

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 942**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 30/88** (2006.01)

**G01N 30/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2006 E 06813046 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 1941269**

54 Título: **Método de examen de una diana biológica para determinar interacciones débiles usando cromatografía de afinidad débil**

30 Prioridad:

**27.10.2005 US 730808 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**29.01.2016**

73 Titular/es:

**TRANSIENTIC INTERACTIONS AB (100.0%)  
Tivolivägen 13  
193 33 Sigtuna, SE**

72 Inventor/es:

**OHLSON, STEN;  
SHORAVI, SIAMAK;  
FEX, TOMAS y  
ISAKSSON, ROLAND**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 557 942 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método de examen de una diana biológica para determinar interacciones débiles usando cromatografía de afinidad débil

5

**Antecedentes de la invención**

10 Resulta familiar la noción de que muchas interacciones biológicas se basan en la unión transitoria (constantes de disociación ( $K_d$ ) en el intervalo de 10 mM a 0,01 mM), aunque sólo se ha sido consciente de sus implicaciones para las ciencias biológicas recientemente (Gabiús, H.-J. & Gabiús, S. (eds.) *Glycosciences: Status and Perspectives* (Chapman & Hall, Weinheim, 1997)). Un área importante de las ciencias biológicas es el diseño de fármacos en el que ha prevalecido la visión tradicional de unión de tipo "cerradura y llave" y habitualmente se seleccionan los candidatos a fármaco según sus beneficios como elementos de unión fuerte. Sin embargo, el fundamento de que las interacciones transitorias son de importancia para el descubrimiento de fármacos está adquiriendo aceptación  
15 lentamente. Estas interacciones pueden estar relacionadas no sólo con la interacción con la diana deseada, sino también con interacciones no deseadas que crean problemas de toxicidad o con interacciones con transportadores de fármacos implicados en la absorción y/o excreción (Steffansen, B. *et al.* *Intestinal Solute Carriers: An Overview of Trends and Strategies for Improving Oral Drug Absorption*. *Eur. J. Pharm. Sciences* 21, 3-16 (2004)). En el presente documento, se demuestra en un formato de examen de alto rendimiento, la selección por afinidad de elementos de  
20 unión débil a una diana modelo de albúmina mediante cromatografía de retardo zonal (Steffansen, B. *et al.* *Intestinal Solute Carriers: An Overview of Trends and Strategies for Improving Oral Drug Absorption*. *Eur. J. Pharm. Sciences* 21, 3-16 (2004)). Se percibe que este enfoque puede definir el "fármaco transitorio" como complemento a los procedimientos de descubrimiento de fármacos actuales.

25 Las interacciones biológicas transitorias forman la esencia del interactoma y se producen constantemente en el interior de las células, en las superficies celulares o en la matriz extracelular. Son "dinámicas" con constantes de velocidad de disociación ( $k_d$ )  $> 0,1 \text{ s}^{-1}$  y están gobernadas por las concentraciones locales del par biológico de interacción. Pueden actuar en paralelo, tal como las interacciones de las bases apiladas de ADN, o en un modo en serie tal como la acción de sustratos de molécula pequeña o inhibidores sobre una enzima. Las macromoléculas  
30 biológicas experimentan varias interacciones transitorias a través de sus aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos o nucleótidos componentes. Estas macromoléculas forman conjuntos expresados como orgánulos celulares que están implicados en un complejo balance de interacciones débiles que forman la red de la entidad biológica.

35 A medida que evolucionan las tecnologías para estudiar y caracteriza interacciones transitorias basándose en cromatografía (Strandh, M., Andersson, H. & Ohlson, S. en *Methods in Molecular Biology* (eds. Bailon, P., Ehrlich, G. K., Fung, W. J. & Berthold, W.) 7-24 (Humana Press, Inc, Totowa, NJ, 2000)), electroforesis (Nilsson, M. *et al.* *Determination of Protein-Ligand Affinity Constants from Direct Migration Time in Capillary Electrophoresis*. *Electrophoresis* 25, 1829-1836 (2004)), biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) (MacKenzie, C. R. *et al.* *Analysis by Surface Plasmon Resonance of the Influence of Valence on the Ligand Binding Affinity and Kinetics of an Anti-Carbohydrate Antibody*. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 1527-1533 (1996)), espectroscopía de fluorescencia (Engström, H. A., Andersson, P. O. & Ohlson, S. *Analysis of the Specificity and Thermodynamics of the Interaction between Low Affinity Antibodies and Carbohydrate Antigens using Fluorescence Spectroscopy*. *J Immunol Methods* 297, 203-211 (2005)), resonancia magnética nuclear (RMN) (Pellechia, M., Sem, D. S. & Wuthrich, K. *NMR in Drug Discovery*. *Nature Reviews in Drug Discovery* 1, 211-219 (2002)), calorimetría (Plotnikov, V. *et al.* *An Autosampling Differential Scanning Calorimeter Instrument for Studying Molecular Interactions*. *Assay Drug Dev. Technol.* 1, 83-90 (2002)) y quimioluminiscencia (Causey, L. D. & Dwyer, D. S. *Detection of Low Affinity Interactions Between Peptides and Heat Shock Proteins by Chemiluminescence of Enhanced Avidity Reactions (CLEAR)*. *Nature Biotechnology* 14, 348-351 (1996)), se están esclareciendo ahora gradualmente la naturaleza de la unión transitoria en diversas áreas tales como interacciones bacterianas y virales (Mammen, M., Choi, S.-K. & Whitesides, G. M. *Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 2754-2794 (1998)), interacciones celulares (Dustin, M. L. *et al.* *Low Affinity Interaction of Human or Rat T Cell Adhesion Molecule CD2 with Its Ligand Aligns Adhering Membranes to Achieve High Physiological Affinity*. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 30889-30898 (1997)), interacciones proteína-proteína (péptido) (Karjalainen, K. *High-Sensitivity, Low Affinity-Paradox of T-Cell Receptor Recognition*. *Current Opinion in Immunology* 6, 9-12 (1994); Beeson, C. *et al.* *Early Biochemical Signals Arise from Low Affinity TCR-Ligand Reactions as the Cell-Cell Interface*. *J. Exp. Med* 184, 777-782 (1996); y Garcia, C. D., DeGail, J. H., Wilson, W. W. & Henry, C. S. *Measuring Protein Interactions by Microchip Self-Interaction Chromatography*. *Biotechnol. Prog.* 19, 1006-1010 (2003)), interacciones proteína-hidrato de carbono (Zopf, D. & Roth, S. *Oligosaccharide Anti-infective Agents*. *Lancet* 347, 1017-1021 (1996); y Elgavish, S. & Shaanan, B. *Lectin-Carbohydrate interactions: Different Folds, Common Recognition Principles*. *TIBS* 22, 462-467 (1997)) e interacciones hidrato de carbono-hidrato de carbono (Fuente, J. M. d. 1. & Penadés, S. *Understanding Carbohydrate-Carbohydrate Interactions by means of Glyconanotechnology*. *Glycoconjugate Journal* 21, 149-163 (2004)).

65 La misma naturaleza de las interacciones biológicas transitorias hace que sean atractivas en el laboratorio para al menos dos líneas de investigación principales. En primer lugar, tal como se demostró en los últimos años, pueden usarse en aplicaciones de diagnóstico para monitorizar de manera continua cantidades fluctuantes de biomoléculas

en tiempo real (Ohlson, S., Jungar, C., Strandh, M. & Mandenius, C.-F. Continuous Weak-affinity Immunosensing. Trends in Biotechnology 18, 49-52 (2000)) o para desarrollar moléculas de reconocimiento más específicas frente a dianas en las que los enfoques tradicionales de ligandos de alta afinidad pueden no ofrecer una solución viable (Regenmortel, M. H. V. V. From absolute to exquisite specificity. Reflections on the fuzzy nature of species, specificity and antigenic sites. J. Immunol. Methods 216, 37-48 (1998); y Leickt, L., Grubb, A. & Ohlson, S. Development of Monoclonal Antibodies against creatine kinase CKMB2. Scand J Clin Lab Invest 62, 423-430 (2002)). En segundo lugar, debido a la naturaleza transitoria de muchas interacciones en una entidad biológica, puede preverse que los fármacos sintéticos pueden ser similares en cuanto al comportamiento de unión a sus homólogos naturales. Tales fármacos "transitorios" pueden ser atractivos por varios motivos. Por ejemplo, pueden diseñarse, en un formato o bien monovalente o bien polivalente, con una especificidad superior a la del fármaco de alta afinidad tradicional. Pueden minimizarse la tolerancia o efectos secundarios graves de la acción farmacológica con un fármaco de unión débil, por ejemplo, en su unión a proteínas de citocromo p450. Puede aumentarse la absorción de fármacos a través de interacciones débiles con mecanismos de captación específicos. Además, la concentración activa también puede ser una herramienta eficaz para gobernar el efecto biológico del fármaco.

Además, en la carrera para descubrir nuevas moléculas farmacológicas, existe un interés aumentado por buscar bibliotecas de compuestos con moléculas pequeñas que puedan optimizarse posteriormente aumentando el tamaño e introduciendo funcionalidades adicionales. Tales enfoques basados en fragmentos (Erlanson, D. A., McDowell, R. S. & O'Brien, T. Fragment-Based Drug Discovery. Journal of Medicinal Chemistry 47, 3463-3482 (2004)), que identifican moléculas pequeñas que se unen con baja afinidad, están usándose cada vez más en el descubrimiento de fármacos. Las moléculas candidatas a fármaco de unión débil en la práctica a menudo son difíciles de examinar. Existen métodos disponibles basados en RMN, espectrometría de masas y cristalografía de rayos X pero estos no están diseñados para detectar elementos de unión débiles en una base de alto rendimiento, en la que pueden examinarse miles de muestras al día. Además, también se han aplicado métodos de "examen virtual" con éxito limitado, principalmente con fragmentos rígidos inflexibles (Erickson, J. A., Jalaie, M., Robertson, D. H., Lewis, R. A. & Viet, M. Lessons in Molecular Recognition: The Effects of Ligand and Protein Flexibility on Docking Accuracy. Journal of Medicinal Chemistry 47, 45-55 (2004)).

En los últimos años, el examen de alto rendimiento (HTS, *high throughput screening*) de bibliotecas de compuestos se ha convertido en una importante herramienta para la identificación de posibles candidatos a fármaco (Sundberg, S. A. High-Throughput and Ultra-High-Throughput Screening: Solution- and Cell-Based Approaches. Current Opinion in Biotechnology 11, 47-53 (2000); y Williams, G. P. Advances in High Throughput Screening. Drug Discovery Today 9, 515-516 (2004)). La tecnología de HTS ha evolucionado rápidamente con el desarrollo de equipos automatizados y miniaturizados que ahora pueden manipular varios cientos de miles de muestras. Se usan normalmente técnicas de ensayo de unión en placa convencionales con fluorescencia, radiactividad o absorbancia óptica como plataforma de detección. Una importante restricción de estas técnicas es que sólo pueden medir interacciones fuertes (una concentración de ensayo típica es de 10  $\mu$ M) porque los elementos de unión de fármaco transitorio se eliminan por lavado en el procedimiento de ensayo. Otra limitación es que sólo ofrecen evidencias de unión cuando ha de implementarse la identificación de la pareja de unión.

Se ha desarrollado la cromatografía de afinidad como una potente herramienta principalmente para la purificación de proteínas. Además, la cromatografía de afinidad frontal en combinación con la espectrometría de masas se ha usado para aplicaciones de descubrimiento de fármacos (Chan, N. W. C., Lewis, D. F., Rosner, P. J., Kelly, M. A. & Schriemer, D. C. Frontal Affinity Chromatography-Mass Spectrometry Assay Technology for Multiple Stages of Drug Discovery: Applications of a Chromatographic Biosensor. Anal Chem 319, 1-12 (2003)) para detectar elementos de unión de alta afinidad. Ahora, con la introducción de la cromatografía de afinidad débil (WAC, *weak affinity chromatography*) (Ohlson, S., Lundblad, A. & Zopf, D. Novel Approach to Affinity Chromatography Using "Weak" Monoclonal Antibodies. Analytical Biochemistry 169, 204-208 (1988)) para retardo zonal, están surgiendo métodos de alto rendimiento que proporcionan información sobre la afinidad y cinética de interacciones débiles con biomoléculas, en los que habitualmente se lleva a cabo separación cromatográfica en condiciones isocráticas suaves, lo que podría ser fisiológicamente relevante. Con el fin de identificar eficazmente candidatos que presentan afinidad débil, existe la necesidad de una metodología que soporte un rápido examen y selección de posibles moléculas farmacológicas. La presente invención tiene como objetivo proporcionar un método de este tipo.

## Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un método de identificación de moléculas farmacológicas candidatas que presentan afinidad débil mediante examen de una diana biológica para determinar interacciones débiles transitorias entre la diana y una biblioteca de ligandos. El método de la invención comprende las etapas de proporcionar una composición de una diana biológica; proporcionar una pluralidad de fases estacionarias a partir de dicha composición; transportar una pluralidad de composiciones de ligando hasta dichas fases estacionarias, estableciendo de ese modo contactos entre dichos ligandos y dichas dianas biológicas; recoger, aguas abajo de dichas fases estacionarias, información de retardo zonal para cada ligando; y finalmente seleccionar ligandos que presentan afinidad débil por dicha diana, en el que dichos ligandos tienen constantes de disociación ( $K_d$ ) en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mM. Los ligandos seleccionando que tienen uniones transitorias a la diana biológica pueden someterse a estudios adicionales referentes a su comportamiento de unión,

por ejemplo con análisis mediante RMN, con el fin de la identificación de uno o varios compuesto(s) líder. El método implica normalmente una etapa de detección, en la que llegan ligandos de dichas fases estacionarias durante un periodo de tiempo suficiente para discriminar entre diferentes afinidades de ligando y recogiendo para este fin información de retardo zonal, de la manera más importante el tiempo de retención y el ancho de banda para estimar la afinidad y la dinámica de cada interacción ligando/diana. La naturaleza del procedimiento de detección no es crítica para la invención y se determina más bien con respecto a la química de la biblioteca de ligandos.

Según un aspecto, la diana biológica se proporciona en una composición inmovilizada, por ejemplo la diana se inmoviliza en un soporte sólido. El experto en esta tecnología conoce varios materiales de soporte adecuados y medios para absorber o unir químicamente moléculas biológicas a los mismos. En un ejemplo, la composición inmovilizada puede usarse con columnas de cromatografía o sistemas de múltiples pocillos y medios para la elución con una fase móvil. En un ejemplo específico, puede inmovilizarse una diana proteica en partículas de sílice funcionalizada con métodos convencionales y empaquetadas en una pluralidad de pocillos de cromatografía, tras lo cual se inyectan composiciones de ligando en cada pocillo antes de la elución con fase móvil y la recogida de fracciones para la detección.

Según otro aspecto, pueden formarse fases estacionarias que incluyen una diana biológica en una pluralidad de canales miniaturizados en un soporte sólido, tal como una placa delgada, un chip o un disco. El soporte sólido puede tener una primera zona para recibir una pluralidad de composiciones de ligando para el transporte hasta dicha diana biológica y una zona de detección aguas abajo de dicha primera zona. De manera adecuada, el transporte en el soporte sólido tiene lugar mediante fuerzas capilares y/o fuerzas centrífugas cuando los ligandos se desplazan desde la primera zona hasta la zona de detección.

En un ejemplo sobre cómo puede realizarse en la práctica el método de la invención, se forma un sistema que incluye una placa de múltiples pocillos con diana biológica inmovilizada en cada uno de los pocillos. El sistema comprende además medios para suministrar composiciones de los ligandos a cada pocillo y una serie de placas colectoras coincidentes para recoger fracciones de fase móvil eluida y la posterior detección. El sistema puede comprender además medios para asistir en la suplementación, el transporte y la elución de la fase móvil. La parte siguiente de la memoria descriptiva proporciona ejemplos más detallados e ilustrativos sobre cómo llevar a cabo la invención y el experto puede deducir varias alternativas que se encontrarán todavía bajo las reivindicaciones adjuntas.

### Descripción detallada y de ejemplificación de la invención

Figura 1: Configuración esquemática de examen de separación por afinidad zonal en un formato de 96 pocillos.

Figura 2: Cromatografía de afinidad débil zonal en un pocillo. Bupivacaína (1 mM) y propranolol (0,25 mM) experimentaron retardo tal como se indica por su vértice de pico. La azida de sodio (0,5 mM) era un marcador de volumen vacío (sustancia no retardada).

Figura 3: Reproducibilidad de pocillo a pocillo de la cromatografía de afinidad débil zonal de bupivacaína (1 mM). Bupivacaína experimentó retardo en tres pocillos diferentes y se repitió la cromatografía en cada pocillo.

En este estudio modelo se han observado las interacciones débiles entre algunos fármacos conocidos y albúmina sérica bovina (BSA). Se han utilizado satisfactoriamente proteínas como orosomucoide, albúmina bovina y albúmina humana como selectores para determinar la composición enantiomérica de un gran número de fármacos. En este caso, la afinidad entre fármaco y proteína se encuentra normalmente en el intervalo de una interacción transitoria, es decir valores de  $K_d$  de  $10^{-1}$  -  $10^{-5}$  M. Se sabe bien a partir de estudios anteriores que BSA es una proteína modelo excelente y muestra afinidad de unión variable así como (enantio)selectividad con un gran número de fármacos (Haginaka, J. Protein-based Chiral Stationary Phases for High-performance Liquid Chromatography Enantioseparations. J of Chromatography A 906, 253-273 (2001)). Incluso con la configuración experimental algo básica en un formato de 96 pocillos (figura 1), estos resultados demuestran (figura 2) que pueden detectarse pequeñas diferencias de selectividad a pesar de los cortos tiempos de retención, lo que indica su posible uso para aplicaciones de HTS. Las sustancias se retardan ligeramente por unión transitoria, probablemente con afinidades de 0,1-1 mM, como consecuencia de una alta concentración activa de sitios de unión a albúmina (aproximadamente 1 mM). Además las separaciones muestran una excelente reproducibilidad tal como puede observarse en la figura 3. Los experimentos también demuestran la posibilidad de realizar separaciones por afinidad débil de un modo paralelo y en un formato de placa de múltiples pocillos. Con la optimización de las técnicas de empaquetamiento de columnas y métodos de manipulación de líquidos, probablemente se reducirán los volúmenes relativamente grandes de las zonas eluidas (bandas). Las diferencias de retención entre propranolol, bupivacaína y azida de sodio (que proporcionan el volumen de elución no retenido) son bastante significativas y concuerdan con los métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución usando columnas analíticas comerciales correspondientes.

Los resultados presentados en este caso indican la posibilidad de usar cromatografía para el examen de fenómenos de unión transitoria. Mediante la robotización y miniaturización de esta plataforma analítica, se anticipa que pueden realizarse miles de separaciones en cuestión de minutos. Los resultados proporcionan información instantánea

sobre la afinidad y cinética de elementos de unión transitorios relevantes en cuanto a su tiempo de retención y extensión de banda. Con los resultados anteriores, los inventores están convencidos de que el enfoque presentado en este documento puede ofrecer una herramienta complementaria que puede abrir áreas alternativas de investigación de fármacos, buscando "fármacos transitorios" que se unen de manera dinámica a sus dianas.

5 Implementando una plataforma de HTS basada en cromatografía de afinidad débil, podrá explorarse esta hipótesis en mayor detalle y determinar cómo puede aprovecharse este concepto para el descubrimiento de fármacos.

#### Métodos

##### 10 *Preparación de material de BSA-sílice:*

Se prepararon micropartículas de diol-sílice (partículas de 10  $\mu$ m, tamaño de poro de 300 Å) según métodos convencionales (Ohlson, S., Lundblad, A. & Zopf, D. Novel Approach to Affinity Chromatography Using "Weak" Monoclonal Antibodies. Analytical Biochemistry 169, 204-208 (1988)) usando  $\gamma$ -glicidoxipropiltrimetoxisilano como reactivo de silanización. En una etapa posterior, se oxidó el diol usando ácido peryódico ( $H_5IO_6$ ) para producir aldehído-sílice. En este material de soporte, se inmovilizó albúmina sérica bovina (BSA) mediante aminación reductora usando cianoborohidruro de sodio para reducir el producto intermedio de base de Schiff (BSA-diol-sílice) (Ohlson, S., Lundblad, A. & Zopf, D. Novel Approach to Affinity Chromatography Using "Weak" Monoclonal Antibodies. Analytical Biochemistry 169, 204-208 (1988)). Según el análisis de UV (280 nm) directamente sobre gel, se inmovilizaron 130 mg de BSA por g sílice correspondiente a un rendimiento del 80%.

15

20

##### *Preparación y empaquetamiento de pocillos de cromatografía:*

Se suspendieron 200 mg de gel de referencia (diol-sílice) y gel de ensayo (BSA-diol-sílice) en 1 ml de metanol y se empaquetó en cada pocillo de un sistema de filtración de 96 pocillos (placa de fibra de vidrio de 10  $\mu$ m de 96 pocillos Captiva® de Ansys Technologies (empresa), véase la figura 1) usando vacío aplicado a los pocillos. En primer lugar se lavó el gel en los pocillos con 5 ml de MeOH y luego con 5 ml de tampón fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0. Se colocaron discos de filtro encima del material de gel en cada pocillo.

25

##### 30 *Cromatografía de afinidad débil zonal en un formato de placa de 96 pocillos: (véase la figura 1)*

Se lavaron cuidadosamente los pocillos que contenían materiales de gel con tampón fosfato de sodio 0,05 M pH 7,0 usando un collarín de vacío para eliminar BSA no unida, contaminantes y aire atrapado. Se retiró suavemente el exceso de tampón de la superficie de los pocillos usando una pipeta y se inyectaron 10  $\mu$ l de sustancias de prueba de manera central en cada pocillo que entonces se lavaron con fase móvil (tampón fosfato de sodio 0,05 M pH 7,0). Se aplicó vacío al collarín y se hizo fluir la fase móvil hacia la placa de recogida de 96 pocillos (Nunc, Nalgene-Nunc) en un plazo de 8-10 segundos. Entonces se redujo el vacío y se reemplazó la placa de recogida (aproximadamente 0,2 ml en cada pocillo) por una nueva. Se repitió este proceso de recogida de fracciones con 20-75 placas. Durante este procedimiento, se eluyeron los pocillos con fase móvil de manera continua. Se tuvo cuidado para garantizar que el nivel de tampón en cada pocillo no disminuyera por debajo del nivel de superficie del gel. Se transfirieron cuidadosamente los eluatos mediante pipetas automáticas y se pesaron para estimar el volumen de retención. Se realizaron todos los procedimientos a temperatura ambiente (20°C). Se detectaron las sustancias eluidas mediante barridos de UV a 230 nm. Se obtuvieron los cromatogramas representando gráficamente la absorbancia UV frente al volumen de fracción.

35

40

45

**REIVINDICACIONES**

1. Método de identificación de moléculas farmacológicas candidatas que presentan afinidad débil mediante el examen de una diana biológica para determinar interacciones débiles transitorias entre la diana y una biblioteca de ligandos, que comprende las etapas de:
- (i) proporcionar una composición de una diana biológica;
- (ii) proporcionar una pluralidad de fases estacionarias a partir de dicha composición inmovilizando una diana proteica en un soporte sólido en forma de partículas de sílice funcionalizada empaquetadas en pocillos de cromatografía;
- (iii) transportar una pluralidad de composiciones de ligando hasta dichas fases estacionarias, estableciendo de ese modo contactos entre dichos ligandos y dichas dianas;
- (iv) recoger, aguas abajo de dichas fases estacionarias, información de retardo zonal para cada ligando y detectar cuantitativamente dichos ligandos en composiciones que llegan de dichas fases estacionarias para discriminar entre diferentes afinidades de ligando para estimar la afinidad y la dinámica de cada interacción ligando/diana; y
- (v) seleccionar ligandos que presentan afinidad débil por dicha diana, en el que dichos ligandos tienen constantes de disociación ( $K_d$ ) en el intervalo de 0,01 a 10 mM.
2. Método según la reivindicación 1, en el que información de retardo zonal se selecciona del tiempo de retención y el ancho de banda.
3. Método según la reivindicación 1, que comprende eluir de manera continua dicha fase estacionaria con una fase móvil.

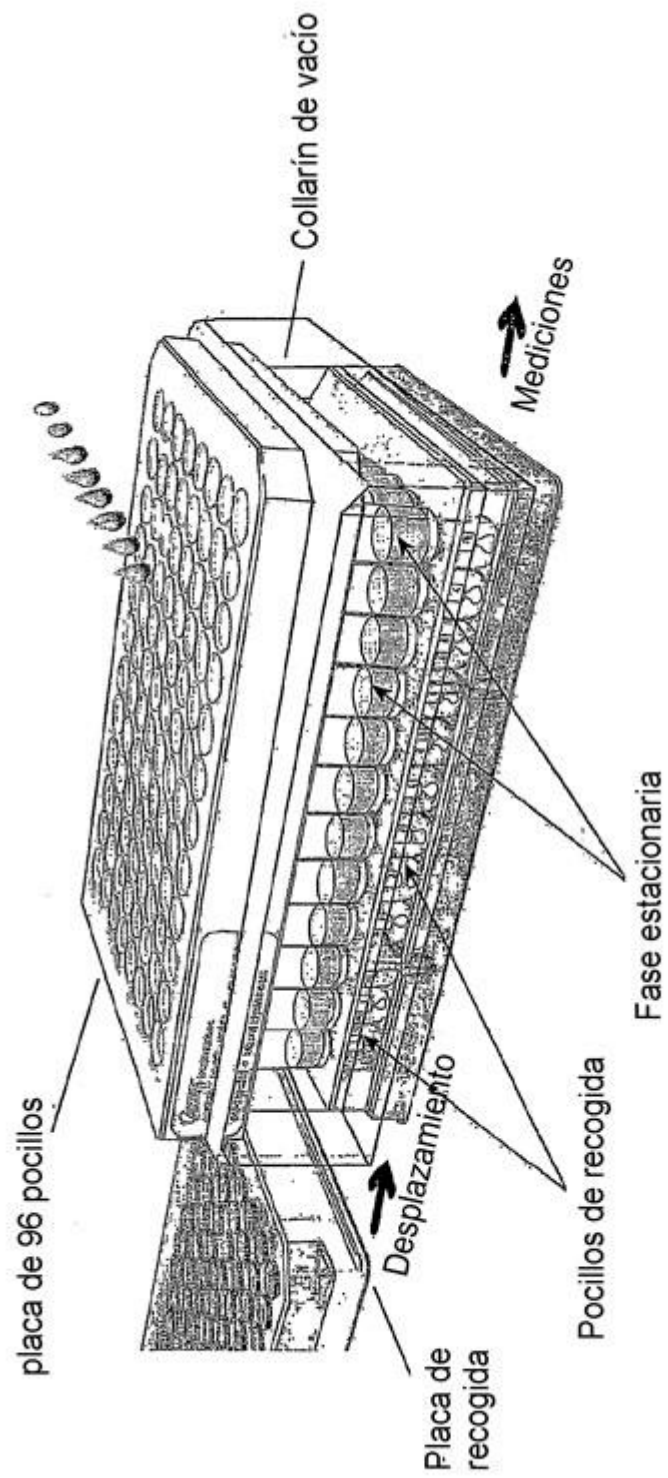


Fig. 1

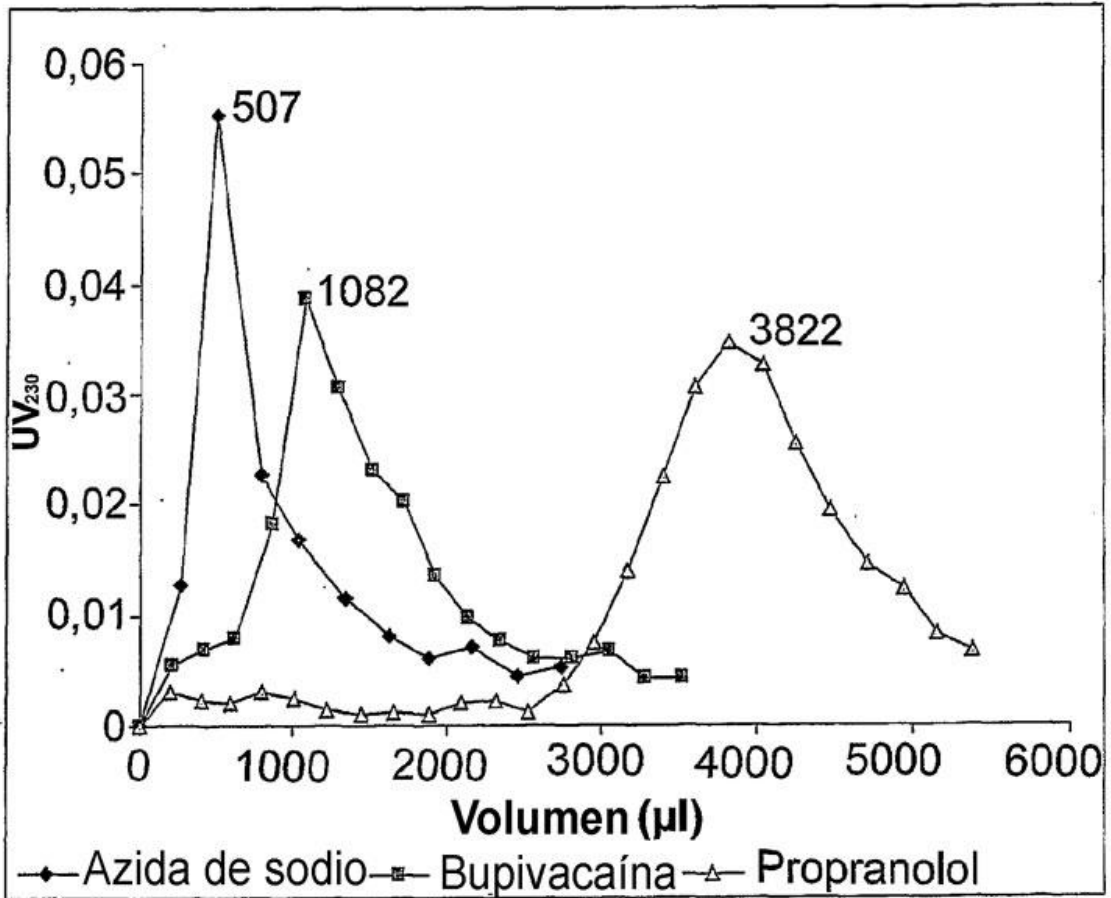


Fig. 2



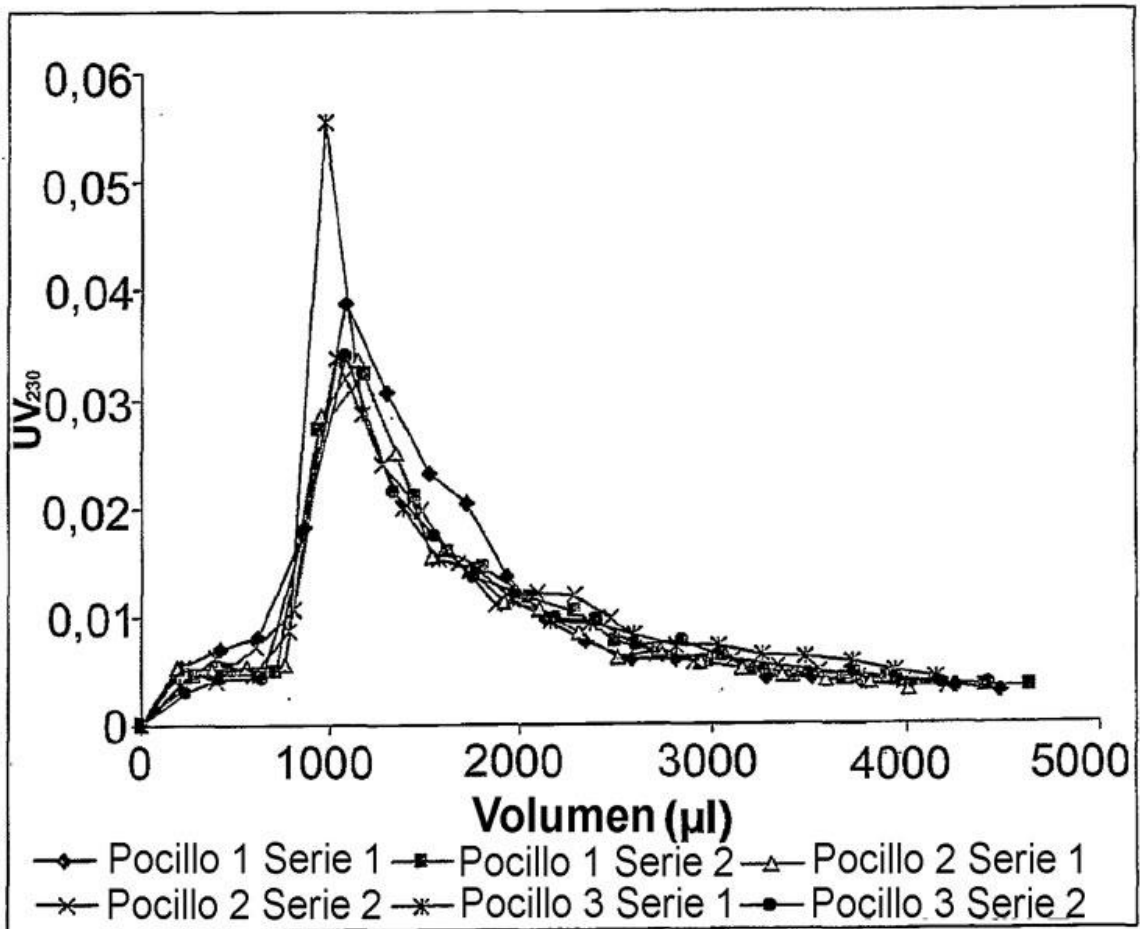


Fig. 3