂-trz); 51.4, 50.6 (C-6I-VII); 39.5 (CH₂-NH); 28.4 (CH₂-S); MS: [M + 2Na]⁺ /2: 2713.

¹ Sybyl-X 1.2, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.

² a) SYBYL, version 8.0; Tripos: St. Louis, MO, USA, **2007**; b) M. Clark, R. D. III. Cramer, O. N. J. Van, *Comput. Chem.* **1989**, *10*, 982-1012.

³ a) Di Marino, F. Mendicuti, *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 1579-1587; b) M. J. González-Álvarez, P. Balbuena, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13717-13729; c) M. J. González-Álvarez, J. Vicente, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 975-988; d) T. Carmona, J. M. González-Álvarez, J. M. Mendicuti Madrid, F. Mendicuti, W. L. Mattice, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2037-2044; e) J. M. Madrid, F. Mendicuti, *F. Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 1621-1627; f) A. Di Marino, F. Mendicuti, *J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *58*,

295-305; g) J. M. Madrid, J. Pozuelo, F. Mendicuti, W. L. Mattice, *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, 193, 112-120.

⁴ a) A. Di Marino, F. Mendicuti, *Appl. Spectrosc.* **2004**, 58, 823-830; b) M. J. González-Álvarez, A. Di Marino, F. Mendicuti, *J. Fluoresc.* **2009**, 19, 449-462. c) C. Alvariza, R. Usero, F. Mendicuti, *Spectrochim. Acta, Part A* **2007**, 67, 420-429; d) R. Usero, C. Alvariza, M. J. González-Álvarez, F. Mendicuti, *J. Fluoresc.* **2008**, 18, 1103-1114.

⁵ Y. Brunel, H. Faucher, D. Gagnaire, A. Rassat, *Tetrahedron* **1975**, 31, 1075-1091.

⁶ M. Blanco, *J. Comput. Chem.* **1991**, 12, 237-247.

⁷ J. Gasteiger, M. Marsili, *Tetrahedron* **1980**, 36, 3219-3228.

⁸ 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, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 12871-12888.

⁹ T. Magnusson, R. Haasel, M. Schleaf, E. Wagner, M. Ogris, *J. Gen Med.* **2011**, 13, 382-391.

¹⁰ M. R. Duff, J. Grubbs, E. E. Howell, *JoVe* 2011, 55, 2796.

¹¹ (a) M. Skiba, D. Wouessidjewe, F. Puisieux, D. Duchêne, A. Gulik, A. *Int. J. Pharm.* **1996**, 142, 121-124. (b) H. C. Fessi, J.-P. Devissaguet, F. Puisieux, C. U. S. Thies, USA Patent 5, 118, 528, June 2, **1992**.

¹² I. Baussanne, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. Defaye, *ChemBioChem* **2001**, 2, 777-783.

¹³ A. Ebner, L. Wildling, A. S. M. Kamruzzahan, C. Rankl, J. Wruss, C. D. Hahn, M. Hçlzl, Z. Rong, F. Kienberger, D. Blaas, P. Hinterdorfer, H. G. Gruber, *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 1176-84.

¹⁴ G. Zemplén, E. Pascu, *Ver. Deut. Chem. Ges.* **1929**, 62, 1613-1614.

¹⁵ García Fernández, J. M.; Ortiz Mellet, C.; Jiménez Blanco, J. L.; Fuentes, J.; Gabelle, A.; Coste-Sarguet, A.; Defaye, J. *Carbohydr. Res.* **1995**, 268, 57-71.

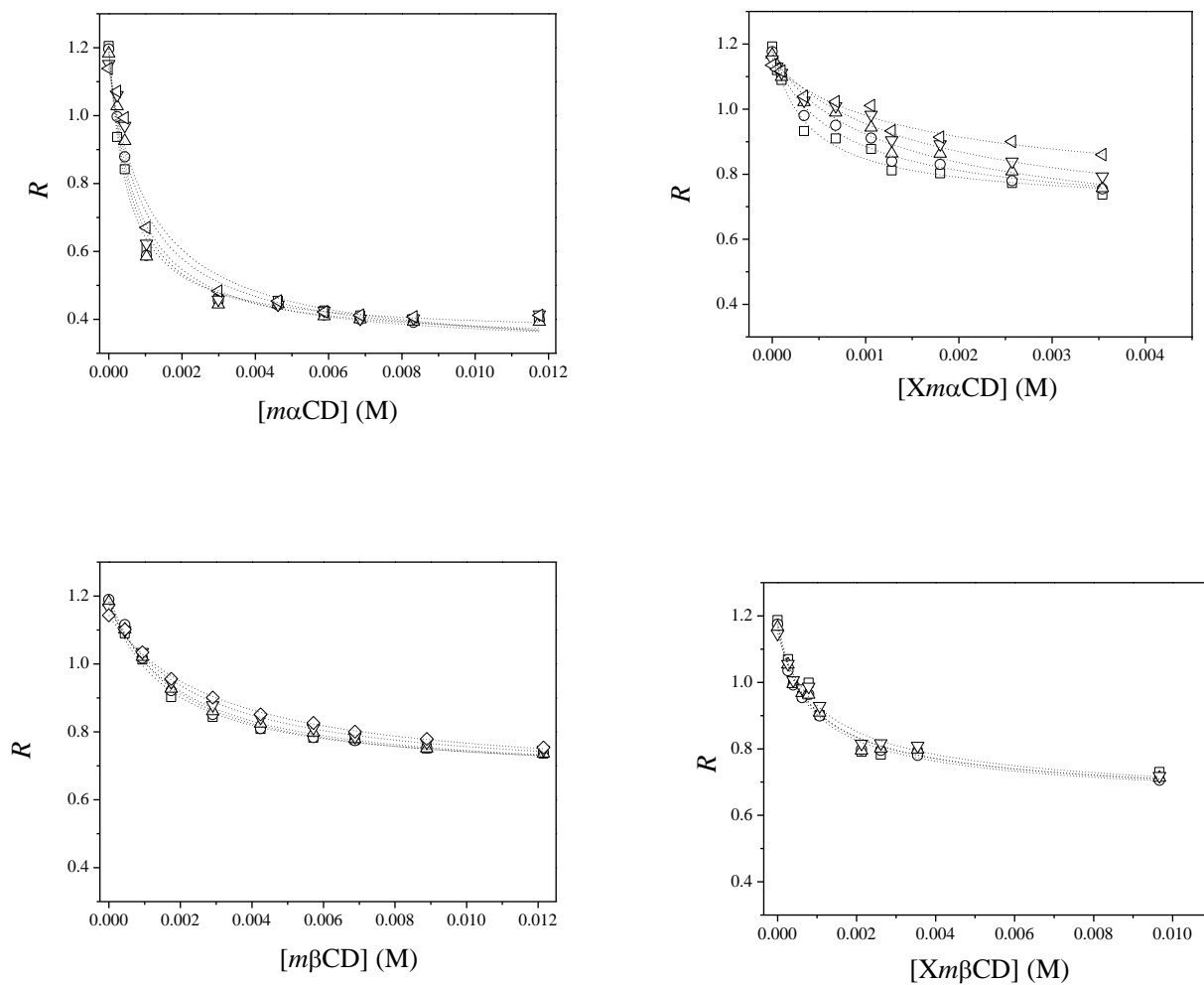
¹⁶ S. Choon, T. Ong, P. Fu, C. B. Ching, *J. Chromatogr. A.* **2002**, 968, 31-40.

-
- ¹⁷ B. Ekberg, L. I. Andersson and K. Mosbach, *Carbohydr. Res.*, **1989**, *192*, 111-117.
- ¹⁸ 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, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12871-12888
- ¹⁹ V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi¹, Michela Lomazzi¹, Gaetano Donofrio², Francesco Sansone¹, A. Casnati, R. Ungaro, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1721-1728.
- ²⁰ A. Gadelle, J. Defaye, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 94-95; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 78-80.
- ²¹ F. Sansone, M. Dudic, G. Donofrio, C. Rivetti, L. Baldini, A. Casnati, S. Cellai, R. Ungaro, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14528-14536.
- ²² J. M. Benito, M. Gómez García, C. Ortiz Mellet, I. Baussanne, J. Defaye, J. M. García Fernández, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10355-10.363.
- ²³ A. Méndez-Ardoy, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, F. Santoyo-González, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández. *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 5882-5894.
- ²⁴ H. Ihm, K. Paek, *Bull. Korean Chem. Soc.* **1995**, *16*, 71-73.
- ²⁵ E. Nomura, A. Hosoda, M. Takagaki, H. Mori, Y. Miyake, M. Shibakami, H. Taniguchi, *Langmuir* **2010**, *26*, 10266-10270.
- ²⁶ J. Rodríguez-Lavado, M. de la Mata Fernández, J. L. Jiménez Blanco, M. I. García-Moreno, J. M. Benito, A. Díaz-Quintana, J. A. Sánchez Alcázar, K. Higaki, E. Nanba, K. Ohno, Y. Suzuki, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 2289-2301.
- ²⁷ D. M. Kneeland, K. Ariga, V. M. Lynch, C. Y. Huang, E. V. Anslyn *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10042-10055.
- ²⁸ T. Kaneda, T. Fuyimoto, J. Goto, K. Asano, J. H. J. Yasafuku, C. Ozono, Y. Sakata, *Chem. Letters*, **2002**, 514-515.

-
- ²⁹ A. W. Schwabacher, J.W. Lane, M.W. Schiescher, K. M. Leigh, C. W. Johnson, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1727-1729.
- ³⁰ Li, G.; Tajima, H. and Ohtani, T. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4539-4540.
- ³¹ H. Munch, J. S. Hansen, M. Pittelkow, J. B. Christensen, U. Boas, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3117–3119.
- ³² A. Méndez-Ardoy, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, N. Sevillano, M. D. Girón, R. Salto, F. Santoyo-González, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2681-2684.
- ³³ A. Megía-Fernández, M. Ortega-Muñoz, J. López-Jaramillo, F. Hernández-Mateo, F. Santoyo-González, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 3306-3320.
- ³⁴ (a) M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015. (b) B. T. Houseman, M. Mrksich, *Top. Curr. Chem.* **2002**, *218*, 1-44.
- ³⁵ H. B. Merelyala, S. R. Gurrula, *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 351-354.
- ³⁶ O. Michel, B. Jan Ravoo, *Langmuir*, **2008**, *24*, 12116-12118

ANEXO 1.

Figure A1. Ratios R of band intensities vs. [CD] for 2MN/xylylene-CD and permethylated-CD water solutions at several temperatures. Dashed lines were obtained by adjusting the experimental data to equations for 2MN/ m CD and 2MN/ Xm CD, respectively. Symbols are: 5 °C (\square); 15 °C (\circ); 25 °C (\triangle), 35 °C (∇) and 45°C (\diamond).



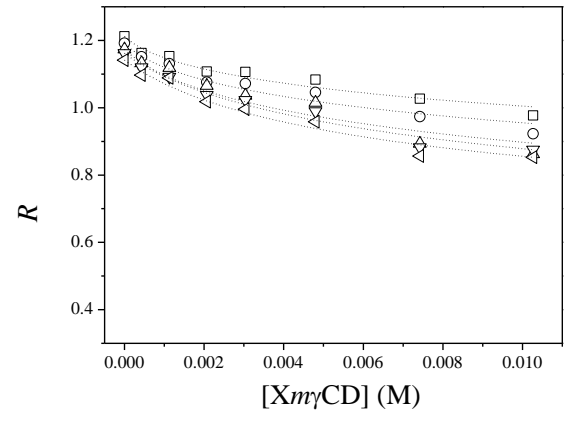
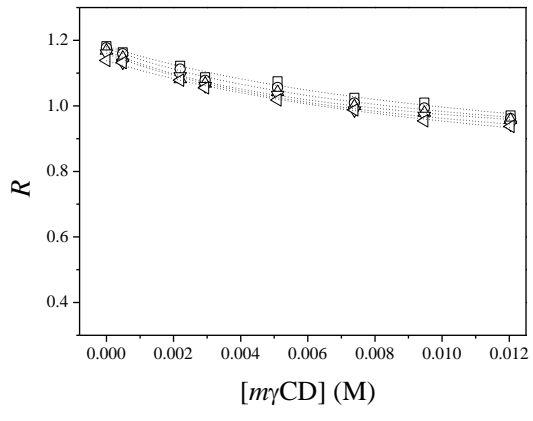


TABLE A1. Association constants K , R_∞ and Φ parameters obtained from steady state measurements in the 5-45° C range. Values were obtained from the non-linear (**and linear**) adjustments.

T(°C)	$\Phi(=\phi_{c,1}/\phi_{t,1})$	R_∞	K (M ⁻¹)
2MN/mαCD			
5	2.64	0.35±0.01(0.36±0.02)	736±47 (799±30)
15	2.60	0.33±0.02 (0.35±0.03)	629±75(683±43)
25	2.59	0.31±0.03(0.33±0.05)	552±93(534±40)
35	2.58	0.30±0.04(0.34±0.09)	404±92 (466±59)
45	2.50	0.29±0.04(0.27±0.12)	355±75 (361±47)
2MN/XmαCD			
5	1.0	0.66±0.03 (0.66±0.18)	2288±421 (2559±432)
15	0.98	0.60±0.04 (0.64±0.23)	1305±244 (1594±266)
25	0.81	0.59±0.1 (0.61±0.39)	1037±379 (1344±387)
35	0.90	0.66±0.07 (0.65±0.49)	865±250 (897±254)
45	0.93	0.63±0.08 (0.67±0.74)	510±143 (553±176)
2MN/mβCD			
5	4.8	0.67±0.01 (0.67±0.07)	123±11 (122±2)
15	4.9	0.66±0.01 (0.65±0.13)	111±10 (102±3)
25	4.9	0.66±0.01 (0.65±0.07)	101±6 (97±1)
35	4.8	0.66±0.01 (0.66±0.07)	88±5 (88±1)
45	4.9	0.65±0.02 (0.66±0.07)	64±6 (69±1)
2MN/XmβCD			
5	4.0	0.62±0.03 (0.64±0.13)	351±45 (398±13)
15	4.0	0.61±0.02 (0.61±0.07)	356±30 (332±5)
25	4.1	0.61±0.03 (0.61±0.13)	281±34 (275±7)
35	4.0	0.61±0.02 (0.61±0.14)	222±25 (213±5)
2MN/mγCD			
5	1.4	0.92±0.05(0.81±0.67)	124±53 (73±11)
15	1.4	0.87±0.03(0.78±0.48)	111±22 (71±8)
25	1.4	0.83±0.03(0.86±0.24)	95±16 (150±10)
35	1.4	0.78±0.05(0.83±0.68)	79±21 (102±16)
45	1.3	0.74±0.08(0.73±0.35)	61±14 (63±6)
2MN/XmγCD			
5	2.2	0.73±0.22	122±84 (89±29)
15	2.2	0.65±0.21	119±68 (36±16)
25	2.3	0.59±0.34	96±87 (4±12)
35	2.1	0.62±0.16	87 ±42 (61±13)
45	2.2	0.57±0.16	75±35 (44±13)

TABLE A2. Some geometrical parameters, binding energies (and contributions), interaction energies between xylylene CD moiety and 2MN, as well as total energy (and contributions) for the structure of the complexes of minimum binding energy obtained by MM. Two approaches polar (P) and **non-polar (NP)** were considered.

Parameters	PXm α CD	PXm β CD	PXm γ CD	Pm α CD	Pm β CD	Pm γ CD
	NPXm α CD	NPXm β CD	NPXm γ CD	NPm α CD	NPm β CD	NPm γ CD
d (Å) (y coordinate)	+0.2	+1.9	+0.5	+3.8	+2.2	+2.1
	-2.0	-3.4	-1.0	-3.0	-1.8	+0.4
d' (Å)	5.9	7.0	7.2	---	---	---
	8.1	10.8	8.1	---	---	---
θ (°)	-37.1	-29.1	-43.8	38.4	-19.6	7.0
	-92.9	-30.8	-34.7	27.4	-18.1	6.8
δ (°)	118.7	79.3	133.7	72.7	76.5	103.6
	94.3	95.5	80.4	99.4	99.0	128.5
E_{bin} (kJmol ⁻¹)	-109.6	-70.9	-54.8	-89.5	-66.5	-55.5
	-81.4	-75.1	-51.9	-77.6	-69.3	-53.4
Electrostatics	-16.9	2.8	2.8	-7.8	5.2	-1.4
	-14.8	-2.5	1.8	-12.3	-6.3	-1.3
van der Waals	-92.7	-73.7	-57.6	-81.7	-71.7	-54.1
	-66.6	-72.6	-53.7	-65.3	-63.0	-52.1
E_{int} Xy-2MN (kJmol ⁻¹)	-8.0	-4.3	-10.5	---	---	---
	-1.0	-0.4	+8.6	---	---	---
E_{tot} (kJmol ⁻¹)	431.0	501.9	617.6	384.7	488.7	555.6
	484.5	468.4	615.7	398.0	465.4	535.1
Electrostatics	65.1	62.0	82.5	57.8	64.2	75.3
	67.7	46.6	77.2	56.0	52.3	69.3
van der Waals	-149.3	-100.1	-90.6	-94.5	-104.2	-80.4
	-75.9	-90.2	-63.1	-93.4	-102.0	-79.6
Total Strain energy (2MN Strain energy)	512.6 (29.6)	538.6 (19.1)	625.1 (13.6)	420.5 (18.4)	528.4(16.5)	559.8 (24.0)
	492.1 (27.3)	511.3 (9.6)	601.0 (21.7)	434.5 (21.7)	514.4(12.3)	544.5 (9.4)

FIGURE A2. Histories of the distance between the center of mass of the naphthalene group from the 2MN guest and glycosidic CD oxygen atoms for Xm CDs, as well as host:guest binding energies obtained from the analysis of MD trajectories. Both P (black) and NP (red) approaches were considered. Dashed lines represent the y coordinate for the center of mass of primary (lower) and secondary (upper) methyl carbon atoms.

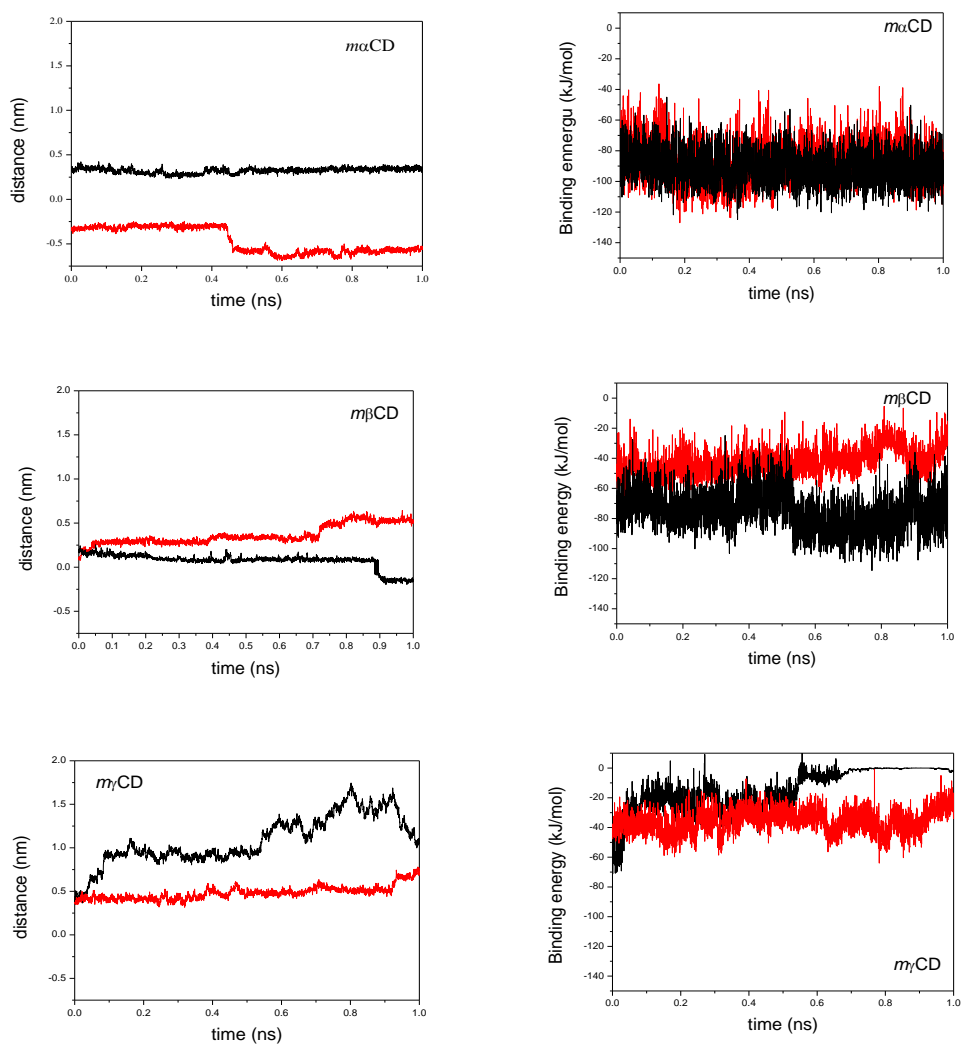


TABLE A3. Average of some geometrical parameters, binding energies (and contributions), interaction energies between 2MN and xylylene CD moiety or permethylated secondary ring, as well as total energy (and contributions) for the 2MN:host (*m*CD or *Xm*CD) complexes by polar (P) and **non-polar (NP)** approaching, obtained from the analysis of the MD simulations in the presence of water.

Parameters	PX <i>mα</i> CD	PX <i>mβ</i> CD	PX <i>mγ</i> CD	P <i>mα</i> CD	P <i>mβ</i> CD	P <i>mγ</i> CD
	NPX <i>mα</i> CD	NPX <i>mβ</i> CD	NPX <i>mγ</i> CD	NP <i>mα</i> CD	NP <i>mβ</i> CD	NP <i>mγ</i> CD
d (Å) (y coordinate)	0.85±0.27	2.6±0.6	4.3±2.6	2.9±0.2	1.0±0.4	10.2±4.6
	2.8±0.2	6.3±0.4	4.3±1.4	4.6±1.5	3.6±1.1	4.8±0.8
d' (Å)	3.9±4.5	5.8±0.4	0.2±7.2	----	----	----
	0.6±9.2	14.5±0.4	-10.3±4.5	----	----	----
θ (°)	271.1±54.9	58.6±112.1	205.6±148.6	108.2±6.3	72.7±131.7	103.7±93.4
	108.2±6.3	-29.3±27.0	-126.7±146.0	-220.5±166.7	194.2±170.3	320.2±38.2
δ (°)	73.9±14.7	61.7±9.3	85.0±9.7	73.2±2.8	99.4±16.2	97.5±28.2
	73.2±2.8	93.8±3.2	106.4±18.9	108.8±5.2	89.2±18.0	108.2±22.6
E_{bin} (kJmol⁻¹)	-96.1±13.0	-94.5±12.1	-52.7±23.4	-97.8±13.0	-75.2±13.0	-14.6±10.0
	-101.6±13.0	-71.1±8.8	-67.3±21.6	-87.3±13.0	-42.6±8.8	-36.4±7.9
Electrostatics	-20.5±5.4	-13.8±4.2	-4.2±10.0	-24.7±5.0	-12.1±7.1	-1.3±2.9
	-24.7±4.6	-9.6±3.8	-5.4±5.4	-20.9±5.4	-1.7±3.8	-1.7±2.9
van der Waals	-85.7±13.0	-81.1±12.1	-48.1±20.0	-76.9±12.5	-63.1±11.3	-13.4±12.5
	-76.9±12.5	-61.9±8.8	-62.3±9.6	-66.5±12.2	-41.0±8.8	-34.3±6.7
E_{int} Xy-2MN (kJmol⁻¹)	-12.1±3.8	-5.9±4.2	-7.9±7.5	----	----	----
	-2.5±3.8	-0.4±0.4	0.4±0.8	----	----	----
E_{int} permt-2MN (kJmol⁻¹)	-11.3±4.2	-20.5±5.4	-12.1±5.0	-23.4±6.3	-18.0±5.0	-9.6±8.4
	-5.0±4.2	-7.5±0.8	-3.3±2.5	-5.0±3.8	-20.9±5.9	-22.2±2.9
E_{tot} (kJmol⁻¹)	959.3±44.3	1056.7±49.3	1194.2±50.2	947.6±42.2	1024.5±46.0	1162.4±49.3
	947.6±42.2	1038.7±46.0	1213.9±55.2	859.8±46.0	1019.1±48.9	1156.6±48.9
Electrostatics	62.3±7.9	67.3±10.9	85.7±10.9	61.4±7.1	70.2±8.8	84.4±8.8
	62.3±1.7	61.0±8.4	88.6±10.9	51.8±8.8	68.1±8.4	80.7±9.6
van der Waals	-46.0±6.6	-51.4±29.7	-34.7±31.3	-45.6±27.6	-39.3±29.3	-0.8±29.3
	-45.6±6.6	-42.2±26.8	-33.9±29.7	-41.0±26.8	-25.1±27.6	-18.5±34.3

TABLE A4. Some geometrical parameters, binding energies (and contributions), interaction energies between 2MN and xylylene CD moiety or permethylated secondary ring, as well as total energy (and contributions) for the 2MN:host (*m*CD or *Xm*CD) complexes of minimum binding energy by polar (P) and **non-polar (NP)** approaching, obtained by the analysis of the MD simulations in the presence of water.

Parameters	PX <i>mα</i> CD	PX <i>mβ</i> CD	PX <i>mγ</i> CD	P <i>mα</i> CD	P <i>mβ</i> CD	P <i>mγ</i> CD
	NPX <i>mα</i> CD	NPX <i>mβ</i> CD	NPX <i>mγ</i> CD	NP <i>mα</i> CD	NP <i>mβ</i> CD	NP <i>mγ</i> CD
d (Å) (y coordinate)	+1.3	+2.4	+3.2	+2.6	+1.3	+3.9
	+2.9	-4.8	-4.6	-3.0	+2.6	+2.6
d' (Å)	-5.6	-5.6	-5.4	----	----	----
	9.1	-13.0	-12.6	----	----	----
θ (°)	277.5	23.0	298.5	53.5	8.3	331.7
	108.5	-42.6	-40.8	-351.2	0.7	37.4
δ (°)	91.8	60.7	92.4	71.7	88.9	92.8
	72.1	99.0	104.0	107.6	112.2	30.7
E_{bin} (kJmol⁻¹)	-134.2	-126.2	-107.8	-125.0	-114.5	-71.1
	-137.9	-101.2	-94.1	-127.1	-66.9	-130.1
Electrostatics	-28.0	-15.0	-23.4	-24.2	-20.5	-10.0
	-30.1	-15.0	-10.5	-22.2	-5.9	-24.7
van der Waals	-105.8	-110.4	-84.4	-100.3	-94.1	-61.0
	-107.8	-86.1	-83.6	-104.5	-60.6	-85.3
E_{int} Xy-2MN (kJmol ⁻¹)	-18.8	-9.6	-18.8	----	----	----
	-8.4	-0.4	0.8	----	----	----
E_{int} permt-2MN (kJmol ⁻¹)	-15.0	-18.8	-22.6	-25.3	-21.3	-18.8
	-7.5	-7.1	-4.2	-7.9	-28.0	-20.1
E_{tot} (kJmol ⁻¹)	935.9	1047.5	1116.1	797.1	1013.2	1144.5
	895.8	1106.9	1161.6	8.62.3	984.0	968.1
Electrostatics	52.2	81.9	82.3	53.1	77.7	58.5
	66.0	56.8	19.7	48.5	67.3	61.9
van der Waals	-55.2	-78.6	-90.3	-96.1	-89.0	-56.0
	-56.8	-58.5	-41.1	-76.1	-58.5	-21.7

CHAPTER 4.

Table S1 collects the data for the MBE structures (*i.e.* more negative DNA1DNA2—1-dimer interaction energy) and at a d distance where these binding energies are close to zero. Binding energies are negative and they decrease with d up to reaching a minimum value which is slightly more favourable for the major groove approaching.

Table A5. Some distances, interaction energies and contributions ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) for the structures of minima DNA—1-dimer interaction energy, MBE (min) and at the largest DNA1-DNA2 separation (∞) from DNA approaching by the major and minor grooves.

Parameter	$major_{\min}$	$major_{\infty}$	$minor_{\min}$	$minor_{\infty}$
distances (Å)				
<i>DNA1-DNA2</i>	22.1	69.9	28.4	69.9
<i>DNA1-o</i>	11.2	34.9	14.0	34.9
<i>DNA2-o</i>	11.0	35.0	14.4	35.0
<i>CD1-CD2</i>	11.1	11.4	10.7	11.4
<i>Xy1-Xy2</i>	6.9	6.5	6.7	6.5
Total energy ($10^3 \times \text{kJmol}^{-1}$)				
<i>electrostatics</i>	-3.0	27.0	-5.7	27.3
<i>van der Waals</i>	-0.7	-15.2	1.4	-14.8
Binding Energy ($10^3 \times \text{kJmol}^{-1}$)				
<i>DNA-dimer</i>	-36.1	0	-32.9	0
<i>electrostatics</i>	-36.1	0	-34.4	0
<i>van der Waals</i>	0.01	0	1.6	0
Interaction Energies ($10^3 \times \text{kJmol}^{-1}$)				
(<i>DNA1CD1</i>)-(DNA2 <i>CD2</i>)	2.0	3.5	-1.5	3.5
<i>electrostatics</i>	2.0	3.5	-1.4	3.5
<i>van der Waals</i>	-0.07	-0.04	-0.03	-0.03
<i>DNA1:dimer</i>	-17.9	0	-15.8	0
<i>electrostatics</i>	-18.0	0	-16.7	0
<i>van der Waals</i>	0.05	0	1.0	0
<i>DNA2:dimer</i>	-18.2	0	-17.1	0
<i>electrostatics</i>	-18.1	0	-17.7	0
<i>van der Waals</i>	-0.03	0	0.6	0
<i>DNA1-DNA2</i>	6.0	0	1.2	0
<i>electrostatics</i>	6.0	0	1.2	0
<i>van der Waals</i>	-0.01	0	-0.0	0
<i>CD1:CD2</i>	3.6	3.5	3.5	3.5
<i>electrostatics</i>	3.6	3.5	3.5	3.5
<i>van der Waals</i>	-0.03	-0.04	-0.02	-0.03
<i>Xy1-Xy2</i>	2.0	3.5	-1.5	3.5
<i>electrostatics</i>	2.0	3.5	-1.5	3.5
<i>van der Waals</i>	-0.07	-0.04	-0.03	-0.03

Figure A3 depicts the total energy for the interaction of the DNA fragments with **1**-dimer and the individual electrostatics and van der Waals contributions as a function of d . Once again electrostatics contributions, which monotonically decrease as d decreases, are responsible for this decreasing and are the main contribution binding energy. Van der Waals contributions are near zero and due to steric DNA fragments-dimer hindrance become important and unfavourable at shorter d distances. This repulsive interaction also determines the DNA-dimer packing for the MBE structure which seems to be better for the major groove approaching.

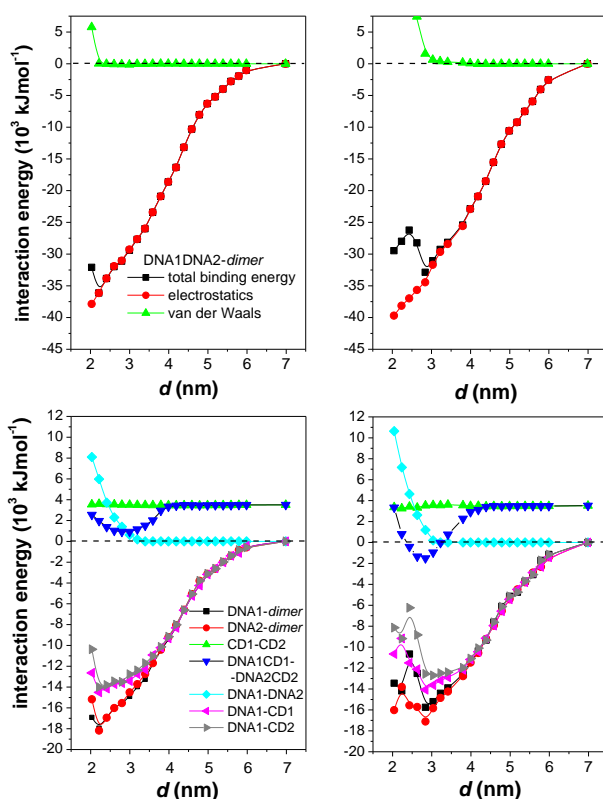


Figure A3. Upper panels: total DNA₂—**1**-dimer interaction energy and individual electrostatics and van der Waals contributions as a function of the distance (d , nm) between DNA fragments along the y coordinate, for simultaneous DNA units approaching **1**-dimer, as depicted in Figure S2, by the major (left panels) or minor (right panels) grooves. Bottom panels: interaction energies between different components of the system: each individual DNA1 or DNA2 fragment with **1**-dimer (DNA1-dimer and DNA2-dimer); between two molecules of **1**-dimer (CD1-CD2) and between their xylylene moieties (Xy1-Xy2); between the DNA fragments (DNA1-DNA2) and between each DNA fragment and the closest CD macroring (DNA1-CD1 and DNA2-CD2).

Other interactions from each DNA with its nearest CD or with the dimer (Figure S4) exhibit a similar trend. The DNA1CD1-DNA2CD2 interaction also shows the minimum near the minimum for the (DNA1DNA2-1-dimer) binding energy. This interaction at long d distances, however, is not zero. This residual energy corresponds to the CD1-CD1 interaction which does not change with d , as a consequence of which the dimer structure scarcely changes upon the approaching of DNA fragments. The DNA1-DNA2 interaction is near zero at d distances larger than nearly 35 Å, however it becomes positive at shorter distances. In fact, for the MBE structures, as collected in Table 1, the DNA1-DNA2 interactions, as expected, are repulsive for both types of approaching due to the DNA fragments negative residual charge. This means that at least a dimer of amphiphilic charged CDs is required to stabilize two DNA chains placed at the d distance for the (1-dimer)-DNA₂ complex MBE structure.

References

- [1] F. Mendicuti, Trends Phys. Chem. 11 (2006) 61-77.
- [2] I. Pastor, A. Di Marino, F. Mendicuti, J. Phys. Chem. B 106 (2002) 1995-2003.
- [3] A. Di Marino, F. Mendicuti, Appl. Spectrosc. 56 (2002) 1579-1587.
- [4] J.M. Madrid, F. Mendicuti, W.L. Mattice, J. Phys. Chem. B 102 (1998) 2037-2044.
- [5] J.M. Madrid, J. Pozuelo, F. Mendicuti, W.L. Mattice, J. Colloid Interface Sci. 193 (1997) 112-120.
- [6] A. Di Marino, L. Rubio, F. Mendicuti, J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem. 58 (2007) 103-114.
- [7] M.J. González-Álvarez, A. Di Marino, F. Mendicuti, J. Fluoresc. 19 (2009) 449-462.
- [8] R. Usero, C. Alvariza, M.J. González-Álvarez, F. Mendicuti, J. Fluoresc. 18 (2008) 1103-1114.

ANEXO 2

1. Förster radius, R_0 for the xylylene→2MN resonance energy transfer process.

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2\Phi_D}{128\pi^5 n^4 N_{AV}} J$$

where Φ_D is the fluorescence quantum yield for the donor in absence of the acceptor, n is the refractive index of the medium; κ^2 represents the relative orientation factor between transition dipoles of the donor and the acceptor, which for a random chromophore distribution is assumed to be the value of 2/3; J is the overlapping integral between normalized fluorescence spectrum of the donor (xylylene group) and the absorption spectrum of the acceptor (2MN) expressed in $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ and N_{AV} is Avogadro's number.

The efficiency for the energy transfer resonance xylylene→2MN process is given by:

$$\Phi_{ET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

where R is the distance between the donor and the acceptor.

Data: Fluorescence Quantum yield for the Xy donor $\Phi_D = 0.028$; $n = 1.333$; $\kappa^2 = 2/3$ and $J = 3.45 \times 10^{-22} \text{ cm}^3 \text{ M}^{-1}$

Förster radius → $R_0 \approx 1.1 \text{ \AA}$

2. Decay intensity profiles.

Decay intensity profiles were fitted to a sum of exponential decay functions by the iterative reconvolution method.¹ The average lifetime of a multiple-exponential decay function was then defined as:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i} \quad (1)$$

where A_i is the pre-exponential factor of the component with a lifetime τ_i of the multiexponential function intensity decay. The fractional contribution f_i of each decay time to the steady-state intensity, which represents the fraction of total fluorescence intensity of the i -component is given by:

$$f_i = \frac{A_i \tau_i}{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i} \quad (2)$$

Thus, the intensity weighted average lifetime $\langle \tau \rangle$ from a dilute solution of a pair of emitting species, 1 and 2, that do not interact during excited state lifetime can be obtained as:

$$\langle \tau \rangle = f_1 \tau_1 + f_2 \tau_2 \quad (3)$$

3. Depolarization measurements.

From the fluorescence depolarization measurements,² the anisotropy r is defined as:

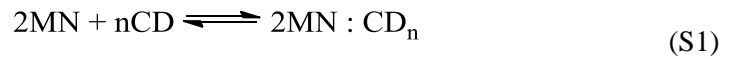
$$r = (I_{pp} - I_{pl}) / (I_{pl} + 2I_{pp}) \quad (4)$$

where all magnitudes are well-known.

4. Development of equations from the *Equilibria and Association Constants* Section.

Case A: Absence of CD dimerization.

For a 1:n guest:host complex (2MN:CD_n), whose global equilibrium can be written as:



the binding or association constant for equilibrium can be defined as

$$K = \frac{[2MN:CD_n]}{[2MN][CD]^n} \quad (S2)6$$

For a complex 1:1 the total concentration of the guest and CD are:

$$[2MN]_0 = [2MN] + [2MN:CD] \quad (S3)$$

$$[CD]_0 = [CD] + [2MN:CD] \quad (S4)$$

respectively, then the molar fraction of the complexed form defined as,

$$f_2 = \frac{[2MN:CD]}{[2MN]_0} \quad (S5)$$

by using equation (S2) and under the assumption that the CD is in excess, *i.e.*, $[CD] \gg [2MN:CD]$, can be related with the binding constant and initial concentration of the host by the following expression,

$$f_2 = \frac{K[CD]_0}{1 + K[CD]_0} \quad (S6)$$

The approaching that you may take into account is that the free CD is in excess as compared to the complexed form, and therefore $[CD]_0 \cong [CD]$ in equation (S4). This assumption implies that $[2MN]$ should be very low compared to $[CD]_0$ and the binding constant cannot be very high. If $K \cdot [2MN] \ll 1$ can safely be assumed this approach. In all the experiments, $[2MN] \sim 3 \times 10^{-5} M$ and the K are around $\sim 10^2 - 10^3 M^{-1}$ for a 1:1 stoichiometry for all the systems. Therefore, we can conclude that this approximation is valid for our case.

Assuming two fluorescent species at the equilibrium the free and the complexed 2MN, the binding constant can be determined from the non-linear dependence of some parameters derived from fluorescence steady-state or time-resolved fluorescence techniques with the initial $[CD]_0$ according to the following expressions:

$$(a) \quad \frac{I}{I_0} = \frac{1 + (I_\infty / I_0) K [CD]_0^n}{1 + K [CD]_0^n} \quad (S7)$$

where I represents the fluorescence intensity (I) at each $[CD]_0$. Subscripts ∞ and 0 correspond to the I values for $[CD]=0$ and extrapolated at $[CD] \rightarrow \infty$.

$$(b) \quad R = \frac{R_0 + R_\infty \Phi K [CD]_0^n}{1 + \Phi K [CD]_0^n} \quad (S8)$$

where R is the ratio of intensities of two characteristics bands $R = I_{\lambda_2} / I_{\lambda_1}$, by assuming that the emission spectra (like many of the fluorescence probes used by us [1-8]:) exhibit electronic bands centered at λ_1 and λ_2 . The parameter $\Phi = I_{\infty, \lambda_1} / I_{0, \lambda_1}$ can be estimated from the $I(\lambda_1)$ values at $[CD]=0$ and extrapolated at $[CD] \rightarrow \infty$, and optimized during fitting to the experimental data. R_∞ and R_0 , are R values for the free and totally complexed 2MN [1; 6],

$$(c) \quad \langle \tau \rangle = \frac{\tau_0 + \tau_\infty \Phi' K [CD]_0^n}{1 + \Phi' K [CD]_0^n} \quad (S9)$$

where $\langle \tau \rangle$ is derived from Eq. 4 (Manuscript) and by the analysis of the fluorescence decay profiles of fluorescence intensity. τ_0 y τ_∞ are the fluorescence lifetimes for the free and complexed 2MN. If lifetimes are collected at λ_1 as emission wavelength, $\Phi = \Phi'$. If they are collected at λ_2 , Φ y Φ' can be related by the following expression [1; 6]:

$$\Phi'(\lambda_1) = \frac{R_0}{R_\infty} \Phi(\lambda_2) \quad (S10)$$

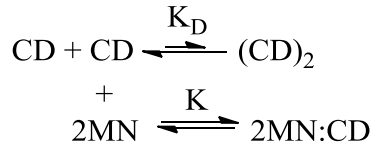
Derived from the non-linear Eqs. S7-S9, it is useful to get the linear ones as:

$$\frac{[\text{CD}]_0^n}{(Y_0 - Y)} = \frac{1}{K \Phi (Y_0 - Y_\infty)} + \frac{[\text{CD}]_0^n}{Y_0 - Y_\infty} \quad (\text{S11})$$

where Y represents any of the I , R and $\langle \tau \rangle$ parameters.

Case B: Cyclodextrin dimerization process.

There are many types of cyclodextrins that could present dimerization processes. In these cases, two competitive equilibria should be considered in the study of complexation with guest molecules: (i) the CD dimerization process; (ii) the CDs complexation with the 2MN. Both equilibria are defined by K_D and K constants respectively. These processes are summarized in the Scheme S1:



Scheme S1. Equilibria and association constants.

K_D does not change in the presence of the 2MN (it only depends on the temperature and pressure). However for the calculation of K , we must consider the real monomer concentration present in the medium, which is the specie that will form the inclusion complex with 2MN. Thus, the K_D should be taken into account for the calculation of K , due to K_D will determine the amount of monomer present according to the $[\text{CD}]_0$ and the temperature. The Eq. S7-S9 and S11 can be rewritten as:

$$Y = \frac{Y_0 + Y_\infty \Phi K \left([\text{CD}]_0 - 2[\text{CD}_2] \right)^n}{1 + \Phi K \left([\text{CD}]_0 - 2[\text{CD}_2] \right)^n} \quad (\text{S12})$$

$$\frac{\left([\text{CD}]_0 - 2[\text{CD}_2] \right)^n}{(Y_0 - Y)} = \frac{1}{K \Phi_1 (Y_0 - Y_\infty)} + \frac{\left([\text{CD}]_0 - 2[\text{CD}_2] \right)^n}{Y_0 - Y_\infty} \quad (\text{S13})$$

Noticed that the relationship between R and $[\text{CD}]_0$ will depend on the dimer concentration, which can be obtained at each temperature and $[\text{CD}]_0$ as:

$$[\text{CD}_2] = \frac{(4K_D[\text{CD}]_0 + 1) - \sqrt{8K_D[\text{CD}]_0 + 1}}{8K_D} \quad (\text{S14})$$

Study of the dimerization process of **3** by fluorescence spectroscopy

Determination of dimerization constants (K). The dimerization process of **1** could be described by the following equilibrium,



and the association constant K_D defined as,

$$K = \frac{[\mathbf{1-dimer}]}{[\mathbf{1}]^2} \quad (2)$$

Then the fluorescence intensity, I , can be related with $[\mathbf{1}]$ and K_D by the following equation:

$$I = \phi_{\mathbf{1-dimer}} [\mathbf{1}] - (\phi_{\mathbf{1-dimer}} - \phi_1) \frac{(\sqrt{8K[\mathbf{1}] + I} - I)}{4K} \quad (3)$$

where ϕ_1 and $\phi_{\mathbf{1-dimer}}$ are the proportionality constants (per chromophore unit) between fluorescence intensity and $[\mathbf{1}]$ and $[\mathbf{1-dimer}]$, respectively. Both parameters are related to their fluorescence quantum yields and molar absorptivities at the excitation wavelength.

$\langle \tau \rangle$ can be calculated by using the equation:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i} \quad (4)$$

The non-linear relationship between the weighted average lifetime $\langle \tau \rangle$ and $[\mathbf{1}]$ can be obtained as:

$$\langle \tau \rangle = \frac{2\tau_1 + (\phi_{\mathbf{1-dimer}}/\phi_1) \tau_{(paX\beta CD)_2} (\sqrt{8K[\mathbf{1}] + I} - I)}{2 + (\phi_{\mathbf{1-dimer}}/\phi_1) (\sqrt{8K[\mathbf{1}] + I} - I)} \quad (5)$$

where τ_1 and $\tau_{\mathbf{1-dimer}}$ are lifetimes for the isolated free and **1-dimer** forms.

References

- [1] F. Mendicuti, Trends Phys. Chem. 11 (2006) 61-77.
- [2] I. Pastor, A. Di Marino, F. Mendicuti, J. Phys. Chem. B 106 (2002) 1995-2003.
- [3] A. Di Marino, F. Mendicuti, Appl. Spectrosc. 56 (2002) 1579-1587.
- [4] J.M. Madrid, F. Mendicuti, W.L. Mattice, J. Phys. Chem. B 102 (1998) 2037-2044.
- [5] J.M. Madrid, J. Pozuelo, F. Mendicuti, W.L. Mattice, J. Colloid Interface Sci. 193 (1997) 112-120.
- [6] A. Di Marino, L. Rubio, F. Mendicuti, J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem. 58 (2007) 103-114.
- [7] M.J. González-Álvarez, A. Di Marino, F. Mendicuti, J. Fluoresc. 19 (2009) 449-462.
- [8] R. Usero, C. Alvariza, M.J. González-Álvarez, F. Mendicuti, J. Fluoresc. 18 (2008) 1103-1114.

¹ D. O'Connor, W. Ware, J. C. Andre, *J. Phys. Chem.* **1979**, 83, 1333-1343.

² J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Ed. Springer, New York, NY, **2008**, 354.