

La química combinatoria dinámica com a eina per al desenvolupament d'antídots de l'heparina

Dynamic combinatorial chemistry as an instrument for developing heparin antidotes

Daniel Carbajo i Ignacio Alfonso

Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC). Departament de Química Biològica. Grup de Química Supramolecular

Resum: La química combinatoria dinámica es una aproximació útil per a la identificació de lligands que s'uneixen a objectius complexos i amb una estructura difícil de determinar. Les macromolècules anàlogues a l'heparina són àmpliament utilitzades als hospitals com a medicaments anticoagulants. Tanmateix, la recerca d'antídots de l'heparina basats en molècules petites per a controlar la coagulació sanguínia encara és una tasca desafiant degut a les propietats fisicoquímiques peculiars d'aquest polisacàrid aniónic. Aquest article presenta un compendi dels esforços que hem dut a terme per aplicar la química combinatoria dinámica amb vista a la identificació de lligands que s'uneixen a l'heparina formats a partir de blocs de construcció extremament simples, la seva posterior optimització perquè actuïn com a veritables antídots de l'heparina i l'exploració final de la seva activitat contra tot el ventall d'heparinoids.

Paraules clau: Química combinatoria dinámica, heparina, reconeixement molecular, antídots, glicosaminoglicans, coagulació sanguínia.

Abstract: *Dynamic combinatorial chemistry is a useful approach to the identification of ligands to complex and structure-elusive targets. Heparin-like macromolecules are widely used in hospitals as anticoagulant drugs. However, the search for heparin antidotes based on small molecules to control blood coagulation still remains a challenging task due to the peculiar physicochemical properties of this anionic polysaccharide. This article presents a compendium of our efforts to apply dynamic combinatorial chemistry in order to identify ligands to heparin assembled from extremely simple building blocks; to optimize them subsequently in order for them to act as true heparin antidotes; and finally to explore their activity against the full range of heparinoids.*

Keywords: *Dynamic combinatorial chemistry, heparin, molecular recognition, antidotes, glycosaminoglycans, blood coagulation.*

Introducció

La química combinatoria dinámica (QCD) és una disciplina jove dintre del gran ventall de les ciències químiques. A diferència de la química tradicional, basada en reaccions químiques controlades cinèticament i en la formació d'enllaços irreversibles, la QCD es fonamenta en la reversibilitat de les reaccions, en les quals els enllaços covalents es formen i es trenquen en un equilibri termodinàmic [1]. Proposa l'ús de llibreries combinatories dinàmiques (LCD) en què les espècies es troben en un intercanvi continu a partir d'enllaços covalents reversibles. Aquestes LCD estan formades per blocs constructius convenientment escollits. En primer lloc, han d'estar funcionalitzats per a dur a terme la reacció reversible dinámica desitjada (típicament, la formació

d'imes o de disulfurs). I, en segon lloc, han de contenir motius estructurals que els aportin la informació química per a realitzar processos de reconeixement molecular. Aquests sistemes moleculars responen a estímuls externs modificant la composició de la LCD [2], amplificant els membres que esdevenen més estables a costa dels altres components de la mescla [3]. L'estímul més habitual és l'addició d'un compost (molècula petita, proteïna, etc.) que actuï de plantilla. Així, els components de la LCD que interaccionin millor amb la plantilla veuran la seva presència incrementada (figura 1). Si som capaços d'identificar quins són aquests compostos amplificats, trobarem, dintre les possibilitats de la LCD, quins són els millors lligands potencials per a la plantilla introduïda.

Com si invertíssim el concepte de *clau i pany*, en comptes de dissenyar què és el que encaixa més bé en un lloc actiu d'una proteïna concreta —per exemple—, la QCD ofereix un ventall de possibilitats perquè el pany esculpeixi quina clau hi encaixa millor [4]. Així, permet provar alhora tots els elements possibles de la LCD i després només cal sintetitzar els que tenen

Correspondència: Daniel Carbajo
Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC). Departament de Química Biològica
C. de Jordi Girona, 20. 08034 Barcelona
A/e: daniel.carbajo@iqac.csic.es

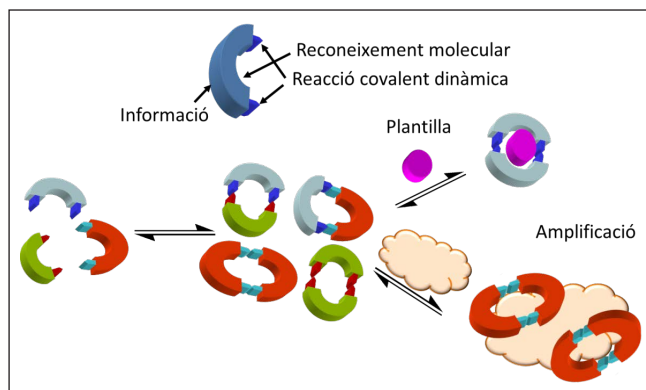


FIGURA 1. Aplicació de la química combinatòria dinàmica per a la identificació de lligands a molècules petites i ions o biomacromolècules grans, utilitzades com a plantilla. Elaboració pròpia.

una utilitat potencial. Com que el mateix objectiu (la plantilla) és qui fa la selecció, permet identificar lligands que s'uneixen a objectius que, per les seves característiques estructurals, no presentin un lloc actiu definit o aquest encara no s'hagi determinat, ja que totes les possibilitats estructurals són explorades dintre del procés d'autocorrecció termodinàmic típic de la QCD. A més, en molts casos és possible dur a terme aquestes reaccions en condicions fisiològiques, cosa especialment útil per a aplicar aquesta aproximació amb vista a identificar compostos d'importància biològica, com la determinació de lligands que s'uneixen a proteïnes [5], a àcids nucleics [6] i a molècules autoreplicables [7].

En el nostre grup hem emprat la QCD per a molts usos diferents, com la generació de sistemes catalítics dinàmics [8] o el reconeixement molecular d'ions [9], de biomolècules petites [10] i grans [11] i del cas que ens ocupa, de lligands que s'uneixen a glicosaminoglicans [12], entre els quals destaca l'heparina [13].

L'heparina (Hep, figura 2) és un dels biopolímers més utilitzats en medicina. Té aplicacions dins de medicaments antivirals [14] i anticancerosos [15], però sobretot té rellevància com a anticoagulant [16]. Per a un ús segur de Hep, és molt important l'accés a una família d'antídots efectius, especialment en casos de sobredosi, de sagnats massius [17] o d'operacions quirúrgiques d'urgència [18]. Tot i així, el nombre d'antídots contra l'efecte anticoagulant de Hep i els seus anàlegs és molt limitat: el mercat es troba dominat per la protamina [19], una proteïna rica en arginines, per bé que també hi ha altres opcions, com ara anticossos monoclonals [20] o dendrímers policatiònics [21]. En tots els casos es tracta de macromolècules,

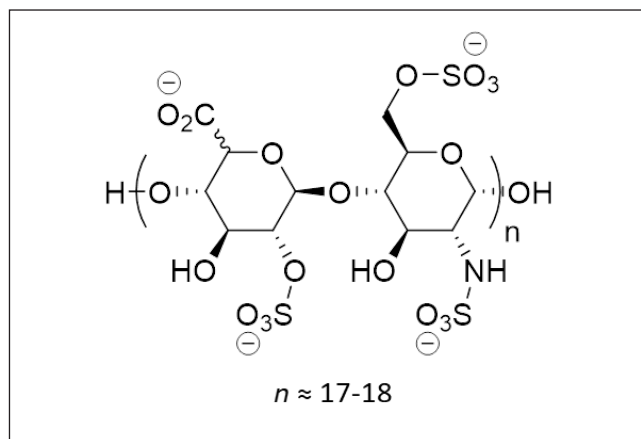


FIGURA 2. Estructura química de l'heparina. Elaboració pròpia.

que presenten una sèrie d'inconvenients comuns [22]. Així, la recerca de molècules petites que siguin antídots de Hep està atraient molt d'interès els darrers anys [23], especialment si es pot trobar un antídote de caràcter universal que funcioni amb Hep i amb tots els seus anàlegs.

Desafortunadament, el nombre de molècules petites que tenen la capacitat de modular l'activitat de Hep és molt limitat [24]. Això es deu a les seves peculiaritats estructurals: una densitat de càrrega negativa molt elevada, polidispersitat i una flexibilitat conformacional extraordinària [25]; tots aquests aspectes han frustrat els esforços per a dur a terme un disseny racional de lligands tradicional. Paradoxalment, aquesta complexitat i aquesta estructura difícil de determinar són característiques que fan de la QCD una aproximació adequada [2] per a la determinació de lligands per a Hep, com ja s'ha demostrat amb altres macromolècules complexes en el passat [5-12]. Amb aquesta idea present, vam començar a dedicar esforços per a demostrar que la QCD es podia emprar utilitzant Hep com a plantilla.

Prova de concepte

En aquesta aproximació, primerament cal triar amb deteniment les característiques ideals que han de tenir els blocs de construcció que compondran les LCD que s'utilitzaran. Tenint en compte que la plantilla objectiu amb què calia interaccionar era Hep, ens vam basar en els motius estructurals que podrien afavorir una interacció no covalent amb Hep en un ambient fisiològic. En primer lloc ens vam inspirar en les lectines, que poden reconèixer sucres d'una manera selectiva per mitjà

d'interaccions CH- π [26], de forma que vam incloure grups aromàtics dins els blocs de construcció. Així mateix, l'estructura de Hep conté molts sulfats i carboxilats dins la seva seqüència. Aquests poden ser reconeguts per poliamines [27] pel fet d'establir ponts d'hidrogen i altres interaccions iòniques, amb la qual cosa es van incloure dins els components de les LCD. Com a reacció reversible vam utilitzar la formació d'imes, ja que és prou ràpida per a reaccionar en poc temps a l'addició de la plantilla. Llavors, una reacció de reducció a amines permet congelar l'equilibri, fet que facilita l'anàlisi de la mescla i la comparació de les diferències provocades per la presència de Hep.

Atès que es volia mantenir l'ús de molècules senzilles, vam escollir l'espermina com a exemple de poliamina simple, per tal de fer-la reaccionar amb una petita selecció d'aldehids aromàtics. Amb aquest disseny experimental, la natura reversible de la formació d'imes permetria a les molècules formades adaptar-se a la presència de la plantilla de Hep (figura 3a). Així, les interaccions no covalents estabilitzarien i seleccionarien els millors lligands de la mescla, en un nou equilibri que podríem congelar en una reducció *in situ*. L'anàlisi per UPLC-MS de les mescles de reacció en absència/presència de Hep ens va indicar quins components de la mescla es trobaven amplificats en presència del polisacàrid, com es pot veure al gràfic dels factors d'amplificació corresponents en la figura 3b.

Per tant, havíem identificat uns compostos que podien ser lligands potencials a Hep. Però, ho eren de veritat? Per comprovar-ho vam preparar un dels *hits* principals (3AL) i els seus anàlegs simètrics corresponents, que, curiosament, no presentaven una gran afinitat potencial. Un cop preparats, vam confirmar que 3AL efectivament interaccionava amb Hep, determinant-ne la constant d'afinitat mitjançant valoracions de fluorescència, ressonància magnètica nuclear i calorimetria de titulació isotèrmica en el rang micromolar baix. Vam trobar que la constant d'afinitat es correlacionava amb el factor d'amplificació i es va confirmar que els anàlegs simètrics eren lligands pobres.

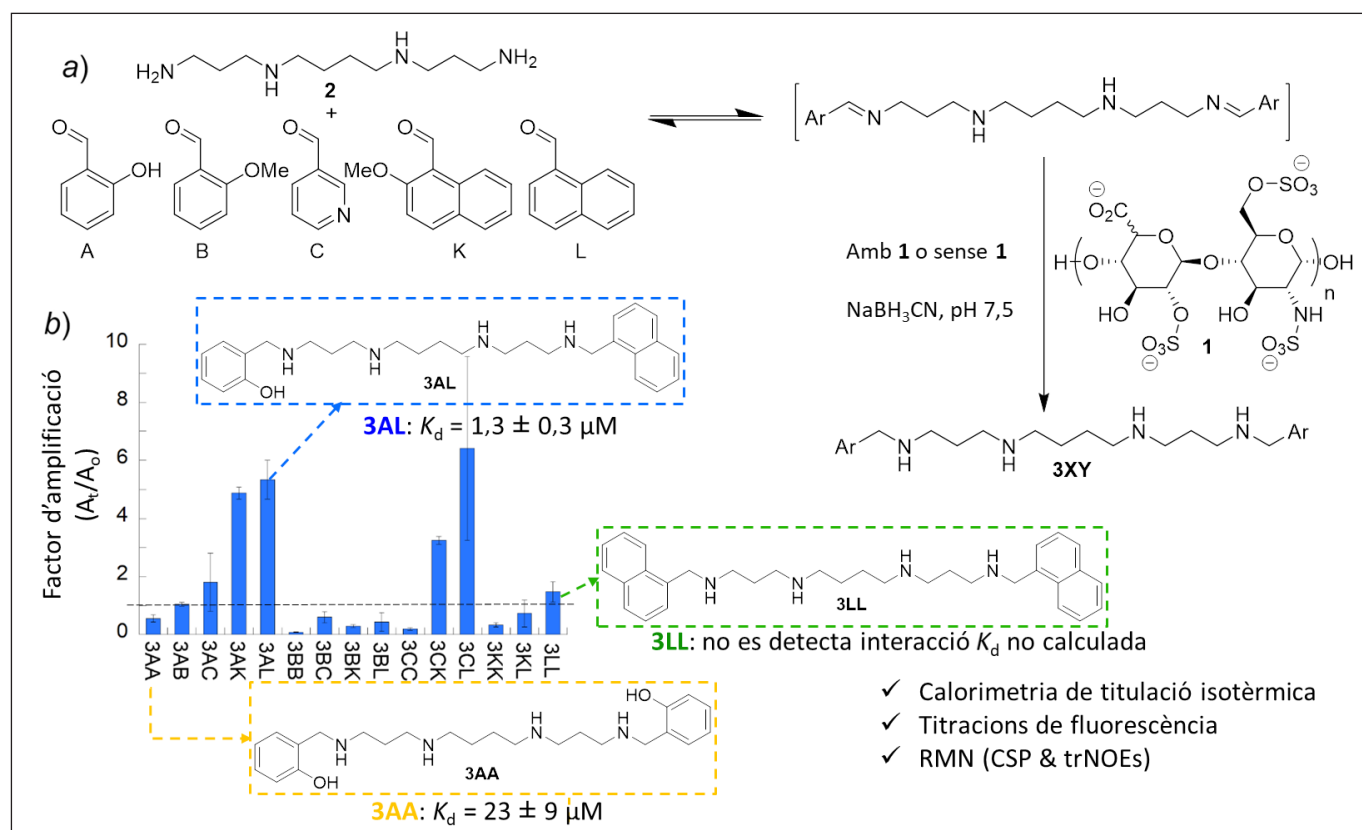


FIGURA 3. a) Esquema de la reacció d'aminació reductora de QCD utilitzada en aquest estudi. b) Gràfic dels factors d'amplificació, definits com la relació entre la corresponent àrea dels pics en anàlisi d'HPLC (cromatografia de líquids d'alta resolució), obtingut en reaccions realitzades en presència (A_t) o absència (A_o) de Hep. Les barres per sobre i per sota la línia de punts indiquen els compostos amplificats i reduïts, respectivament, a causa de la presència de Hep. Elaboració pròpia.

A partir de simulacions de modelització molecular vam poder construir un model estructural d'interacció en què 3AL s'enrotllava al voltant dels glicans de Hep. Aquesta interacció s'estabilitzava a partir d'enllaços de pont d'hidrogen i de l'establiment d'interaccions CH- π on era necessària la presència d'un fenol a un costat i d'un naftil a l'altre, i s'explicava així l'estabilitat superior de la interacció d'aquest compost respecte dels seus anàlegs. La disposició permetia a més la formació d'interaccions π - π entre els grups naftil de diferents molècules de 3AL, fet que conduïa a una estabilització encara més gran de la interacció.

Però, aquesta interacció implicava que tinguessin algun tipus d'activitat? Vam decidir provar-ho adaptant un assaig enzimàtic *in vitro* basat en la coagulació de la sang que utilitza proteïnes recombinants (figura 4a). En aquest assaig, Hep forma un complex ternari amb l'antitrombina III i el factor X_a de coagulació, que atura la cascada de reaccions. L'addició d'un lligand prou potent de Hep provocaria que no es pogués formar el complex, fet que alliberaria el factor X_a , de manera que

ara podria reaccionar amb un substrat adequat i alliberaria en aquest cas un compost amb color, del qual podríem mesurar-ne l'aparició.

Així ho vam fer i, tal com es pot veure en la figura 4b, 3AL era capaç d'inhibir l'activitat anticoagulant de Hep de manera dependent de la concentració. D'altra banda, els anàlegs amb pitjor afinitat no van tenir cap efecte, ni tan sols després d'augmentar-ne molt la concentració.

Per tant, vam poder identificar una molècula petita que actuava com a lligand de Hep mitjançant QCD, que, a més, era capaç d'inhibir la seva activitat en un assaig enzimàtic [28]. Quedava així demostrada, com a prova de concepte, la capacitat d'aquesta aproximació per tal de trobar moduladors de Hep d'una manera fàcil i simple. Un cop confirmada la hipòtesi de partida, quin seria el pas següent? Doncs optimitzar els components de les LCD expandint-ne la diversitat estructural amb la intenció d'obtenir anàlegs més potents de 3AL que poguessin funcionar com a veritables antidòts de Hep.

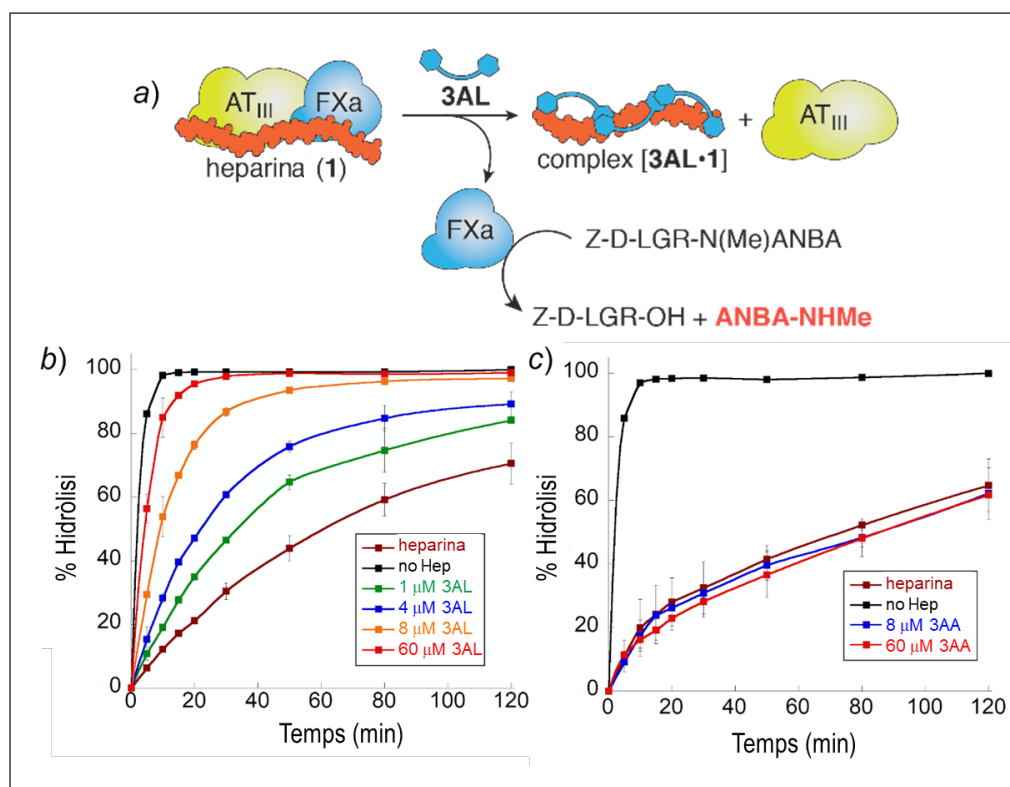


FIGURA 4. Efecte del lligand 3AL en la cascada de coagulació sanguínia. a) Representació de la interacció Hep/AT_{III}/FX_a. b) Gràfic del percentatge d'hidròlisi del pèptid Z-D-Leu-Gly-ArgNMe (mesurat per HPLC) catalitzat pel sistema FX_a/AT_{III} en absència (negre) o en presència (marró) de 0,4 UI/mL de Hep. L'increment de concentració del lligand 3AL inhibeix l'acció de Hep en competir amb AT_{III}, i es recupera l'activitat proteolítica del FX_a. c) Com B, però utilitzant 3AA. Elaboració pròpia.

Optimització de les llibreries dinàmiques

Després d'haver demostrat la viabilitat de la nostra aproximació, era el moment de veure fins on podíem arribar. Ja havíem establert les condicions de reacció ideals per a obtenir amplifícacions àmplies i reproduïbles i les condicions d'anàlisi per a estudiar adequadament els equilibris. Inicialment, havíem optat per mantenir la simplicitat i utilitzar una LCD petita com a punt de partida. En aquest pas d'optimització, ens vam centrar a augmentar la complexitat dels components de la LCD, i es va generar així l'exploració per a un espai de reconeixement molecular més ampli. Sabent que la combinació de fenol/naftil era adequada, vam assegurar la inclusió d'una varietat d'anàlegs de fenol amb diferents substituents i la presència de grups aromàtics amb una superfície gran que poguessin establir interaccions CH- π més fortes. D'aquesta manera, es buscà cobrir millor les necessitats estructurals per a una interacció òptima amb Hep, amb la qual cosa es permetia la identificació de lligands més potents que poguessin tenir una futura aplicació com a medicaments potencials.

En comptes de partir d'una LCD petita composta d'una desena de components virtuals, aquest augment de la complexitat

ens va portar a analitzar LCD de més d'un centenar de possibles candidats a interaccionar amb Hep. L'anàlisi dels seus factors d'amplificació ens va permetre identificar una sèrie de *hits* amb una afinitat més gran que la demostrada prèviament per 3AL, que indicava una activitat potencialment molt superior (figura 5).

Es van preparar els nous compostos i se'n va determinar la constant d'afinitat. Un altre cop, vam comprovar que es correlacionava amb el factor d'amplificació, cosa que reforçava el valor de la QCD com a eina d'identificació de lligands, amb els millors compostos (3FF i 3AC) (figura 6a), i demostrava una afinitat més forta que la determinada per 3AL (nanomolar alt).

Les simulacions de modelització molecular (figura 6d) ens van dur a comprendre els motius estructurals que explicaven la seva gran afinitat. Els compostos interaccionaven amb Hep guiats per les mateixes forces (enllaços de pont d'hidrogen, interaccions iòniques, CH- π). 3FF incorpora grups naftol, que presenten propietats dels grups fenol/naftalè alhora, i afavoreix així una bona disposició conformacional. D'altra banda, 3AC mantenia la presència del fenol, alternat aquest cop amb un grup aromàtic més gran (fluorè).

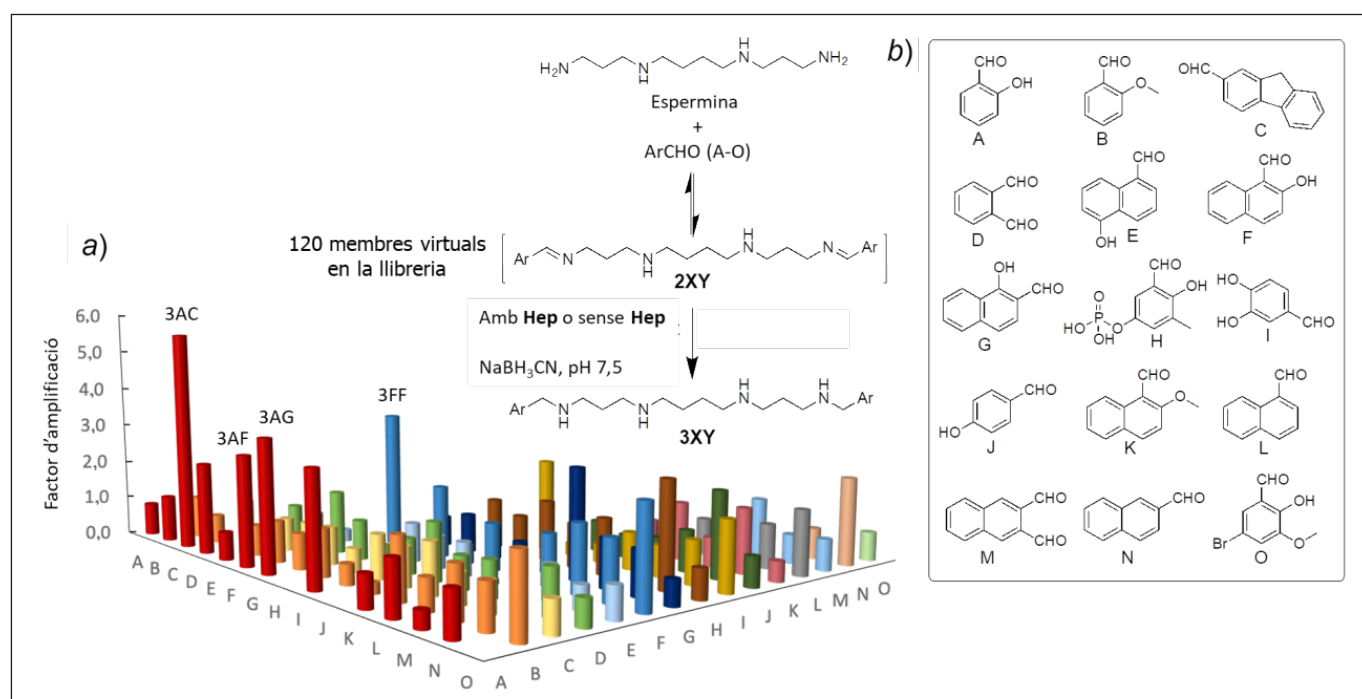


FIGURA 5. a) Gràfic de les amplifícacions mitjanes obtingudes per cada membre de la LCD. b) Estructures químiques dels aldehids utilitzats. Elaboració pròpia.

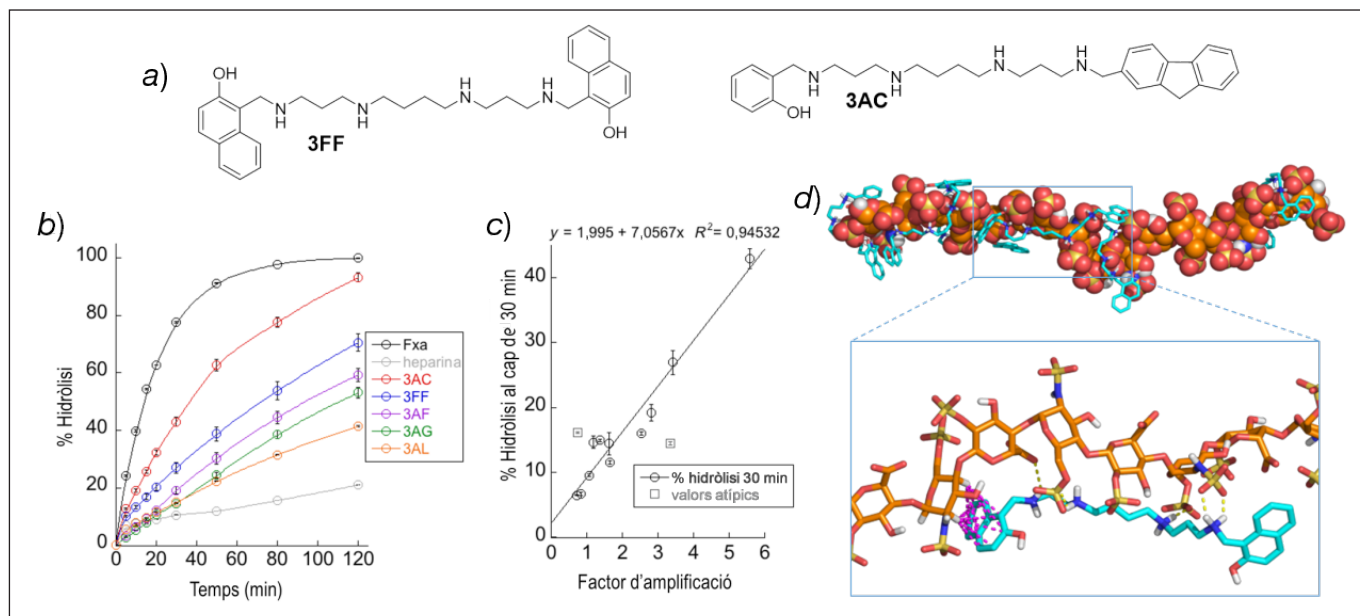


FIGURA 6. a) Estructura química de 3FF i 3AC, les molècules més amplificades en la QCD. b) Gràfic de l'evolució amb el temps de la hidròlisi del pèptid substrat (485 μ m) en condicions diferents: en tots els casos (0,085 μ g/mL de FX₃ i 0,02 UI/mL de AT₃), línies en gris i amb color (0,1 UI/mL de Hep), línies amb color (1 μ m de cada lligand). c) Gràfic del percentatge d'hidròlisi al cap de 30 min en funció del corresponent factor d'amplificació per als lligands seleccionats. d) Imatge representativa de simulacions d'heparina (els àtoms de C es mostren en taronja) i sis molècules de lligand 3FF (els àtoms de C es presenten en cian). L'ampliació mostra les interaccions de 3FF i Hep (punts d'hidrogen i interaccions coulombianes: línies de punts grogues; interaccions CH- π : línies de punts magenta). Elaboració pròpia.

El pas següent va ésser comprovar la seva capacitat per a inhibir Hep, utilitzant el mateix assaig enzimàtic que en la prova de concepte (figura 6b). Els resultats van indicar que aquest increment d'afinitat tenia correlació amb una activitat més potent, i se superava fàcilment el compost precandidat (*lead*) anterior. La conclusió més important no va ésser només la troballa d'inhibidors més potents, sinó també la constatació que hi havia una correlació clara entre el factor d'amplificació detectat i l'activitat inhibidora determinada, amb la qual cosa es provava l'efectivitat de la nostra aproximació com un mètode per a identificar lligands actius que s'uneixen a Hep i compostos de complexitat similar (figura 6c).

Per comparar la potència dels nostres inhibidors amb els estàndards del mercat, vam fer estudis amb protamina [19], l'antídot de referència de Hep, en què vam poder comprovar que els nostres millors *hits*, 3AC i 3FF, presentaven una major eficàcia a una mateixa concentració. A més a més, la comparació dels nostres *hits* amb ciraparantag [29], una molècula que ha arribat a assaigs clínics com a antídot de Hep, va mostrar que 3FF presentava una activitat similar, mentre que 3AC era un agent de reversió encara més potent. És a dir, podíem començar a considerar els nostres compostos com a veritables antídots de Hep.

Per tal de comprovar l'efectivitat dels nostres antídots en un entorn més representatiu, vam provar 3FF i 3AC en assaigs de coagulació en mostres de sang provinents de conill i de ratolí (figura 7a). Vam observar que l'addició de Hep prevenia la coagulació sanguínia normal, però que, si els nostres antídots també hi eren presents, es recuperava una coagulació correcta, especialment a la concentració més alta utilitzada. Finalment, vam dur a terme uns primers assaigs *in vivo*, provant l'activitat dels nostres antídots de Hep en ratolins per mitjà d'un assaig de transsecció de cua (figura 7b). Els vam injectar Hep o sèrum, vam fer-los un petit tall a la cua i llavors vam mesurar la quantitat de sang perduda. D'aquesta manera vam poder veure l'efecte anti-coagulant de Hep i com els nostres antídots eren capaços de recuperar una coagulació sanguínia normal. A més, la seva citotoxicitat reduïda en diferents línies cel·lulars els convertia en bons candidats per a esdevenir futurs medicaments.

Així doncs, la QCD ens havia permès realitzar el viatge complet d'investigació en un laboratori: des de la identificació dels primers *hits* fins al desenvolupament d'antídots de Hep que han provat la seva utilitat en assaigs biològics en animals model [30].

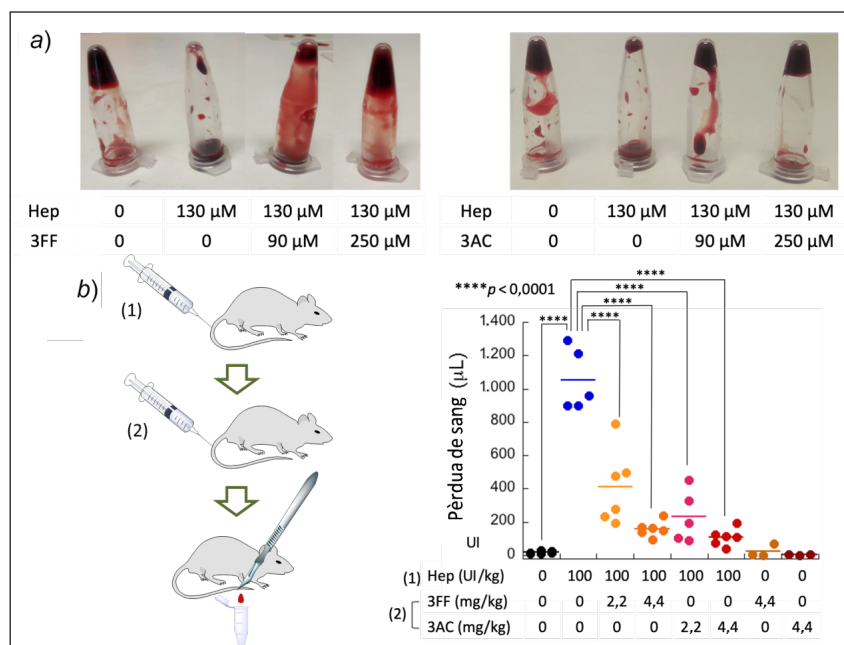


FIGURA 7. a) Experiment de coagulació *ex vivo* amb sang provinent de ratolí utilitzant Hep en combinació amb els antidòts 3FF i 3AC. La concentració molar de Hep s'ha calculat en relació amb les unitats de disacàrid. b) Assaig de transsecció de cua realitzat en ratolins per a provar l'activitat inhibidora de 3FF i 3AC sobre Hep. Els resultats estadísticament diferents (ANOVA, $p < 0,0001$) estan etiquetats. Elaboració pròpia.

Ampliació a altres heparinoids

Dintre del món dels anticoagulants, Hep és un dels actors principals, però amb el temps s'han desenvolupat un gran nombre d'anàlegs de mida més curta i definida, dits *heparinoids* [31]. Aquests compostos presenten una sèrie d'avantatges farmacocinètics i farmacodinàmics [32], com poden ser una acció més ràpida i més fàcil de predir. No obstant això, tenen un problema important: els antidòts descrits per a Hep són bastant menys efectius contra ells. En el cas de la protamina [33] —el principal antidòt de Hep—, la seva activitat baixa a la meitat en el cas de variants de Hep de mida mitjana i arriba a ser inexistent contra el fondaparinux (Fond), l'heparinoid més petit [34]. Òbviament, aquesta falta d'antidòts plenament efectius ha disminuït la seva introducció dins l'àmbit hospitalari, especialment en el cas del Fond [35].

Nosaltres havíem desenvolupat una sèrie d'antidòts contra l'efecte anticoagulant de Hep i coneixíem que el seu mecanisme d'inhibició consistia en la formació d'un complex antidòt-Hep. Tenint en compte les similituds estructurals entre els heparinoids, vam considerar que, probablement, els dos *leads* (3FF i 3AC) també haurien d'esser bons antidòts contra l'activitat dels heparinoids més petits [36].

És així que vam decidir comprovar-ho utilitzant una adaptació de l'assaig enzimàtic que havíem fet servir prèviament. Tal com es pot veure en la figura 8, els nostres antidòts eren capaços de recuperar la coagulació sanguínia normal en presència d'una quantitat equimolar de Fond, la qual cosa millorava l'activitat del ciraparantag (recuperació parcial) i la de la protamina (cap efecte). Es va detectar el mateix efecte en experiments *ex vivo* a partir de sang provinent de ratolí. Experiments de valoració mitjançant ressonància magnètica i de fluorescència i simulacions moleculars van confirmar un mecanisme d'inhibició anàleg al que havíem descrit per a Hep, a partir de la formació d'un complex antidòt-Fond, amb la qual cosa es validava la hipòtesi de partida. Per tant, els dos antidòts de Hep també constituïen agents de reversió contra el Fond.

Conclusions

En l'àmbit d'aquesta recerca, la química combinatòria dinàmica ha demostrat ésser una eina extremament convenient per a identificar potents lligands que s'uneixen a biomacromolècules amb una estructura difícil de determinar, amb un objectiu heterogeni, flexible i sense llocs actius clarament definits, com en el cas de l'heparina. A més, hem trobat una correlació

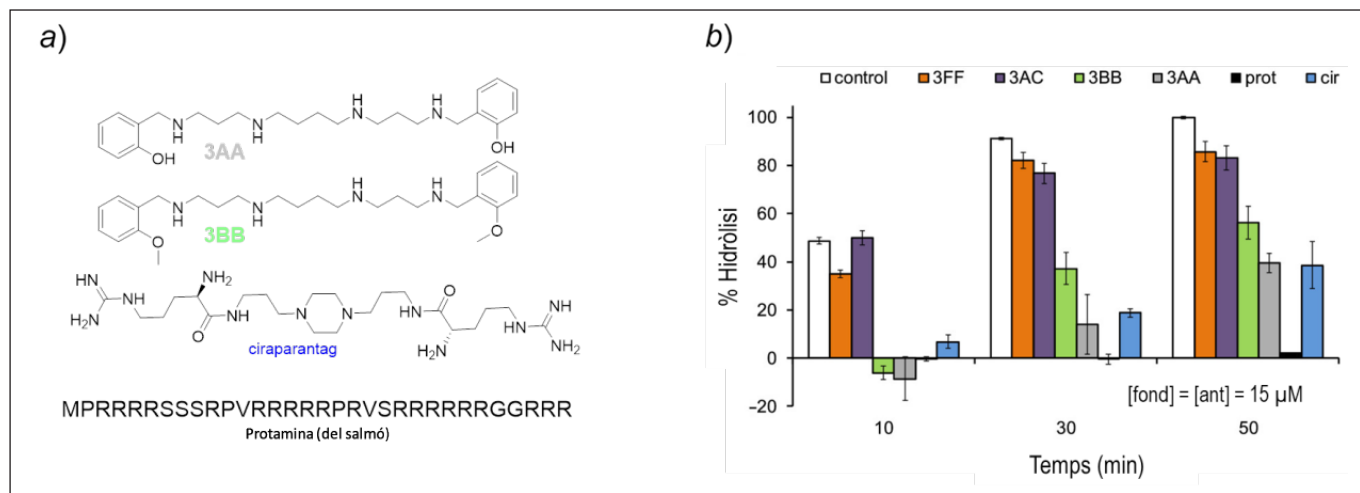


FIGURA 8. a) Estructura química dels antídots a més de 3FF i 3AC. b) Gràfic del percentatge de recuperació de la hidròlisi del pèptid ((recuperació d'hidròlisi en funció de Fond / màxima recuperació d'hidròlisi en funció de Fond) × 100) de mostres que contenien FX₃/AT_{III} a temps de reacció diferents: control (blanc), Fond + 3FF (taronja), Fond + 3AC (morat), Fond + 3BB (verd), Fond + 3AA (gris), Fond + protamina (negre) i Fond + ciraparantag (blau). En tots els casos, [Fond] = [Antidot] = 15 µM. Tots els experiments s'han repetit un mínim de tres cops. Elaboració pròpia.

excel·lent entre els resultats del cribratge per mitjà de llibreries dinàmiques i la potència d'inhibició d'heparina. Els antídots desenvolupats han demostrat tenir una activitat superior a la de qualsevol altre antídote d'heparinoides provat *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. A partir de la formació d'un complex entre l'heparinoid i els nostres antídots hem confirmat el mecanisme d'inhibició. Tenint en compte la seva prometedora activitat contra heparinoides d'un gran ventall de mides moleculars, preveiem el seu alt potencial com a antídots universals únics contra l'efecte de tot tipus d'anticoagulants similars a l'heparina, aplicació que estem estudiant actualment.

Agraïments

La recerca que ha permès obtenir els resultats que es presenten en aquest treball ha rebut finançament del Ministeri de Ciència, Innovació i Universitats, de l'Agència Estatal d'Investigació (MINECO/FEDER, CTQ2015-70117-R, PID2021-128411NB-I00, MCI/AEI/10.13039/501100011033 i FEDER/EU) i de l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2017 SGR 208).

Referències

[1] a) CORBETT, P. T.; LECLAIRE, J.; VIAL, L.; WEST, K. R.; WIETOR, J.-L.; SANDERS, J. K. M.; OTTO, S. «Dynamic combinatorial chemistry».

Chem. Rev., 106 (2006), p. 3652-3711; b) LEHN, J. M.; ELISEEV, A. V. «Dynamic combinatorial chemistry». *Science*, 291 (2001), p. 2331-2332.

[2] LEHN, J.-M. «From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry». *Chem. Soc. Rev.*, 36 (2007), p. 151-160.

[3] LEHN, J.-M. «Bridge from supramolecular chemistry to adaptive chemistry». A: BARBOUI, M. (ed.). *Constitutional dynamic chemistry*. Berlín; Heidelberg: Springer, 2012, p. 1-32.

[4] a) HUC, I.; LEHN, J.-M. «Virtual combinatorial libraries: Dynamic generation of molecular and supramolecular diversity by self-assembly». *PNAS*, 94 (6) (1997), p. 2106-2110.

b) ASHKENASY, G.; HERMANS, T. M.; OTTO, S.; TAYLOR, A. F. «Systems chemistry». *Chem. Soc. Rev.*, 46 (2017), p. 2543-2554.

[5] a) JAEGLER, M.; WONG, E. L.; TAUBER, C.; NAWROTZKY, E.; ARKONA, C.; RADEMANN, J. «Protein-templated fragment ligations—From molecular recognition to drug discovery». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56 (2017), p. 7358-7378; *Angew. Chem.*, 129 (2017), p. 7464-7485; b) MONDAL, M.; HIRSCH, A. K. H. «Dynamic combinatorial chemistry: A tool to facilitate the identification of inhibitors for protein targets». *Chem. Soc. Rev.*, 44 (2015), p. 2455-2488.

[6] WHITNEY, A. M.; LADAME, S.; BALASUBRAMANIAN, S. «Templated ligand assembly by using G-quadruplex DNA and dynamic covalent chemistry». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43 (2004), p. 1143-1146; *Angew. Chem.*, 116 (2004), p. 1163-1166.

[7] OTTO, S. «Dynamic molecular networks: From synthetic receptors to self-replicators». *Acc. Chem. Res.*, 45 (2012), p. 2200-2210.

- [8] SORS-VENDRELL, A.; ORTIZ, A.; MENESES, D.; ALFONSO, I.; SOLÀ, J.; JIMENO, C. «A degenerate metal-templated catalytic system with redundant functional groups for the asymmetric aldol reaction». *J. Org. Chem.*, 87 (2022), p. 7509–7513.
- [9] TAPIA, L.; PÉREZ, Y.; BOLTE, M.; CASAS, J.; SOLÀ, J.; QUESADA, R.; ALFONSO, I. «pH-Dependent chloride transport by pseudopeptidic cages for the selective killing of cancer cells in acidic microenvironments». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 58 (2019), p. 12465–12468; *Angew. Chem.*, 131 (2022), p. 12595–12598.
- [10] LAFUENTE, M.; SOLÀ, J.; ALFONSO, I. «A dynamic chemical network for cystinuria diagnosis». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 28 (2018), p. 8421–8424; *Angew. Chem.*, 130 (2018), p. 8557–8560.
- [11] FAGGI, E.; MOURE, A.; BOLTE, M.; VICENT, C.; LUIS, S. V.; ALFONSO, I. «Pseudopeptidic cages as receptors for N-protected dipeptides». *J. Org. Chem.*, 79 (2014), p. 4590–4601.
- [12] CARBAJO, D.; PÉREZ, Y.; BUJONS, J.; ALFONSO, I. «Live-cell-templated dynamic combinatorial chemistry». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59 (2000), p. 17202–17206; *Angew. Chem.*, 132 (2000), p. 17355–17359.
- [13] RABENSTEIN, D. L. «Heparin and heparan sulfate: Structure and function». *Nat. Prod. Rep.*, 19 (2002), p. 312–331.
- [14] KIM, S. Y.; JIN, W.; SOOD, A.; MONTGOMERY, D. W.; GRANT, O. C.; FUSTER, M. M.; FU, L.; DORDICK, J. S.; WOODS, R. J.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J. «Characterization of heparin and severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike glycoprotein binding interactions». *Antiviral Res.*, 181 (2020), art. 104873.
- [15] BERDIKI, A.; NEAGU, M.; GIATAGANA, E.-M.; KUSKOV, A.; TSATSAKIS, A. M.; TZANAKAKIS, G. N.; NIKITOVIC, D. «Glycosaminoglycans: Carriers and targets for tailored anti-cancer therapy». *Biomolecules*, 11 (2021), art. 395.
- [16] WEITZ, J.; HARENBERG, J. «New developments in anticoagulants: Past, present and future». *Thromb. Haemostasis*, 117 (2017), p. 1283–1288.
- [17] OURRI, B.; VIAL, L. «Lost in (clinical) translation: Recent advances in heparin neutralization and monitoring». *ACS Chem. Biol.*, 24 (2019), p. 2512–2526.
- [18] FERNÁNDEZ-RUIZ, I. «High-dose heparin for secondary prevention». *Nat. Rev. Cardiol.* [en línia] (2017). <<https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.175>>.
- [19] GUO, X.; HAN, I. S.; YANG, V. C.; MEYERHOFF, M. E. «Homogeneous enzyme-based binding assay for studying glycosaminoglycan interactions with macromolecules and peptides». *Anal. Biochem.*, 235 (1996), p. 153–160.
- [20] POLLACK, C. V.; REILLY, P. A.; RYN, J. van; EIKELBOOM, J. W.; GLUND, S.; BERNSTEIN, R. A.; DUBIEL, R.; HUISMAN, M. V.; HYLEK, E. M.; KAM, C.-W.; KAMPHUISEN, P. W.; KREUZER, J.; LEVY, J. H.; ROYLE, G.; SELKE, F. W.; STANGIER, J.; STEINER, T.; VERHAMME, P.; WANG, B.; YOUNG, L.; WEITZ, J. I. «Idarucizumab for dabigatran reversal – Full cohort analysis». *N. Engl. J. Med.*, 377 (2017), p. 431–441.
- [21] KALATHOTTUKAREN, M. T.; ABBINA, S.; YU, K.; SHENOI, R. A.; CREAGH, A. L.; HAYNES, C.; KIZHAKKEDATHU, J. N. «A polymer therapeutic having universal heparin reversal activity: Molecular design and functional mechanism». *Biomacromolecules*, 18 (2017), p. 3343–3358.
- [22] SCHUSTER, J.; KOULOV, A.; MAHLER, H.-C.; DETAMPEL, P.; HUWYLER, J.; SINGH, S.; MATHAES, R. «In vivo stability of therapeutic proteins». *Pharm. Res.*, 37 (2020), art. 23.
- [23] LEVY, J. H.; DOUKETIS, J.; WEITZ, J. I. «Reversal agents for nonvitamin K antagonist oral anticoagulants». *Nat. Rev. Cardiol.*, 15 (2018), p. 273–281.
- [24] a) WEISS, R. J.; ESKO, J. D.; TOR, Y. «Targeting heparin and heparan sulfate protein interactions». *Org. Biomol. Chem.*, 15 (2017), p. 5656–5668; b) WEISS, R. J.; GORDTS, P. L. S. M.; LE, D.; XU, D.; ESKO, J. D.; TOR, Y. «Small molecule antagonists of cell-surface heparan sulfate and heparin–protein interactions». *Chem. Sci.*, 6 (2015), p. 5984–5993.
- [25] a) NOTI, C.; SEEBERGER, P. H. «Chemical approaches to define the structure–activity relationship of heparin-like glycosaminoglycans». *Chem. Biol.*, 12 (2005), p. 731–756; b) CAPILA, I.; LINHARDT, R. J. «Heparin–protein interactions». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 (2002), p. 390–412; *Angew. Chem.*, 114 (2002), p. 426–450.
- [26] JIMÉNEZ-MORENO, E.; GÓMEZ, A. M.; CORZANA, F.; JIMÉNEZ-OSÉS, G.; BASTIDA, A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ASENSIO, J. L. «Modulating weak interactions for molecular recognition: A dynamic combinatorial analysis for assessing the contribution of electrostatics to the stability of CH– π bonds in water». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54 (2015), p. 4344–4348; *Angew. Chem.*, 127 (2015), p. 4418–4422.
- [27] BAZZICALUPI, C.; BENCINI, A.; BIANCHI, A.; CECCHI, M.; ESCUDER, B.; FUSI, V.; GARCÍA-ESPAÑA, E.; GIORGI, C.; LUIS, S. V.; MACCAGNI, G.; MARCELINO, V.; PAOLETTI, P.; VALTANCOLI, B. «Thermodynamics of phosphate and pyrophosphate anions binding by polyammonium receptors». *J. Am. Chem. Soc.*, 121 (1999), p. 6807–6815.
- [28] CORREDOR, M.; CARBAJO, D.; DOMINGO, C.; PÉREZ, Y.; BUJONS, J.; MESSEGUER, A.; ALFONSO, I. «Dynamic covalent identification of an efficient heparin ligand». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57 (2018), p. 11973–11977; *Angew. Chem.*, 130 (2018), p. 12149–12153.
- [29] ANSELL, J. E.; LAULICHT, B. E.; BAKHRU, S. H.; HOFFMAN, M.; STEINER, S. S.; COSTIN, J. C. «Ciraparantag safely and completely reverses the anticoagulant effects of low molecular weight heparin». *Thromb. Res.*, 146 (2016), p. 113–118.

- [30] CARBAJO, D.; PÉREZ, Y.; GERRA-REBOLLO, M.; PRATS, E.; BUJONS, J.; ALFONSO, I. «Dynamic combinatorial optimization of in vitro and in vivo heparin antidotes». *J. Med. Chem.*, 65 (2022), p. 4865–4877.
- [31] GANDHI, N. S.; MANCERA, R. L. «Heparin/heparan sulphate-based drugs». *Drug Discovery Today*, 15 (2010), p. 1058–1069.
- [32] ABDELFADEL, E. I.; GUNTA, R.; VILLURI, B. K.; AFOSAH, D. K.; SANKARANARAYANAN, N. V.; DESAI, U. R. «Designing smaller, synthetic, functional mimetics of sulfated glycosaminoglycans as allosteric modulators of coagulation factors». *J. Med. Chem.*, 66 (2023), p. 4503–4531.
- [33] VEEN, J. J. van; MACLEAN, R. M.; HAMPTON, K. K.; LAIDLAW, S.; KITCHEN, S.; TOTH, P.; MAKRIIS, M. «Protamine reversal of low molecular weight heparin: Clinically effective». *Blood Coagulation Fibrinolysis*, 22 (2011), p. 556–570.
- [34] BAUER, K. A.; HAWKINS, D. W.; PETERS, P. C.; PETITOU, M.; HERBERT, J.-M.; BOECKEL, C. A. A. van; MEULEMAN, D. G. «Fondaparinux, a synthetic pentasaccharide: The first in a new class of anti-thrombotic agents – The selective factor Xa inhibitors». *Cardiovasc. Drug Rev.*, 20 (2002), p. 37–52.
- [35] GIANGRANDE, P. L. F. «Fondaparinux (Arixtra): A new anti-coagulant». *Int. J. Clin. Pract.*, 56 (2002), p. 615–617.
- [36] CARBAJO, D.; PÉREZ, Y.; CASTELO, G. F.; PRATS, E.; BUJONS, J.; ALFONSO, I. «Efficient small-molecule reversal agents for anticoagulant fondaparinux». *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, 8 (2025), p. 1333–1346.



D. Carbajo



I. Alfonso

Daniel Carbajo és doctor per la Universitat de Barcelona, on va realitzar la tesi, centrada en l'estudi de l'estructura i les aplicacions biològiques de pèptids foldamèrics. Posteriorment, va realitzar una estada postdoctoral en el camp de la química supramolecular a l'Institut de Chimie et Biologie de Bordeaux (França) (2013-2016), des d'on va marxar al Regne Unit, per estar un any a l'School of Life Sciences de la Universitat de Dundee (2017), desenvolupant sondes per a l'activitat parkinsoniana en cèl·lules vives. Finalment, el 2018 va tornar a Barcelona i es va incorporar al Grup de Química Supramolecular de l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), on ha estat fins ara. Actualment, treballa en l'ús de la química covalent dinàmica per a la identificació de lligands a glicosaminoglicans d'importància biològica.

Ignacio Alfonso es va formar inicialment com a químic orgànic a la Universitat d'Oviedo. Ha treballat en institucions de primer nivell a França (Universitat d'Estrasburg, 1997) i als EUA (The Scripps Research Institute, 2000-2002). Després de ser seleccionat per al contracte Ramón y Cajal el 2004 (Universitat Jaume I, Castelló), el 2007 va obtenir una posició permanent a l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC) de Barcelona, on va crear el Grup de Química Supramolecular que ha dirigit des de llavors. Els seus interessos de recerca són la química supramolecular, la biologia química, els sistemes químics dinàmics complexos i en general tots els aspectes relacionats amb el reconeixement molecular d'espècies biorelevants.