



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 368 041**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03766390 .3**

96 Fecha de presentación : **01.08.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1530635**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.05.2005**

54 Título: **Ácidos nucleicos de unión a ghrelina.**

30 Prioridad: **01.08.2002 EP 02017317**  
**19.10.2002 EP 02023637**  
**23.06.2003 EP 03014111**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.11.2011**

73 Titular/es: **NOXXON PHARMA AG.**  
**Max-Dohrn-Strasse 8-10**  
**10589 Berlin, DE**

72 Inventor/es: **Helmling, Steffen;**  
**Eulberg, Dirk;**  
**Maasch, Christian y**  
**Klussmann, Sven**

74 Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 368 041 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

Ácidos nucleicos de unión a ghrelina

La presente invención se refiere a un antagonista para ghrelina, un ácido nucleico que tiene una secuencia específica, un ácido nucleico de unión a ghrelina, uso de tales ácidos nucleicos, y tal antagonista, respectivamente, composición que comprende tal ácido nucleico y tal antagonista, respectivamente, y un complejo que comprende tal ácido nucleico, y un kit que comprende tal ácido nucleico y antagonista, respectivamente. La ghrelina se identificó como el ligando natural del receptor secretagogo de la hormona de crecimiento 1a (GHSR1a). El receptor es más abundante en la glándula hipofisaria y en las partes hipotalámicas del cerebro, pero también se puede detectar en otros tejidos en concentraciones bajas. Desde fines de la década de 1970, se ha demostrado que péptidos sintéticos y otros compuestos, denominados secretagogos estimulan la liberación de la hormona de crecimiento. Sin embargo, el responsable natural para la liberación de la hormona de crecimiento continuaba desconocido hasta el descubrimiento de la ghrelina en 1999. La ghrelina es una hormona peptídica de 28 aminoácidos muy básica con una cadena lateral ácida de octanoilo en el tercer aminoácido de su extremo N-terminal (serina 3). Esta modificación inusual es requerida para la interacción en el GHS-receptor y su actividad. La secuencia de aminoácidos de la ghrelina de rata purificada determinada con un secuenciador de proteína es GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR.

Se ha demostrado que la ghrelina media las funciones fisiológicas pertinentes a un estado anabólico. Si bien estimula directamente la liberación de la hormona de crecimiento (GH) de la glándula hipofisaria, los experimentos en roedores también demostraron que la ghrelina induce la alimentación de un modo independiente de GH por la acción sobre las neuronas hipotalámicas. De modo interesante, el sitio primario de producción de ghrelina está en las glándulas oxínticas en el estómago, lo que sugiere que sirve como una unión hormonal entre estómago, glándula hipófisis e hipotálamo. La observación de que la administración de ghrelina en las ratas produjo el aumento de peso como una consecuencia de los cambios en el ingreso de energía y/o utilización de combustible soportan tal función. Además, la administración de ghrelina sistémica en los seres humanos causa sensaciones de hambre en los sujetos humanos e induce el exceso de alimentación. Sobre la base de estos hallazgos se considera que la ghrelina tiene un papel crítico en la regulación del apetito y peso corporal, actúa como una señal aguda así también como crónica de un estado subalimentado. El soporte adicional para esta hipótesis proviene de las observaciones de que los niveles de ghrelina así como el apetito se reducen en individuos después del bypass gástrico, que contribuye al menos en parte a la eficiencia del procedimiento para efectuar la pérdida de peso. Los datos clínicos de los pacientes con el síndrome Prader-Willi también sugieren que la hiperfagia y obesidad asociada con la enfermedad son una consecuencia de la hiperghrelinemia marcada. Además, se halló que la ghrelina induce la hiperglucemia e inhibición de la liberación de insulina, lo que indica un compromiso del metabolismo de glucosa. Además de estas funciones en el metabolismo de energía, la ghrelina también se ha implicado en numerosos procesos. Se halló que se expresa en numerosos tumores neuroendocrinos y estimula, además de la liberación de GH de la hipófisis, la liberación de ACTH, PRL, y cortisol. Se halló que las inyecciones únicas de ghrelina en los individuos sanos aumentan el gasto cardíaco y disminuyen la presión arterial. En consecuencia, la acción de la ghrelina parece estar involucrada en una variedad de tareas diferentes. Para la información de antecedentes se pueden tomar de M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsu, K. Kangawa, "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach", Nature 402:656-60, 1999; M. Tschöp, D.L. Smiley, M.L. Heiman, "Ghrelin induces adiposity in rodents", Nature 407:908-13, 2000; A.M. Wren et al., "Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans", Journal of Clinical Endocrinology Metabolism 86:5992-6, 2001; M. Nakazato et al., "A role for ghrelin in the central regulation of feeding", Nature 409: 194-8, 2001; N. Nagaya, et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001 May; 280(5):R1483-7; Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers; Volante M, et al., J Clin Endocrinol Metab. 2002 Mar; 87(3):1300-8. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors; Jeffery PL, et al., J Endocrinol. 2002 Mar; 172(3):R7-11 Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines; Egido EM, et al., Eur J Endocrinol. 2002 Feb; 146(2):241-4 Inhibitory effect of ghrelin on insulin y pancreatic somatostatin secretion; Broglio F, et al., J Clin Endocrinol Metab. 2001 Oct; 86(10):5083-6, Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans.

La solicitud de patente internacional WO 01/87335 describe un método para inhibir selectivamente la acción de ghrelina.

El problema subyacente a la presente invención es proporcionar un antagonista específico para la ghrelina. Un aspecto adicional del problema subyacente a la presente invención es proporcionar un antagonista específico para el receptor secretagogo de hormona de crecimiento 1a (GHSR 1a). Otro aspecto del problema subyacente de la presente invención es proporcionar un compuesto para el tratamiento de las enfermedades y trastornos que involucran ghrelina y el receptor de GHSR 1a, respectivamente. Este y otros problemas se resuelven con el tema de las reivindicaciones independientes.

Las realizaciones preferidas se pueden adoptar a partir de las reivindicaciones dependientes.

El problema subyacente de la presente invención se resuelve en un primer aspecto con un ácido nucleico de unión a ghrelina y comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de acuerdo con SEQ. ID. No. 7 a SEQ. ID. No.125

5 El problema subyacente la presente invención se resuelve en un segundo aspecto por un ácido nucleico que consiste en una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de acuerdo con SEQ. ID. No. 7 a SEQ. ID. No. 125

10 El problema subyacente de la presente invención se resuelve en un tercer aspecto por un antagonista de ghrelina, en el que el antagonista es un ácido nucleico, y por el cual el ácido nucleico se une a ghrelina y el ácido nucleico comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de acuerdo con las SEQ. ID. No.7 a SEQ. ID. No.125.

El problema subyacente la presente invención se resuelve en un cuarto aspecto con un antagonista de ghrelina, en el que el antagonista es un ácido nucleico que consiste en una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de acuerdo con las SEQ. ID. No. 7 a SEQ. ID. No. 125.

15 El problema subyacente de la presente invención se resuelve en un quinto aspecto con un antagonista del sistema receptor GHSR 1A, en el que el antagonista es un ácido nucleico, y por el cual el ácido nucleico se une al ligando del receptor y por el cual el ligando es ghrelina y el ácido nucleico comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de acuerdo con las SEQ. ID. No.7 a SEQ. ID. No.125.

20 El problema subyacente de la presente invención se resuelve en un sexto aspecto con un antagonista del sistema receptor GHSR 1A, en el que el antagonista es un ácido nucleico que consiste en una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ. ID. No. 7 a SEQ. ID. No. 125.

En una realización del sexto aspecto el ácido nucleico se une al ligando del receptor.

En una realización adicional del sexto aspecto el ligando es ghrelina.

En una realización del primer al sexto aspecto de la presente invención el ácido nucleico comprende al menos un nucleótido L.

25 En la realización preferida del primer al sexto aspecto de la presente invención el antagonista es un ácido nucleico L.

En una realización más preferida del primer al sexto aspecto de la presente invención el ácido nucleico es un ácido nucleico descrito en la presente memoria. Con preferencia el nucleico es un ácido nucleico de acuerdo con el tercer y cuarto aspecto de la presente invención.

En la realización preferida el ácido nucleico L es un ácido nucleico que se describió en la presente memoria.

30 En una realización adicional el ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende ADN, ARN y sus combinaciones.

En la realización preferida la Kd del ácido nucleico es menor que 1  $\mu\text{M}$ , preferiblemente menor que 0,25  $\mu\text{M}$ , con más preferencia menor que 0,1  $\mu\text{M}$  y con máxima preferencia menor que 0,01  $\mu\text{M}$ .

35 En una realización más preferida la Kd del ácido nucleico es mayor que 100 nM, preferiblemente mayor que 10 nM, más preferiblemente mayor que 1 nM y con máxima preferencia mayor que 0,05 nM.

En una realización preferida adicional el ácido nucleico es de una longitud seleccionada del grupo que comprende 15 a 150 nucleótidos, 20 a 100 nucleótidos, 20 a 80 nucleótidos, 20 a 60 nucleótidos, 20 a 50 nucleótidos y 30 a 50 nucleótidos.

En aún otra realización el ácido nucleico comprende un motivo de unión mínimo.

40 En otra realización preferida del tercer al sexto aspecto de la presente invención el ácido nucleico tiene al menos una estructura bipartita.

45 El problema subyacente de la presente invención se resuelve en un séptimo aspecto por el uso de un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o de un antagonista de acuerdo con la presente invención para la fabricación de un medicamento. Alternativamente, el uso mencionado anteriormente es para la fabricación de un producto cosmético.

En una realización adicional el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que comprende obesidad, la regulación del balance energético, apetito y peso corporal, trastornos alimenticios, diabetes, metabolismo de glucosa, tumor, presión arterial y/o enfermedades cardiovasculares. En una realización adicional el producto cosmético es para controlar el apetito y peso corporal, y/o para la obesidad.

En un octavo aspecto el problema subyacente de la presente invención se resuelve con una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o un antagonista de acuerdo con la presente invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 En un noveno aspecto el problema subyacente de la presente invención se resuelve con un complejo que comprende ghrelina y cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. En la realización preferida el complejo es un complejo cristalino.

En un décimo aspecto el problema subyacente de la presente invención se resuelve por el uso de cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención y/o de un antagonista de acuerdo con la presente invención para la detección de ghrelina.

10 En un undécimo aspecto el problema subyacente de la presente invención se resuelve con un kit para la detección de ghrelina, que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o un antagonista de acuerdo con la presente invención.

15 La ghrelina es un péptido básico que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ. ID. No.1, y se modifica con una cadena lateral de ácido graso. El pI calculado de la ghrelina es 11,09. Como se usa en la presente memoria el término ghrelina se refiere a cualquier ghrelina que incluye, pero sin limitación, ghrelina de mamífero. Con preferencia, la ghrelina de mamífero se selecciona del grupo que comprende ghrelina de ratones, rata, conejo, hámster y humana. Con máxima preferencia la ghrelina es ghrelina humana.

20 La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que es posible generar ácidos nucleicos de unión inespecífica y con una alta afinidad para la ghrelina. Este hallazgo es en cierta medida sorprendente ya que Eaton et al. (Eaton, B.E.; Gold, L.; Hicke, B.J.; Janjic, N.; Jucker, F.M.; Sebosta, D.P.; Tarasow, T.M.; Willis, M.C.; Zichi, D.A.; Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol 5, No. 6; pp 1087 - 1096, 1997) observó que la generación de aptámeros, es decir, la unión de ácidos nucleicos a una molécula blanco, dirigida a una proteína básica es en general muy difícil ya que esta clase de blanco produce una relación de señal a ruido alta pero no específica. Esta relación de señal a ruido alta resulta de la afinidad no específica alta por los ácidos nucleicos para los blancos básicos.

25 Las características del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención como se describe en la presente memoria se pueden realizar en cualquier aspecto de la presente invención donde se usa el ácido nucleico, solo o en cualquier combinación.

30 Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención también comprenderán los ácidos nucleicos que son esencialmente homólogos para las secuencias particulares descritas en la presente memoria. El término sustancialmente homólogo se entenderá que la homología es tal como al menos 75%, preferiblemente 85%, más preferiblemente 90% y con máxima preferencia más que 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

35 El término ácido nucleico de la invención o ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también comprenderá los ácidos nucleicos que comprenden parte de las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria, preferiblemente en la medida que dichas partes están involucradas en la unión a ghrelina. Tal ácido nucleico puede derivar de los descritos en la presente memoria, por ejemplo, por truncamiento. El truncamiento se puede relacionar con alguno o ambos extremos de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria. Asimismo, el truncamiento se puede relacionar con la secuencia de nucleótidos interna, es decir, se puede relacionar con los nucleótido(s) entre el nucleótido 5' y 3' terminal, respectivamente. Además, el truncamiento comprenderá la supresión de como mínimo un nucleótido solo de la secuencia de ácidos nucleicos descrita en la presente memoria. El truncamiento también se puede relacionar con más de una extensión del ácido nucleico de la invención, por la cual la extensión puede ser como mínimo de un nucleótido de largo. Los ejemplos para el truncamiento de los ácidos nucleicos de la invención se describen en la parte del ejemplo de esta descripción.

45 Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden ser ácidos nucleicos D o ácidos nucleicos L. Con preferencia, los ácidos nucleicos de la invención son ácidos nucleicos L. Además es posible que una o varias partes del ácido nucleico se presenten como ácidos nucleicos D o al menos una o varias partes de los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos L. El término "parte" de los ácidos nucleicos significará como mínimo un nucleótido. Tales ácidos nucleicos se denominan generalmente en la presente memoria como ácidos nucleicos D y L, respectivamente.

50 También está dentro de la presente invención que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención sean parte de un ácido nucleico más largo por el cual este ácido nucleico más largo comprende varias partes por las que al menos una parte es un ácido nucleico, o una parte de esto, de acuerdo con la presente invención. La otra parte de estos ácidos nucleicos más largos pueden ser cualquier ácido nucleico D o ácido nucleico L. Se puede usar cualquier combinación en relación con la presente invención. Estas otras partes del ácido nucleico más largo pueden exhibir una función que es diferente de la unión. Una función posible es permitir la interacción con otras moléculas tales como, por ejemplo, para inmovilización, reticulado, detección o amplificación.

55 Los ácidos nucleicos L como se usa en la presente memoria son ácidos nucleicos que consisten en nucleótidos L, preferiblemente que consisten completamente en los nucleótidos L.

Los ácidos nucleicos D como se usan en la presente memoria son ácidos nucleicos que consiste en nucleótidos D, preferiblemente que consisten completamente en los nucleótidos D.

Independientemente de si los ácidos nucleicos de la invención consisten en nucleótidos D, nucleótidos L o una combinación de ambos con la combinación que es por ejemplo, una combinación aleatoria o una secuencia de extensiones definidas que consiste en al menos un nucleótido L y al menos un ácido nucleico D, el ácido nucleico puede consistir en desoxirribonucleótidos(s), ribonucleótido(s) o sus combinaciones.

El diseño de los ácidos nucleicos de la invención como ácido nucleico L es ventajoso por varias razones. Los ácidos nucleicos L son enantiómeros de ácidos nucleicos naturales. Los ácidos nucleicos D, sin embargo, no son muy estables en soluciones acuosas y en particular en sistemas biológicos o muestras biológicas debido a la presencia generalizada de las nucleasas. Las nucleasas naturales, en particular nucleasas de las células animales no son capaces de degradar ácidos nucleicos L. A causa de que la vida media biológica del ácido nucleico L está significativamente aumentada en tal sistema, que incluye el cuerpo animal y humano. Debido a la carencia de degradabilidad de los ácidos nucleicos L, no se generan productos de degradación no nucleasa y en consecuencia no se observan efectos secundarios surgidos de estos. Este aspecto delimita el ácido nucleico L objetivamente de los otros compuestos que se usan en la terapia de enfermedades y/o trastornos que involucran la presencia de ghrelina.

También está dentro de la presente invención que los ácidos nucleicos de la invención, independientemente de si están presentes como ácidos nucleicos D, ácidos nucleicos L o ácidos nucleicos D,L o si ellos son ADN o ARN, pueden estar presentes ácidos nucleicos de cadena simple o cadena doble. Normalmente, los ácidos nucleicos de la invención son ácidos nucleicos de cadena simple que exhiben estructuras secundarias definidas debido a la secuencia primaria y en consecuencia también puede formar estructuras terciarias. Los ácidos nucleicos de la invención, sin embargo, también pueden ser de cadena doble en el sentido de que dos cadenas que son complementarias entre sí se hibridan entre sí. Esto confiere estabilidad al ácido nucleico que será ventajosa si el ácido nucleico está presente en la forma D natural más que en la forma L.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden modificar. Tales modificaciones pueden estar relacionadas con el nucleótido único del ácido nucleico y son bien conocidas en la técnica. Los ejemplos para tal modificación se describen, entre otros, en Kusser, W. (2000) J Biotechnol, 74: 27-38; Aurup, H. et al. (1994) Ácido nucleicos Res, 22, 20-4; Cummins, L.L. et al, (1995) NucleicAcids Res, 23, 2019-24; Eaton, B.E. et al. (1995) Chem Biol, 2, 633-8; Green, L.S. et al., (1995) Chem Biol, 2, 683-95; Kawasaki, A.M. et al., (1993) J Med Chem, 36, 831-41; Lesnik, E.A. et al., (1993) Biochemistry, 32, 7832-8; Miller, L.E. et al., (1993) J Physiol, 469,213-43.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden ser un ácido nucleico multipartito. Un ácido nucleico multipartito como se usa en la presente memoria, es un ácido nucleico que consiste en al menos dos cadenas de ácido nucleico. Estas al menos dos cadenas de ácido nucleico forman una unidad funcional donde la unidad es un ligando a una molécula blanco. Las al menos dos cadenas de ácido nucleico se pueden derivar de cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención por la escisión del ácido nucleico para generar dos cadenas o por la síntesis de un ácido nucleico correspondiente a una primera parte de la invención, es decir, ácido nucleico total y otro ácido nucleico correspondiente a la segunda parte del ácido nucleico total. Se reconoce que se puede aplicar tanto la escisión como la síntesis para generar un ácido nucleico multipartito donde hay más de las dos cadenas ejemplificadas anteriormente. En otras palabras, las al menos dos cadenas de ácido nucleico son normalmente diferentes a las dos cadenas que son complementarias e hibridantes entre sí aunque puede existir cierto grado de complementariedad entre las diversas partes de ácido nucleico.

Una posibilidad de determinar la constante de unión es el uso del llamado dispositivo biacore, que también es conocido por los expertos en la técnica. La afinidad como se usa en la presente memoria también se midió por el uso de "ensayos de microesferas" descritos en los ejemplos. Una medida apropiada a fin de expresar la intensidad de la unión entre el ácido nucleico de acuerdo con el blanco que está en el presente caso de ghrelina, es el llamado valor de Kd que tal como el método de su determinación son conocidos por los expertos en la técnica.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención se caracterizan por un cierto valor de Kd. Con preferencia, el valor de Kd mostrado por los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención es menor de 1  $\mu$ M. Se dice que un valor de Kd de aproximadamente 1  $\mu$ M es característico para una unión no específica de un ácido nucleico a un blanco. Como será reconocido por los expertos en la técnica, el valor de Kd de un grupo de compuestos tales como los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención están dentro de un cierto intervalo. El Kd mencionado anteriormente de aproximadamente 1  $\mu$ M es un límite superior preferido para el valor de Kd. El límite inferior preferido para el Kd de los ácidos nucleicos de unión al blanco puede ser aproximadamente 10 picomolar o más alto. Está dentro de la presente invención que los valores de Kd de los ácidos nucleicos de unión a ghrelina individuales estén preferiblemente dentro de este intervalo. Los intervalos preferidos se pueden definir por la elección de cualquier número dentro de este intervalo y cualquier segundo número dentro de este intervalo. Los valores superiores preferidos son 0,25  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M y 0,01  $\mu$ M, los valores inferiores preferidos son 100 nM, 10 nM, 1 nm y 0,05 nM.

Las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención pueden tener cualquier longitud con la condición de que sean aún capaces de unirse a la molécula blanco. Será reconocido en la técnica que existen longitudes preferidas de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Normalmente, la longitud es entre 15 y 120 nucleótidos. Será reconocido por los expertos en la técnica que cualquier número entero entre 15 y 120 es una longitud posible para los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Los intervalos más preferidos para la longitud de los ácido nucleicos de acuerdo con la presente invención son longitudes de aproximadamente 20 a 100 nucleótidos, aproximadamente 20 a 80 nucleótidos, aproximadamente 20 a 60 nucleótidos, aproximadamente 20 a 50 nucleótidos y aproximadamente 30 a 50 nucleótidos.

El método de la invención descrito en la presente memoria para la generación y/o identificación de ácidos nucleicos de unión a ghrelina y en particular que tiene los rasgos y características adicionales que se describen en la presente memoria, se basa en el llamado proceso SELEX que está sujeto a la patente US 5.475.096. Básicamente, el proceso SELEX comprende las siguientes etapas:

- a) generar una población heterogénea de ácidos nucleicos;
- b) poner en contacto la población de la etapa a) con la molécula blanco;
- c) separar los ácidos nucleico(s) que no interactúan con la molécula blanco;
- d) opcionalmente separar los ácidos nucleico(s) que interactúan con la molécula blanco; y
- e) opcionalmente secuenciar los ácidos nucleico(s) que interactúan con la molécula blanco.

La operación exacta del proceso SELEX es conocida por los expertos en la técnica.

Con preferencia, el proceso SELEX comprende una amplificación de la unión del ácido nucleico individual a la molécula blanco usando una reacción en cadena de polimerasa. Por la realización de esta amplificación se puede obtener una tasa más alta de incorporación de nucleótido inespecíficos que produce un cambio de la secuencia primaria del ácido nucleico de unión. Debido a que estos cambios pueden generar nuevas secuencias que muestran características de unión diferentes de una de las secuencias iniciales tales como, entre otras, aumento de afinidad de la especificidad.

También esta dentro de la presente invención que las secuencias de la invención se originen en forma completa o parcial de la parte aleatorizada de los miembros de una biblioteca de ácidos nucleicos que sirve como material de partida para el proceso de selección. Sin embargo, está dentro de la presente invención que las secuencias de la invención se originen en forma completa o parcial de la parte no aleatorizada de los miembros de la biblioteca de ácidos nucleicos que sirve como material de partida para el proceso de selección. Tal parte no aleatorizada es, por ejemplo, la parte que se usa como sitio de unión para el cebador de la amplificación.

Se describe que el método para la generación de ácidos nucleicos L de unión a ghrelina se basa en el método de Fürste et al. que está sujeto a la solicitud de patente internacional WO 98/08856. Básicamente, este método comprende las siguientes etapas:

- a) generar una población heterogénea de ácidos nucleicos D;
- b) poner en contacto la población de la etapa a) con un antípoda óptico de la molécula blanco;
- c) separar el ácido nucleico D que no interactúa con el antípoda óptico de la molécula blanco;
- d) secuenciación del ácido nucleico D que interactúa con el antípoda óptico de la molécula blanco;

y

e) sintetizar la(s) secuencia(s) que sintetizan el ácido nucleico L que es/son idénticas con la(s) secuencia(s) del ácido nucleico D obtenidas en la etapa d);

Se describe que el antípoda óptico es ghrelina. El antípoda óptico está presente como péptido D, lo que significa que todos los aminoácidos que forman parte del péptido son aminoácidos D. La molécula blanco, es decir, ghrelina está presente como el enantiómero L. El enantiómero L consiste en aminoácidos L y es la forma natural.

El protocolo de cómo realizar el proceso es conocido por los expertos en la técnica.

Se describe que cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención se pueden usar en el método para la generación y/o identificación de los ácidos nucleicos de unión a ghrelina y/o método para la generación ácidos nucleicos L de unión a ghrelina, respectivamente, de acuerdo con la presente invención.

Los ácidos nucleicos de la invención, que también se denominan en la presente memoria como los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención y/o los antagonistas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para la generación o fabricación de un medicamento. Tal medicamento contiene al menos uno de los ácidos

nucleicos de la invención, opcionalmente junto con compuestos farmacéuticamente activos adicionales, donde el ácido nucleico de la invención preferiblemente actúa como compuesto farmacéuticamente activo por sí mismo. Tales medicamentos comprenden en realizaciones preferidas al menos un portador farmacéuticamente aceptable. Tal portador puede ser por ejemplo, agua, buffer, almidón, azúcar, gelatina o cualquier otra sustancia portadora aceptable. Tales portadores son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. La enfermedad y/o trastornos y/o condiciones de enfermedad para cuyo tratamiento y/o prevención se pueden usar incluyen, pero sin limitación obesidad, la regulación del balance energético, apetito y peso corporal, trastornos alimenticios, diabetes, metabolismo de glucosa, tumor, presión arterial y enfermedades cardiovasculares. Como será reconocido por los expertos en la técnica los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar objetivamente en cualquier enfermedad donde se puede administrar un antagonista para ghrelina a un paciente que necesita tal antagonista y tal antagonista es adecuado para eliminar la causa de la enfermedad o el trastorno o al menos reducir los efectos de la enfermedad o el trastorno. Tal efecto incluye, pero sin limitaciones obesidad, la regulación del balance energético, apetito y peso corporal, trastornos alimenticios, diabetes, metabolismo de glucosa, tumor, presión arterial y enfermedades cardiovasculares. Para el fin de la presente invención la regulación del balance energético se considera como una enfermedad. Más particularmente, el uso es para el tratamiento de cualquier enfermedad donde la regulación del balance energético está influida por la ghrelina, en forma directa o indirecta, y donde se desea la reducción de la biodisponibilidad de la ghrelina. Lo mismo se aplica al metabolismo de azúcar, presión arterial y apetito y peso corporal. Otra enfermedad que se puede tratar usando los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, posiblemente por aplicación sistémica o local son los que se pueden seleccionar del grupo que comprende tumores hipofisarios, acromegalia, síndrome de Cushing central, síndrome de Cushing renal, síndrome de Cushing paraneoplásico, síndrome de Cushing ectópico, tumor adrenal, estrés, hipercortisolismo, insuficiencia cardíaca, infarto cardíaco, accidente cerebrovascular, insuficiencia adrenocortical, hipotonía, estenosis aórtica, hipertensión pulmonar, pericarditis constrictiva, enfermedades infecciosas, hipotonía tóxica infecciosa, hipovolemia, e hiponatremia.

Se entiende que el ácido nucleico así como los antagonistas de acuerdo con la presente invención se pueden usar no solo como un medicamento o para la fabricación de un medicamento, sino también para fines cosméticos, en particular con respecto al compromiso de la ghrelina en la obesidad. Para el mismo fin el ácido nucleico así como los antagonistas de acuerdo con la presente invención se pueden usar como aditivo alimentario, un medio para control de peso y/o un medio para el control de apetito. Una composición que comprende el ácido nucleico así como los antagonistas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para cualquiera de los fines mencionados anteriormente.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar adicionalmente como material de partida para el diseño de fármacos. Básicamente, existen dos abordajes posibles. Un abordaje es la selección de bibliotecas de compuestos mientras tales bibliotecas de compuestos sean con preferencia bibliotecas de compuestos de peso molecular bajo. Tales bibliotecas son conocidas por los expertos en la técnica. Alternativamente, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se puede usar para el diseño racional de fármacos.

El diseño racional de fármacos puede comenzar a partir de cualquier ácido nucleico de acuerdo con la presente invención e involucra una estructura, preferiblemente una estructura tridimensional, que es similar a la estructura de los ácidos nucleicos de la invención o idéntica a las partes que median la unión de la estructura de los ácidos nucleicos de la invención. En cualquier caso tal estructura aún muestra características de unión iguales o similares a los ácidos nucleicos de la invención. En cualquier etapa adicional o como etapa alternativa del diseño racional de fármacos, preferiblemente la estructura tridimensional de las partes de los ácidos nucleicos de unión al neurotransmisor imitan los grupos químicos que son diferentes de los nucleótidos y ácidos nucleicos. Por este mimetismo se puede diseñar un compuesto diferente de los ácidos nucleicos. Tal compuesto es preferiblemente una molécula o péptido pequeño.

En el caso de la selección de bibliotecas de compuestos, tal como por medio de un ensayo competitivo que son conocidos por los expertos en la técnica, se pueden hallar análogos de ghrelina, agonistas de ghrelina o antagonistas de ghrelina apropiados. Tales ensayos competitivos se pueden montar de la siguiente manera. Los ácidos nucleicos de la invención, preferiblemente un spiegelmer que es un ácido nucleico L de unión al blanco, se acopla a una fase sólida. A fin de identificar análogos de ghrelina, se puede añadir al ensayo ghrelina marcada. Un análogo potencial puede competir con las moléculas de ghrelina de unión al spiegelmer que se puede acompañar con una disminución de la señal obtenida por la marca respectiva. La selección de agonistas o antagonistas puede involucrar el uso de un ensayo de cultivo celular conocido por los expertos en la técnica.

El kit de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos uno o varios ácidos nucleicos de la invención. En forma adicional, el kit puede comprender al menos uno o varios controles positivos o negativos. Un control positivo puede ser, por ejemplo, ghrelina, en particular uno contra el cual se seleccionan los ácidos nucleicos de la invención o al que se unen, preferiblemente, en forma líquida. Un control negativo puede ser, por ejemplo, un péptido que se define en términos de propiedades biofísicas similares a ghrelina, pero que no es reconocido por los ácidos nucleicos de la invención. Además, dicho kit puede comprender uno o varios buffers. Los diversos ingredientes pueden estar contenidos en el kit en forma seca o liofilizada o resolverse en un líquido. El kit puede comprender uno o varios envases que a su vez contienen uno o varios ingredientes del kit.

La presente invención se ilustra adicionalmente con las figuras, ejemplos y el listado de secuencias del que pueden tomar rasgos, realizaciones y ventajas adicionales, en la que

La Fig. 1 muestra la tabla 1A que indica la relación de señal a ruido de la selección de ARN para los aptámeros de unión a D-ghrelina;

5 La Fig. 2 muestra la tabla 1B que indica la relación de señal a ruido de la selección de 2'F-ARN para los aptámeros de unión a D-ghrelina;

La Fig. 3 muestra la tabla 2 que indica la cantidad de ARN/2F-ARN usado en el proceso de selección;

La Fig. 4A muestra el curso de la concentración del péptido de ghrelina usado en la selección de ARN;

La Fig. 4B muestra el curso de la concentración del péptido de ghrelina usado en la selección de 2'F-ARN;

10 La Fig. 5 muestra el curso del ARN eluido en por ciento de ARN usado total durante el curso de la concentración del péptido;

La Fig. 6 muestra el curso de ARN eluido en por ciento de total de 2'F-ARN usado durante el curso de la concentración del péptido;

15 La Fig. 7A muestra la tabla 3 que indica rondas dobles y ensayos de unión realizados desde la ronda 12 a 14 para la selección de ARN; datos en por ciento de unión a ghrelina, \* marca secuencias;

La Fig.7B muestra un aumento si la mezcla de 2'F-ARN se une a D-ghrelina controlado durante las rondas dobles;

La Fig. 8A muestra la tabla 4 que indica rondas dobles y ensayos de unión realizados desde la ronda 12 a 14 para la selección de 2'F-ARN, datos en por ciento de unión a ghrelina, \* marca secuencias;

20 La Fig.8B muestra un aumento de la mezcla de 2'F-ARN de unión a D-ghrelina controlada durante las rondas dobles;

La Fig. 9 muestra el curso de una selección in vitro automatizada contra D-ghrelina de rata;

La Fig. 10 muestra una superficie de trabajo del robot para la selección de ARN in vitro automatizada;

La Fig. 11 muestra un esquema que demuestra el procedimiento de trabajo ejecutado por el robot durante la selección de ARN automatizada;

25 La Fig. 12 muestra la tabla 5 que indica la aparición de secuencias idénticas durante el proceso de selección; se dan referencia interna y SEQ. ID. No.;

La Fig. 13 muestra un alineamiento de secuencias de los ligandos de ARN, que se aíslan por selección in vitro automatizada contra ghrelina como se describe en el ejemplo 2, donde las líneas indican nucleótidos faltantes;

30 La Fig. 14 A muestra una curva de unión del clon de ARN de unión a D-ghrelina A8, que se aisló por selección in vitro automatizada, el comportamiento de unión se analizó por medio de ensayos de microesferas;

La Fig. 14 B muestra una curva de unión del clon B11 de ARN de unión a D-ghrelina, que se aisló por selección in vitro automatizada, el comportamiento de unión se analizó por medio de ensayos de microesferas;

La Fig. 14 C muestra una curva de unión del clon C11 de ARN de unión a D-ghrelina, que se aisló por selección in vitro automatizada, el comportamiento de unión se analizó por medio de ensayos de microesferas;

35 La Fig. 14 D muestra una curva de unión del clon C12 de ARN de unión a D-ghrelina, que se aisló por selección in vitro automatizada, el comportamiento de unión se analizó por medio de ensayos de microesferas;

La Fig. 14 E muestra una curva de unión del clon F12 de ARN de unión a D-ghrelina, que se aisló por selección in vitro automatizada, el comportamiento de unión se analizó por medio de ensayos de microesferas;

40 La Fig. 15 muestra la tabla 6 que indica el comportamiento de unión de los clones B11, F12 y E3 a D-ghrelina, que se aislaron por la selección in vitro automatizada;

La Fig. 16 A muestra una curva de unión, actividad y Kd del clon B11 de ARN de unión a D-ghrelina, que se aisló por selección in vitro automatizada, los datos correspondientes se muestran en la Fig. 8;

La Fig. 16 B muestra una curva de unión, actividad y Kd del clon F12 de ARN de unión a D-ghrelina, que se aisló por selección in vitro automatizada, los datos correspondientes se muestran en la Fig. 8;

La Fig. 16 C muestra una curva de unión, actividad y Kd del clon E3 de ARN de unión a D-ghrelina, que se aisló por selección in vitro automatizada, los datos correspondientes se muestran en la Fig. 8;

La Fig. 17 muestra la tabla 7 que indica los valores de Kd de los clones de ARN de unión a D-ghrelina A3, A8, A12, B7, B11, B12, C12, E3, E12, F5, F12, G2 y G5 determinados por medio del instrumento de Biacore 2000;

- 5 La Fig. 18 muestra un experimento de competición con el clon B11, que se realizó por medio del instrumento de Biacore 2000;

La Fig. 19 muestra estructuras secundarias calculadas de ARN del clon B11 de spiegelmer de unión a D-ghrelina y del clon B11 truncado trc, la estructura secundaria se calculó con el programa "mafold" (Hofacker et al., 1994, Monatsh. Chem 125:167-188);

- 10 La Fig. 20 muestra la tabla 8 que indica la Kd de los clones de ARN B11 en la forma L y el clon truncado B11 en la forma D y L, la Kd se midió con instrumento de Biacore 2000;

La Fig. 21 muestra ensayos de unión asistidos por Biacore 2000 de los clones de ARN B11 en la forma D y el clon truncado B11 en la forma D y L;

- 15 La Fig. 22 muestra un alineamiento de secuencias de los ligandos de ARN, que se aislaron por selección in vitro manual contra ghrelina como se describe en el ejemplo 1 (ronda 13), en el cual las líneas indican nucleótidos faltantes y las partes del cebador de las secuencias están impresas en negrita y las T se entienden como U;

La Fig. 23 muestra un alineamiento de secuencias de ligandos de ARN, que se aislaron por selección in vitro manual contra ghrelina como se describe en el ejemplo 1 (ronda 14), en el cual las líneas indican nucleótidos faltantes y las partes del cebador de las secuencias están impresas en negrita y las T se entienden como U;

- 20 La Fig. 24 muestra un alineamiento de secuencias de ligandos de 2'-F-ARN, que se aislaron por selección in vitro manual contra ghrelina como se describe en el ejemplo 1 (ronda 14), en el cual las líneas indican nucleótidos faltantes y las partes del cebador de las secuencias están impresas en negrita y las T se entienden como U;

- 25 La Fig. 25 muestra un alineamiento de secuencias de los ligandos de 2'-F-ARN, que se aislaron por selección in vitro manual contra ghrelina como se describe en el ejemplo 1 (ronda 15), en el cual las líneas indican nucleótidos faltantes y las partes del cebador de las secuencias están impresas en negrita y las T se entienden como U;

- 30 La Fig. 26 muestra el curso de tiempo de las señales de fluorescencia obtenidas después de la estimulación de las células CHO que expresan en forma estable el receptor de ghrelina humano (GHSR1) con 33 nM de ghrelina; las células se cargaron con el colorante indicador de Ca<sup>++</sup> Fluo4 y señales de fluorescencia se registraron en un lector de placa de fluorescencia; al final del registro, se añadió Triton-X100 para revisar la carga de colorante apropiada de la células;

- 35 La Fig. 27 muestra una curva de dosis respuesta para liberación de Ca<sup>++</sup> inducida por ghrelina en células CHO que expresan en forma estable el receptor de ghrelina humano; que representa la diferencia entre las señales máxima y la basal contra las concentraciones de ghrelina usadas para la estimulación, se obtuvo una curva de dosis respuesta para ghrelina, que indica una mitad de concentración efectiva (EC50) de aproximadamente 5 nM – esta concentración se usó para los experimentos adicionales de la inhibición de la liberación de Ca<sup>++</sup> por Spiegelmers;

- 40 La Fig. 28 muestra una curva de dosis respuesta para la inhibición de liberación de Ca<sup>++</sup> inducida por ghrelina por Spiegelmer B11 a temperatura ambiente; las células se estimularon con 5 nM de ghrelina o ghrelina preincubada a temperatura ambiente con varias cantidades de Spiegelmer B11; los resultados muestran el porcentaje de señal de fluorescencia normalizada para la señal obtenida sin Spiegelmer; se halló que el Spiegelmer B11 inhibe la liberación de Ca<sup>++</sup> inducida por ghrelina con una IC50 de aproximadamente 5 nM;

- 45 La Fig. 29 muestra una curva de dosis respuesta para la inhibición de la liberación de Ca<sup>++</sup> inducida por ghrelina por Spiegelmer B11 a temperatura ambiente; las células se estimularon con 5 nM ghrelina o ghrelina preincubada a 37°C con varias cantidades de Spiegelmer B11; los resultados muestran el porcentaje de señal de fluorescencia normalizada para la señal obtenida sin Spiegelmer; Se halló que los Spiegelmers B11 inhiben la liberación de Ca<sup>++</sup> inducida por ghrelina a 37°C con una IC50 de aproximadamente 6 nM;

- 50 La Fig. 30 muestra una comparación de la inhibición de la liberación de Ca<sup>++</sup> inducida por ghrelina por los Spiegelmers B11 y C12; las células se estimularon con 5 nM de ghrelina o ghrelina preincubada a temperatura ambiente con varias cantidades de Spiegelmer B11 o Spiegelmer C12; los resultados muestran el porcentaje de señal de fluorescencia normalizada para la señal obtenida sin Spiegelmer; en este experimento se halló que el Spiegelmer B11 inhibe la liberación de Ca<sup>++</sup> inducida por ghrelina con una IC50 de aproximadamente 8 nM, mientras que para Spiegelmer C12 la IC50 fue aproximadamente 4 nM;

La Fig. 31 muestra las secuencias de nucleótidos de los clones resultantes de la reelección automatizada,

5'-X-,5' secuencia del cebador GGAGCUCAGACUUAGCA,

- 3'-Y-,3' secuencia del cebador AUCGAGUGUCGGUCCAC, en la que las T se entienden como U, se considera que las secuencias subrayadas forman una estructura helicoidal intramolecular, las formas nucleares de los clones comienzan y terminan con las secuencias subrayadas, el clon SOT-108-H3 apareció 5 veces, SOT-108-A6, SOT-108-B7, SOT-108-C2, SOT-108-C3 y SOT-108-D4 aparecieron dos veces, los otros clones solo se obtuvieron una vez;
- 5 Las Fig. 32 A-C muestran ensayos de unión asistidos por Biacore 2000 de aptámeros a partir de la mezcla de reselección para bio-D-Ghrelin a 37°C;
- La Fig. 33 muestra las secuencias de reselección de Spiegelmers analizados en los ensayos de células; en los que las T se entienden como U, se indican la secuencia, el nombre y el tamaño de los Spiegelmers, así como el nombre del clon de reselección del que deriva;
- 10 La Fig. 34 muestra la actividad inhibitoria de Spiegelmers sobre la liberación de calcio inducida por ghrelin en ensayos celulares; los resultados se combinan de tres mediciones independientes, los controles NOX-SOT-C (B11) y NOX-SOT-D (C12) se dan para cada uno de ellos (todos los Spiegelmers se analizaron por duplicado en concentraciones de 3 nM y 10 nM);
- 15 La Fig. 35 muestra la curva de dosis respuesta de los Spiegelmers NOX-SOT-C (B11), sot\_d\_1r\_054, sot\_d\_1r\_056, y sot\_d\_1r\_064; la inhibición de la liberación de calcio inducida por ghrelin por cada Spiegelmer se mide por duplicado;
- Las Fig. 36 A - 38 B muestran la ingesta de alimentos de ratones después de la administración de solución salina, un control no activo de Spiegelmer, o el Spiegelmer B11 PEGilado por inyección i.v.;
- 20 Las Fig. 39-40 muestran la ingesta de alimentos de ratones después de la administración de solución salina, un control no activo de Spiegelmer, o el Spiegelmer B11 PEGilado por inyección i.v.; se ha entrenado a los ratones para tener acceso a la comida solo dos veces por día durante la fase oscura durante el período de 1 hora; el experimento con un total de 24 animales se dividió en dos conjuntos de 12 animales, La Fig. 39 muestra la ingesta de alimentos de 12 animales en el primer experimento y La Fig. 40 muestra el segundo experimento;
- 25 La Fig. 41 sintetiza los datos mostrados en las Fig. 39 - 40, se muestra la ingesta total de alimentos de los 24 ratones;
- La Fig. 42 muestra la ingesta de 24 horas de alimentos de las ratas después de la administración icv de solución salina, un control no activo de Spiegelmer, o el Spiegelmer B11 PEGilado;
- 30 La Fig. 43 muestra la inhibición de liberación de la hormona de crecimiento después de la administración exógena de ghrelin por inyección i.v. única de 150 nmol/rata de Spiegelmer anti-Ghrelin;
- La Fig. 44 muestra los efectos de la administración i.p. única de ghrelin (16,7 nmol/kg, 33,4 nmol/kg, 83,5 nmol/kg, respectivamente) sobre la ingesta de alimentos en ratas; y
- 35 La Fig. 45 muestra el efecto de diferentes dosis de spiegelmer anti-ghrelin sobre la liberación de GH estimulada con ghrelin en las ratas; la liberación de GH fue inducida con una sola dosis intravenosa de 3 nmoles de ghrelin (A), y la liberación de GH inducida con ghrelin se suprimió por la administración intravenosa previa de 15 nmoles (C) y 30 nmoles (D) de spiegelmer anti-ghrelin, pero no con 3 nmoles de spiegelmer anti-ghrelin (B).
- 40 La siguiente tabla lista las uniones de la SEQ ID Nos a los diversos clones e identificadores, respectivamente, descritos en la presente memoria. Se entiende que los clones B11 a G5 existen en dos formas diferentes. La forma mencionada en la presente memoria como 'completa' comprende la extensión aleatorizada de la mezcla usada, o parte de esta y la secuencia del cebador DE.40F y la secuencia del cebador DE.40R, mientras que la forma denominada en la presente memoria como 'centro' es el motivo de unión mínimo que fue generado a partir de la respectiva forma completa. Si no se indica lo contrario las cadenas representadas son las cadenas (+) y el ácido nucleico usado 2'OH ARN.

Tabla:

Clon/Identificador	Seq. ID No
Ghrelin de rata	1
mezcla de ARN	2
Rev. Compl.	3
DE.40T7	4
DE.40R	5
mezcla de ADN	6
B11 (completo)	7
B11 (núcleo)	8
G2 (completo)	9
G2 (núcleo)	10
E12 (completo)	11
E12 (núcleo)	12
B7 (completo)	13
B7 (núcleo)	14
A8 (completo)	15
A8 (núcleo)	16

Tabla:

Clon/Identificador	Seq. ID No
B12 (completo)	17
B12 (núcleo)	18
E3 (completo)	19
E3 (núcleo)	20
C12 (completo)	21
C12 (núcleo)	22
C11 (completo)	23
C11 (núcleo)	24
A3 (completo)	25
A3 (núcleo)	26
F5 (completo)	27
F5 (núcleo)	28
A12 (completo)	29
A12 (núcleo)	30
F12 (completo)	31
F12 (núcleo)	32

G5 (completo)	33
G5 (núcleo)	34
DE.40F-cebador (secuencia de consenso de la mezcla)	35
DE.40R- cebador (secuencia de consenso de la mezcla)	36
B11trc	37
ARN ronda 13 Grupo 1 1.1 clon principal 'SOT-R04-DR13-E5	38

'SOT-R04-DR14-C7	
variaciones de clon 3.1 1.2 'SOT-R04-DR 14-E11	48
1.3 'SOT-R04-DR14-H11	49
1.4 'SOT-R04-DR14-E8	50
2'-F-ARN ronda 14 Grupo1 1.1 (clon principal)	51

grupo2	30
2.1 clon principal 'SOT-R04-DR13- A2	
variaciones de 2.1	40
'SOT-R04-DR13- C4	
grupo3	41
3.1 clon principal 'SOT-R04-DR13- C1	
grupo4	42
4.1 clon principal 'SOT-R04-DR13- G2	
ARN ronda 14	43
Grupo1 1.1 (clon principal) 'SOT-R04-DR14- F7	
variaciones del clon	44
1.1	
1.2 'SOT-R04-DR 14- C11	
1.3 'SOT-R04-DR 14-A8	45
1.4 'SOT-R04-DR 14-C12	46
grupo3	47
3.1 (clon principal)	

1.1 (clon principal) 'SOT-F03-DR14- G6	
mutaciones del clon 1.1	52
1.2 'SOT-F03-DR14- F2	
1.3 'SOT-F03-DR14- F4.	53
1.4 'SOT-F03-DR14- D5	54
1.6 'SOT-F03-DR14- G3	55
1.7 'SOT-F03-DR14- B5	56
1.8 'SOT-F03-DR14- C2	57
1.9 'SOT-F03-DR 14- F3	58
1.10 'SOT-F03-DR14- B6	59
1.11 'SOT-F03-DR14- H1	60

1.12 SOT-F03-DR14- F6	61
1.13 SOT-F03-DR14- B1	62
1.14 SOT-F03-DR14- C1	63
1.15 SOT-F03-DR14- H5	64
grupo2 2.1 (clon principal) SOT-F03-DR14- G5	65
variaciones de clon 2.1 2.2 SOT-F03-DR14- D3	66
2.3 SOT-F03-DR14-H2	67
2.4 SOT-F03-DR14- D1	68
2.5 SOT-F03-DR14- A2	69
2.6 SOT-F03-DR14- G2	70
grupo3 3.1 clon principal SOT-F03-DR14-	71

SOT-F03-DR 15- G7	
1.3 SOT-F03-DR15- F10	74
1.4 SOT-F03-DR15- D9	75
1.5 SOT-F03-DR15- F12	76
SOT-F03-DR15- G12	77
1.6 SOT-F03-DR15- H7	78
1.7 SOT-F03-DR15- A11	79
1.8 SOT-F03-DR15 A8	80
1.9 SOT-F03-DR15- F8	81
1.10 SOT-F03-DR15- C9	82
1.11 SOT-F03-DR15- C12	83
1.12 SOT-F03-DR15- F7	84

H6	
2'-F-ARN ronda 15 grupo1 1.1 (clon principal) SOT-F03-DR15-G10	72
1.2	73

1.13 SOT-F03-DR15- A12	85
SOT-F03-DR15- C7	86

**Ejemplo 1: Selección in vitro manual**

**Molécula blanco**

5 D-ghrelina de rata biotinilada (secuencia de aminoácidos, H-Gly-Ser-Ser(octanoil)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Ala-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg-OH) fue sintetizado a medida por Bachem (Basel, Suiza). El péptido que se usó durante la selección contiene un residuo de biotina en el extremo C terminal para permitir la división de la especie de ácido nucleico no unido que emplea la interacción biotina-NeutrAvidina.

**Mezcla de selección, generación de una mezcla inicial**

10 La mezcla de selección DE.40 consiste en una región aleatoria de 40 nucleótidos, flanqueada por el T7-promotor-portador-38nt-cebador en el extremo 5'y un cebador inversor de 20 nt en el extremo 3'. El cebador T7 porta una secuencia iniciadora de la transcripción seguida por una secuencia del cebador delantero. El cebador delantero comienza con un triplete de guanosina para aumentar la eficiencia de la transcripción.

**Mezcla de DE.40:** (corregido para ARN)

15 Mezcla de ARN: 5'-GGA GCT CAG ACT TCA CTC G TG-N40-CA CGT ACC ACT GTC GGT TCC AC-3'Rev. Compl.: 5'-GTG GAA CCG ACA GTG GTA CG TG-N40-CA CGA GTG AAG TCT GAG CTC C-3'DE.40T\*7: 5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AGC TCA GAC TTC ACT CG-3'DE.40R: 5'-GTG GAA CCG ACA GTG GTA CG-3'

(el promotor T7 está subrayado)

La temperatura de apareamiento se calculó teóricamente y se optimizó después por varios experimentos que varían la temperatura y el tiempo para el apareamiento del cebador.

20

	Tm (°C)	TP (°C)	usada (°C)	
Para	56,1	68,72	ARN	2'-F-ARN
Rev	56,9	68,72	63	63
Tm, = temperatura de fusión, TP = 22 + 1.46x[2x (#GC) + (#AT)] (Wu et al.: DNA and Cell Biology 10, 233 (1991)); sin región del promotor T7				

25 La mezcla se sintetizó químicamente, la composición base determinada y una complejidad de 1x10E15 diferentes moléculas = 1,78 nmol de ADN de cadena simple (ADNss) se amplificaron por PCR de una etapa. Para la mezcla inicial de 2-F-ARN, 1,78 nmol del ADN de cadena doble se transcribieron por medio de pirimidinas modificadas con 2'fluoro (Trilink) por medio del protocolo 1; la mezcla de ARN se transcribió por medio del protocolo 2 con nucleótidos no modificados.

Protocolo 1. protocolo para transcripción con pirimidinas modificadas con 2'-fluoro

Componente	Concentración patrón	100 µl de reacción
Buffer T7 (Epicentre) 5x	5x	20

DTT	100 mM	5
Mn <sup>2+</sup>	25 mM	10
2'-F-CTP	100 mM	3
2'-F-UTP	100 mM	3
rATP	100 mM	1
GTP	100 mM	1
Molde PCR	Ca, 100 pmol/μl	0,5
T7-Polimerasa	5 U/μl	2
ddH <sub>2</sub> O	-	54,5

Protocolo 2. protocolo para transcripción con nucleótidos no modificados

Componente	Concentración patrón	100 μl de reacción
80 mM de HEPES/KOH (pH 7,5)	10x de buffer de transcripción	10 μl
22 mM de MgCl <sub>2</sub>		
1 mM de espermidina		
10 mM de DTT	100 mM de DTT	10 μl
4 mM de NTP (es decir, cada uno)	10 mM de mezcla de NTP	40 μl
10 μmol/ml Rnasa-out (Invitrogen)	Rnasa-out (40 U/ μl)	1 μl
120 10 μg/ml BSA	2 mg/ml de BSA	6 μl
5 M de betaína	0,75 M de betaína	15 μl
2 μl/ml T7 ARN polimerasa (=100 U)	T7 ARN polimerasa (=100 U)	2 μl
α[ <sup>32</sup> P]-ATP		1 μl
α[ <sup>32</sup> P]-GTP		1 μl
Molde	50-100 pmol	7,5 μl
Agua (añadir a 100 μl)		6,5 μl

### Selección in vitro de los aptámeros de unión a D-ghrelina de rata

#### 5 Buffer de las selecciones

El buffer de selección usado durante la selección completa estudio de acuerdo con las condiciones fisiológicas de la sangre humana (20 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 mM de CaCl<sub>2</sub>). El pH 7,4 se ajustó a 37°C.

#### Selección y rigurosidad

- 10 La selección de los aptámeros de unión a D-ghrelina ('blanco') se realizó por medio de una mezcla de DE.40 modificada con 2'-fluoro (2F-ARN) y una mezcla de ARN no modificada (ARN). La unión de la mezcla al blanco tuvo lugar en solución durante 2 horas (10 μM-10 nM de péptido) y durante 12 horas (10 nM-500 pM). La inmovilización del péptido – complejo de ARN se realizó por medio del sistema estreptavidina/neutravidina-biotina. El péptido biotinilado se incubó con neutravidina derivada de agarosa o estreptavidina ligada a poliacrilamida (s.c. ultralink)
- 15 durante 10 min a 37°C y se separó por centrifugación corta. Después se lavó la matriz con buffer de selección para eliminar la mezcla no unida y de unión débil. Se realizó un cambio de matriz cada dos rondas (comenzando con neutravidina-agarosa) para evitar la generación de aptámeros bivalentes, que requieren la matriz para unirse con el

blanco con alta afinidad. La elución del ARN y 2'-F-ARN se logró por la desnaturalización de los complejos de péptido-ARN con 4 M de tiocianato de guanidina en dos etapas (37°C, 65°C) durante 10 min en un agitador. A partir de la ronda 13 en una tercera etapa, la elución se realizó a 95°C. El ARN o 2'-F-ARN eluido se extrajo con cloroformiato de fenol para eliminar el péptido, se precipitó con isopropanol y se amplificó por PCR.

## 5 Plegado del ARN/ 2'-F-ARN

Para evitar un plegado independiente bivalente del aptámero se realizó la desnaturalización y renaturalización en hielo en ausencia de Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. Las mezclas se desnaturalizaron durante 5 min a 95°C en un ciclador de PCR y se enfriaron inmediatamente en hielo triturado durante 2 min. Después se añadieron Tween 20 (concentración final 0,1%) y los iones cat bivalentes a partir de una mezcla 10 veces y se incubó durante 10 min adicionales a 37°C. La reacción se añadió directamente a la precolumna.

### Precolumna

La mezcla de ARN se incubó con la matriz pura antes de añadir el péptido a la solución. Esto se realiza para evitar el enriquecimiento de los aptámeros de unión a la matriz. El volumen de la matriz de la precolumna fue siempre el mismo volumen de la columna principal usada para separar los complejos de ARN-péptido de las especies no unidas. La matriz pura se incubó durante 10-15 min a 37°C en un agitador junto con la mezcla DE.40 plegada, se extrajo la mezcla no unida y se añadió directamente a la reacción de unión de ghrelina en solución.

### Unión en solución e inmovilización del complejo

La D-ghrelina biotinilada con una determinada concentración se añadió directamente a la mezcla después de extraerla de la precolumna. El gradiente de la concentración del péptido usado para las selecciones con ARN y 2'-F-ARN se exhiben en las Fig. 4A, y Fig. 4B. La inmovilización del complejo de ARN unido a bio-ghrelina se llevó a cabo por la adición directa de la matriz a la reacción de unión e incubación durante 10 min a 37°C en un termoagitador a 800 rpm.

### División

El complejo inmovilizado se lavó varias veces con buffer de selección precalentado para eliminar las moléculas no unidas y de unión débil. Las etapas de lavado se realizaron con 5x100 µl y de la ronda 13 con 5x1000 µl de buffer de selección.

### Elución de moléculas unidas

La elución del ARN y 2'-F-ARN unido se obtuvo por la desnaturalización del complejo péptido-ARN con 4 M de tiocianato de guanidina en dos etapas (37°C, 65°C) durante 10 min en un agitador. Desde la ronda 13 en adelante, se realizó una tercera etapa de elución a 95°C. El curso del ARN y 2'-F-ARN eluido en por ciento del ácido nucleico total usado en cada ronda de selección se muestra en las Fig. 5 y Fig 6. Para distinguir entre la señal umbral y una señal medida por ghrelina, se llevó a cabo una columna de control (sin añadir ningún péptido) cada ronda. La señal de la columna control se definió como el ruido o señal umbral. La relación de la señal medida por ghrelina a la señal del ruido se exhibe en la Fig. 1 y Fig. 2. Cada vez que la relación señal a ruido aumenta, la rigurosidad aumentó por la disminución de la concentración blanco en la siguiente ronda de selección. Después se mantuvo concentración del péptido en un nivel constante hasta que se obtuvo otro aumento de la relación señal a ruido en la distinta concentración de péptido. El aumento de la relación es un indicio para el enriquecimiento de los aptámeros de unión en una determinada concentración del péptido. El ARN o 2'-F-ARN eluido se extrajo con fenol-cloroformio para eliminar el péptido, precipitado con isopropanol y se amplificó por PCR.

## 40 Rondas dobles y pruebas de unión

Una ronda doble describe el proceso de dos rondas de selección subsiguientes sin amplificación. La primera ronda de selección ronda de recolección s.c. (CR) se usa para recolectar todos los aptámeros de unión a D-ghrelina a una concentración relativamente alta del blanco para librarse de los aptámeros de no unión. Después de la elución y extracción del ARN /2'-F-ARN unido, el ácido nucleico eluido se usa en la próxima ronda sin amplificación. Esta ronda se llama ronda doble (DR) y normalmente se realiza a muy baja concentración del blanco. Este proceso de selección se usa para eliminar la presión de la amplificación y plegado/replegado del aptámero.

En estas selecciones se realizaron 3 rondas dobles (ronda 12 ,13, 14 para ARN y ronda 14, 15, 16 para 2'-F-ARN). Antes de cada ronda de recolección (CR) se llevó a cabo una "prueba para unión" para una variedad amplia de concentraciones blanco para evaluar la mejor concentración blanco para recolectar los aptámeros. Esta prueba también se usar para controlar el aumento del enriquecimiento de la mezcla de ronda a ronda. Los resultados de estas rondas dobles y las pruebas para unión se exhiben en las Fig. 7A, 7B, 8A y 8B.

### Amplificación

### Extracción y precipitación

El ARN o 2'-F-ARN eluido se purificó por extracción con fenol-cloroformo y precipitó con 2 µl de glicógeno como portador, 0,3 M de acetato de sodio pH 5,5 y 1 volumen de isopropanol frío en hielo durante 20-30 min a -20°C.

### Transcripción inversa (RT)

- 5 El ARN/2'-F-ARN precipitado se tradujo en ADN de cadena simple por medio de transcriptasa inversa. No más de 5 pmol de molde por 30 µl de reacción se desnaturalizaron juntos con el cebador inverso durante 5 min a 95°C en 0,8 M de betaína, el cebador inverso se apareó en hielo durante 5 min, se añadieron buffer de reacción y los nucleótidos y la reacción se calentó durante 2 min a 48°C antes de añadir 5 unidades de transcriptasa inversa. La reacción se desarrolló con un gradiente de temperatura (30 min 48°C, 50°C 20 min, 55°C 10 min, 70°C 15 min) en un termociclador.

### 10 Reacción en cadena de polimerasa

Se usaron tres alícuotas de 10 µl de la reacción RT como un molde para la reacción de PCR. Los componentes de la reacción se añadieron de la siguiente manera:

Componente	Concentración patrón	100 µl totales
PCR-Puffer (Gibco)	10x	10
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	5
Mezcla de dNTP (A, T, G, C)	10 mM je NTP	2,5
Cebador T7	100 mM	3
Cebador inverso	100 mM	3
Molde (aus RT)	1-5 pmoV100 µl	10
Betaína	2 mg/ml de BSA	6 µl
Polimerasa Taq (Gibco)		1
ddH <sub>2</sub> O	-	Ajustar a 100 µl

Se realizaron entre 8-12 ciclos del siguiente programa en el ciclador de PCR

- 15 Desnaturalización 95°C: 1 min  
 Apareamiento 63°C: 1 min  
 Elongación 72°C: 1 min

- 20 Una alícuota de la reacción se analizó en un gel de poliacrilamida. La reacción de PCR se precipitó después con 1 µl de glicógeno, 0,3 M de acetato de sodio pH 5,5 y 3 volúmenes de 100% de etanol frío en hielo durante 20-30 min a -80°C. Los pellet se resuspendieron en agua y se usaron 50-100 pmol como modelo para la transcripción in vitro.

### Transcripción 2'-Fluoro

Se usaron 50-100 pmol de ADNsd como molde para la transcripción in vitro. Las condiciones fueron similares a las descritas anteriormente para la generación de la mezcla inicial. El ARN generado se usa para la próxima ronda de selección. La cantidad usada en cada ronda se menciona en la figura 3.

- 25 Los resultados de esta selección, se ilustran en la Fig.22 y la Fig. 23 para la selección por medio de la mezcla de ARN, y en las Fig. 24 y 25 por medio de la mezcla F'-ARN. Se entiende que ninguna de las secuencias mostradas en dichas Fig. son los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, que incluyen sus formas truncadas que, no obstante, son aún capaces de unirse al blanco.

### Ejemplo 2: Selección in vitro automatizada

- 30 A continuación se describirá la selección automatizada de la unión específica de los aptámeros de unión a D-ghrelina de rata.

### Materiales.

La D-ghrelina de rata biotilada (secuencia de aminoácidos, H-Gly-Ser-Ser(octanoil)-Fe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Ala-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg-OH) fue sintetizada a medida por Bachem, Basel, Suiza). El péptido que se usó durante la selección contiene un residuo de biotina en el extremo C terminal para permitir la división entre las especies de ácido nucleico no unido que emplean la interacción de biotina-NeutrAvidina. Para esto, se usaron NeutrAvidin agarosa y NeutrAvidin UltraLink Plus (ambas de Perbio Science, Bonn, Alemania). El kit de RT-PCR una etapa se adquirió en Qiagen (Hilden, Alemania). Taq ADN Polimerasa, Transcriptasa inversa Superscript II e inhibidor RNaseOUTRNase fueron de Life Technologies (Karlsruhe, Alemania), T7 ARN polimerasa de Stratagene (Amsterdam, Países Bajos), y DNasa I de Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Alemania). El colorante de detección de ADN bicatenario PicoGreen se adquirió en Molecular Probes, los NTP dem Larova (Teltow, Alemania).

#### Mezclas, cebadores y spiegelmers de ARN

La secuencia de la mezcla de ADN fue 5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AGC TCA GAC TTC ACT CGT GN40-CAC GTA CCA CTG TCG GTT CCA C-3' con N que simboliza una mezcla equimolar de A, C, G, y T.

Cebador (T7) delantero de DE.40T7:5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AGC TCA GAC TTC ACT CG-3'

15 Cebador inverso DE.40R:5'-GTG GAA CCG ACA GTG GTA CG-3'

La clonación y secuenciación de las mezclas enriquecidas se realizó con GATC (Konstanz, Alemania).

#### Proceso de selección in vitro automatizada

La mayor parte de las manipulaciones de manejo líquido durante la selección in vitro automatizada se realizaron en placas de 96 pocillos con tapas removibles (placas NCC; Bilatec AG, Alemania); la división de las especies de ARN no unido de unido se realizó en columnas Mobicol (MoBiTec AG, Alemania); la purificación automatizada de los transcritos in vitro se realizó por medio de unidades de ultrafiltración Microcon YM-30 (Millipore, Eschborn, Alemania).

#### ARN de entrada usado para la selección automatizada

25 El ARN para la primera ronda de selección automatizada (ronda 3) fue el mismo que en la tercera ronda de selección manual (ver Ejemplo 1). Se usaron 250 pmoles de este ARN como entrada por reacción de unión en la ronda 3 y 4; 100 pmoles en cada ronda adicional.

#### Desnaturalización de ARN

30 Todas las etapas de selección no enzimáticas excepto la desnaturalización del ARN antes de ponerse en contacto con la molécula blanco de D-ghrelina de rata se realizaron en buffer de selección (20 mM de Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM de NaCl; 5 mM de KCl; 1 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 mM de CaCl<sub>2</sub>; 0,1% [p/vol] de Tween-20). Para la desnaturalización, 100 - 250 pmol de la mezcla de ARN se calentaron a 95°C durante 5 min en 57 µl de buffer de selección sin CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>. Después de la desnaturalización, el ARN se enfrió rápidamente a 4°C durante 2 minutos y posteriormente se equilibró a 37°C. Se añadieron MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> a las concentraciones finales de 1 mM cada una y la mezcla se incubó durante 5 min adicionales a 37°C (plegado del ARN).

#### 35 División del ARN unido del no unido

Después de la desnaturalización, el ARN se puso en contacto durante 15 minutos a 37°C con 10 µl de la matriz de selección NeutrAvidin agarosa o NeutrAvidin UltraLink, respectivamente) sin péptido. Esta llamada pre-selección se diseñó para eliminar las potenciales especies de ARN que se unen a la matriz de la mezcla. A fin de mantener las partículas de la matriz en suspensión, las muestras se agitaron a 1.400 rpm (37°C). La matriz posteriormente se separó del ARN en solución por sedimentación simple, el sobrenadante se transfirió a pocillos frescos, y se añadió D-ghrelina de rata a concentraciones mostradas en la Fig. 9. Después de 60 minutos a 37°C, se añadieron 10 µl de la matriz de unión a biotina y la reacción de unión se incubó durante 10 min adicionales bajo agitación (1.400 rpm, 37°C). Para el lavado, la matriz posteriormente se transfirió a las columnas Mobicol y se lavó con hasta 135 volúmenes de matriz de buffer de selección precalentado (37°C) para eliminar las especies de ARN no unido a unido.

Los volúmenes de lavado variaron entre 45 (ronda 3, es decir, primera ronda automatizada) y 135 volúmenes de matriz en las últimas rondas (ver fig. 9).

#### Elución de ARN unido

50 La elución del ARN unido se realizó por la resuspensión de las partículas de la matriz con ARN unido en 95 µl de buffer de RT-PCR y calentamiento a 95°C durante 3 minutos. Se añadieron las enzimas para la transcripción inversa y posterior PCR después del equilibrio a 50°C durante 2 minutos. Se usaron las condiciones de buffer y la cantidad de enzimas sugeridas por el proveedor Qiagen.

## Amplificación

### Transcripción in vitro - Generación de ARN para usar en el proceso de selección

5 Las transcripciones se realizaron con 150 U de T7 ARN polimerasa y 40 U de inhibidor RNaseOut RNasa en buffer de reacción de T7 (80 mM de HEPES pH 7.5; 22 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 mM de espermidina; 10 mM de ditiotreitól; 4 mM [cada] de GTP, CTP, ATP y UTP; 80 Pg/ml de BSA) en un volumen de 150 µl. En una reacción de transcripción, 25 µl de reacción RT-PCR se usaron como molde para la transcripción in vitro. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 3 horas. Finalmente, se añadió DNasa I al digesto, el ADN molde y las reacciones se incubaron a 37°C durante 15 minutos. El pirofosfato inorgánico precipitado posteriormente se disolvió por el añadido de EDTA a una concentración final de 25 mM en la estación de trabajo a 50°C. El ARN generado se separó de los NTP restantes y otros componentes de la reacción no deseados tanto por geles de desnaturalización que contienen 8 M de urea como por medio de ultrafiltración que emplea microconcentradores Microcon YM-30. El ARN purificado por ultrafiltración se lavó de la membrana de ultrafiltración, por purificación en gel las bandas de ARN se escindieron bajo la luz UV, el ARN eluyó del gel, precipitó en etanol, se secó y resuspendió en agua.

### Transcripción inversa y PCR de los ARN seleccionados

15 La transcripción inversa de las moléculas de ARN seleccionadas se realizó por medio del kit de Qiagen RT-PCR una etapa en las condiciones recomendadas por el proveedor en presencia de la matriz de NeutrAvidin Agarosa o UltraLink Plus en un volumen de 120 µl. Las muestras (buffer de reacción RT-PCR junto con la matriz y ARN adherente) se calentaron durante 3 minutos a 95°C y se equilibraron a 50°C durante 2 minutos antes de añadir las enzimas. Para la transcripción inversa, las reacciones se mantuvieron a 50°C durante 20 minutos y 10 minutos a 20 60°C. La inactivación de las enzimas RT así como la activación de la ADN polimerasa termoestable se obtuvo por la incubación de la mezcla a 95°C durante 15 minutos.

Los parámetros de termociclado fueron los siguientes: desnaturalización, 30 s a 5°C; apareamiento, 30 s a 63°C; polimerización, 30 s a 72°C.

### Control del progreso de PCR

25 A fin de mantener el número de ciclos de PCR en un mínimo, la cantidad de ADN de cadena doble generado en la PCR se rastreó en forma semicuantitativa. La reacción se cicló solo el tiempo suficiente para generar suficiente ADN molde para la transcripción in vitro. Durante la PCR, se muestrearon alícuotas de 3 µl de las reacciones después de un número determinado de ciclos y se mezclaron con una solución de PicoGreen (diluida 1:400 en buffer TE [10 mM de Tris-HCl, pH 8; 1 mM de EDTA]). El PicoGreen es un colorante fluorescente que no muestra casi fluorescencia cuando está libre en solución. Si el colorante, sin embargo, se ha unido al ADN de cadena doble, fluoresce fuertemente (ex: 485 nm; em: 520 nm). La medición de fluorescencia en comparación con el control que carece de la polimerasa termoestable permite una estimación relativamente exacta del progreso de la PCR. Después de alcanzar el umbral establecido (intensidad de fluorescencia con polimerasa / intensidad de fluorescencia sin polimerasa > 2), una alícuota de la reacción de RT-PCR se usó directamente como molde para la transcripción in vitro.

### 35 Manipulaciones automatizadas

A partir de la ronda 3 todas las manipulaciones excepto seis etapas de purificación en gel se realizaron en forma automatizada con un robot pipeteador. La configuración de los módulos usados durante el proceso se ilustra en la Fig. 10, el orden de uso de los módulos fue el que se muestra en la Fig. 11. Se usaron los siguientes módulos durante el proceso de selección:

- 40
- lector de fluorescencia para el control del progreso de la amplificación durante la PCR. Las muestras que ya han generado suficientes cantidades de ADNsd para la transcripción in vitro se almacenaron inmediatamente a 4°C y no se sometieron a termociclado adicional
  - colector de vacío doble con cámara A para la división y cámara B para la purificación de las reacciones de transcripción
- 45
- gradillas para puntas barrier conductivas, desechables
  - termociclador para correr los programas de PCR así como varias etapas de incubación
  - agitador para suspender la matriz particulada en el buffer de unión o reacción
  - estación de trabajo 50°C para inicio en caliente de las reacciones enzimáticas o para mantener las reacciones de PCR reacciones a temperaturas elevadas para tomar las muestras durante las mediciones fluorescentes
- 50
- estación de trabajo 4°C para la conservación intermedia de las reacciones de PCR o transcripción
  - gradilla de reactivo a 4°C para la conservación de los reactivos sensibles a la temperatura

- gradilla de reactivo a 37°C para conservación y precalentamiento del buffer de lavado
  - estación de trabajo 37°C para realizar la mayor parte de las etapas de pipeteo
  - estación de trabajo de la fluoroplaca para preparar las reacciones de medición de fluorescencia
  - hotel para conservación de las placas de microtitulación actualmente no en uso
- 5 • estación de residuos para el desecho de las puntas de pipetas usadas

La participación de los módulos en el contexto de este ejemplo así como el orden de participación durante el proceso de selección in vitro automatizada se diagrama en la Fig. 11.

Resultados de la selección

Curso de la selección

10 El curso de la selección in vitro contra D-ghrelina de rata se ilustra en la Fig. 9. En cada ronda de selección, se realizaron tres reacciones de unión con diferente rigurosidad más una columna vacía que carece de la molécula blanco. La rigurosidad se ajustó por la variación de los volúmenes de lavado así como la reducción de la concentración blanco.

15 Las rondas de selección 1 y 2 se realizaron manualmente, ya que las grandes cantidades de mezcla de ARN que son necesarias para representar la complejidad de la mezcla deseada no pudieron ser manipuladas con seguridad por el robot. Desde la ronda 3 en adelante, la selección se realizó completamente automatizada. Cada dos rondas, se tomó una decisión sobre que rigurosidad se debe usar para las siguientes dos rondas.

20 En La Fig. 9, está destacada la cadena de selección que produjo las secuencias dadas en la Fig. 13. Generalmente, el ARN seleccionado de la cadena más rigurosa (es decir, una con la concentración blanco más baja o el volumen de lavado mayor, respectivamente) que todavía mostró señal significativa con respecto al umbral se usó como entrada para la próxima ronda. La cantidad de ciclos de PCR que fue necesaria para alcanzar el nivel umbral (ver "Control el progreso de PCR") se usó como una medida. En total, se realizaron 19 rondas de selección – 17 de estas automatizadas.

25 La población de las moléculas de ADNsd desde la ronda 17 y ronda 19 (cada a 6,2 nM de D-ghrelina) se clonaron y secuenciaron. En total, 96 clones se secuenciaron (48 de la ronda 17 y ronda 19, respectivamente). Las frecuencias y apariciones de los 14 clones diferentes fue como se ilustra en la Fig. 12 (tabla 5).

Secuencias

El resultado del análisis de la secuencia se puede observar en la Fig. 13. De los 96 clones totales, ambos cebadores se pudieron hallar en 87.

30 Se entiende que ninguna de las secuencias mostradas en la Fig 13 son ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, que incluyen sus formas truncadas que, sin embargo, aún son capaces de unirse al blanco.

### **Ejemplo 3: Caracterización de los aptámeros de ARN para D-ghrelina**

#### **Calificación de los clones por medio del "ensayo de microesferas" (unión en solución)**

35 Los 14 clones que se habían obtenido en la selección in vitro automatizada contra D-ghrelina se calificaron con respecto a su comportamiento de unión por medio del ensayo de microesferas

Para este fin, 2 pmol (20 nM) de ARN se desnaturalizaron durante 5 min a 95°C en 100 µl de buffer de selección sin Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> y Tween 20 y posteriormente se enfriaron inmediatamente por colocación directa en hielo. Posteriormente se añadieron Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> a una concentración final de 1 mM cada uno y Tween 20 a una concentración final de 0,1%. La solución se equilibró a 37°C.

40 Este ARN se preincubó con concentraciones diferentes de D-ghrelina biotinilada durante 1 h a 37°C. Posteriormente 40 µl de esta solución se transfirieron a una microplaca de titulación y se añadieron 30 µl de partículas de estreptavidina paramagnética ("microesferas"; Roche, 10 mg/ml) y la mezcla se incubó durante 10 min a 37°C para inmovilizar toda la D-ghrelina biotinilada en las microesferas (péptido libre así como los complejos ARN:péptido). A fin de controlar la disminución de la concentración de ARN en el sobrenadante en dependencia de la concentración de D-ghrelina, se cuantificó la cantidad de ARN en el sobrenadante por medio del colorante fluorescente OliGreen (Molecular Probes).

45 La fluorescencia de OliGreen es fuertemente dependiente de la unión de la molécula a los oligonucleótidos: cuando hay no unido en solución, OliGreen solo muestra fluorescencia débil cuando se excita con luz de 85 nm. Sin embargo, cuando los ácidos nucleicos están presentes, la señal fluorescente a 520 nm aumenta en forma proporcional a la concentración del ácido nucleico.

50

5 Los complejos de ARN-blanco posteriormente se disgregaron por la resuspensión de las microesferas en 6 M de urea y la incubación durante 10 min a 37°C. A fin de controlar el aumento de ARN eluido en dependencia de la concentración blanco, también se cuantificó la cantidad de ARN en este eluato. Todos los valores se corrigieron por la señal umbral en el control sin péptido. Las curvas de unión representativas para el sobrenadante y eluato se ilustran en las Fig. 14A a E.

Una primera calificación por medio de las concentraciones de D-ghrelina de 0, 20, 100 y 500 nM mostraron que todos los clones analizados se unieron de modo similar bien con una KD de la conformación activa de menor que 100 nM. Tal como se considera a partir de la disminución de la concentración de ARN en el sobrenadante, aproximadamente 40 a 50% del ARN parece estar en la conformación activa.

10 Un calificación más detallada que utiliza las concentraciones de D-ghrelina de 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200 y 400 nM para los clones B11, C11, C12, A8 y F12 mostró que todos estos clones se unen con una KD de la conformación activa de aproximadamente 10 nM en este ensayo (Fig. 14A a E).

15 Estas figuras muestran el aumento de la fluorescencia mediada por ácido nucleico con dependencia de la concentración de D-ghrelina biotinilada. En el eje y se representa el aumento de la señal de fluorescencia [%] en el eluato respecto de la señal umbral del control sin péptido (= 0%). Los puntos de datos determinados para el clon A8 se ajustaron con un modelo de OneSiteBinding por medio de la fórmula

$$y = \frac{B * x}{K + x}$$

Bmax es un valor para el valor máximo de meseta para el aumento de fluorescencia a concentraciones del péptido altas. KD muestra la constante de unión KD en [nM].

20 Debido a que las constantes de unión inferiores a 10 nM no se pueden analizar con este ensayo, se caracterizaron posteriormente las propiedades de unión de tres clones seleccionados por un ensayo de unión mediante ARN radiomarcado así como por el uso de un instrumento de Biacore 2000.

#### Calificación de clones radiomarcados seleccionados con respecto a su comportamiento de unión

25 Se realizó una calificación del comportamiento de unión de 3 moléculas seleccionadas hacia la molécula blanco D-ghrelina de rata. Para este fin, los clones B11, E3 y F12 se transcribieron in vitro en la presencia de  $\alpha$ 32P-GTP y  $\alpha$ 32P-ATP. Se desnaturalizaron 2-5 pmoles de los ARN radiomarcados durante 3 minutos a 95°C en el buffer de selección sin Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>, plegados por la adición de estos iones a una concentración final de 1 mM a 37°C, y se incubaron durante 1 hora a 37°C con D-ghrelina de rata biotinilada en las concentraciones de 0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, y 3000 nM. Posteriormente, se añadió una cantidad constante de NeutrAvidina agarosa como matriz y el complejo de ARN:péptido se agitó a 37°C durante 10 minutos más. La matriz con péptido unido y los complejos de péptido:ARN después se separaron, se extrajo el sobrenadante, y se determinó la diferencia entre ARN unido y no unido. A partir de los números calculados, se sustrajo el control (0 nM de D-ghrelina) como umbral (Fig. 15, tabla 6). Las curvas de unión con números anexos se ilustran en la Fig. 16 A a C.

#### Calificación de clones por medio del instrumento de Biacore 2000

35 Se realizaron las mediciones biacore de los 14 clones como ensayos de unión directa de solución de ARN sobre un chip de ghrelina. Los compañeros de unión son ARN libre y ghrelina preinmovilizada.

El chip de ghrelina consistió en un chip CM5 (Biacore) con 4 celdas de flujo cuya superficie se ha acoplado con EDC/NHS-acoplamiento de amino de la siguiente manera:

40 Celda de flujo 1: 1265 RU de avidina como celda de referencia  
 Celda de flujo 2: 1270 RU de L-ghrelina (rata)  
 Celda de flujo 3: 740 RU de D-ghrelina (rata)  
 Celda de flujo 4: 600 RU de D-ghrelina (rata)

Las muestras analizadas se ajustaron a una concentración de 500 nM en buffer de selección y se equilibraron a 37°C. La medición misma se realizó en un instrumento de Biacore 2000 bajo las siguientes condiciones:

45 Temperatura 37°C  
 Flujo 20  $\mu$ l/min  
 Asociación 5 min

Disociación 5 min

Regeneración 1 M NaCl + 0,01% Triton X-100

5 Resultó que 13 de los 14 D-ARN analizados presentó una KD en el intervalo de 100 a 200 nM a D-ghrelina acoplado a amino (Fig. 17). La concentración de D-ARN de la preparación de C12 fue mucho más baja que para los otros, lo que produce una señal máxima más baja. Esto dificulta la interpretación y la KD aparente baja de aproximadamente 20 nM es cuestionable.

#### Competición de clones B11 con D-ghrelina de rata libre

10 Para evaluar las propiedades de unión del clon D-B11 para la D-ghrelina libre de rata, se realizó un experimento de competición: Una concentración constante de D-B11 (100 nM) se preincubó con diferentes concentraciones de D-ghrelina libre (0 – 500 nM) a 37°C en buffer de selección y posteriormente se inyectó en el biacore. La ghrelina inmovilizada en el chip biacore y la ghrelina libre compiten por la unión del ARN que lleva a una menor concentración aparente de ARN con concentración creciente de ghrelina libre y de este modo a una señal biacore más baja.

15 Como se muestra en la Fig. 18, la señal biacore disminuye con la concentración creciente de D-ghrelina en solución. Esto significa que la unión a D-ghrelina inmovilizada puede competir con la D-ghrelina libre.

#### Ejemplo 4: Truncamiento de B11 y caracterización del spiegelmer

Las estructuras secundarias del aptámero B11 se calculó por medio del programa mafold (I.L. Hofacker et al., 1994. Monatsh. Chem 125: 167-188) que se presenta en la Fig. 19.

20 Para la producción de los spiegelmers ARN, fue necesario truncar la secuencia de B11 de modo tal que el motivo de unión resultante pueda permitir la síntesis química con esfuerzos razonables y la afinidad para la ghrelina no se pierda.

25 A fin de obtener esto, se suprimieron las bases 1 a 17 y 65 a 82. El respectivo trc B11 47mer (para la estructura secundaria calculada por mafold, ver Fig. 19) se produjo como D-ARN enzimáticamente por la síntesis de ADNss que contiene una secuencia del promotor T7, se carga en el ADNss para poder transcribir ADNsd por medio un cebador y Taq polimerasa, y se monta una reacción de ARN polimerasa T7 con este molde. El ARN producido se purificó por gel y se disolvió en agua. El correspondiente spiegelmer se sintetizó por medio de reacciones químicas de  $\beta$ -cianoetilo.

30 La versión de B11 truncada se analizaron en las formas L y D así como el ARN-D de longitud completa en un instrumento de Biacore 2000 como se describió anteriormente en la misma corrida y dio resultados similares para la KD entre 100 y 200 nM (Fig. 20). Un revestimiento de las mediciones biacore del clon B11 (D-ARN) y B11 truncado (D- y L-ARN, respectivamente) se muestra en la Fig. 21.

#### Ejemplo 5: Método para analizar la inhibición de liberación de calcio inducida por ghrelina por Spiegelmers de unión a ghrelina

35 Las células CHO transfectadas en forma estable que expresan el receptor de ghrelina humano (GHS-R1a) (obtenido de Euroscreen, Gosselies, Belgium) se siembran con  $5 - 7 \times 10^4$  células por pocillo en una placa de 96 pocillos negra con parte inferior transparente (Greiner) y se cultivan durante la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en el medio UltraCHO (Cambrex) que contenía además de 100 unidades/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin, 400  $\mu$ g/ml de geneticina y 2,5  $\mu$ g/ml de fungizona.

40 Los Spiegelmers se incuban junto con ghrelina humana o de rata (Bachem) en medio UltraCHO, que contienen 5 mM de probenecid y 20 mM de HEPES (CHO-U+) durante 15 a 60 min a temperatura ambiente o 37°C en 0,2 ml de una placa de 96 tubos de perfil bajo.

45 Antes de cargar con el colorante indicador de calcio fluo-4, las células se lavan una vez con 200  $\mu$ l de CHO-U+. Posteriormente se añaden 50  $\mu$ l de la solución del colorante indicador (10  $\mu$ M de fluo-4 (Molecular Probes), 0,08% de pluronic 127 (Molecular Probes) en CHO-U+) y las células se incuban durante 60 min a 37°C. A partir de este momento las células se lavan tres veces con 180  $\mu$ l de CHO-U+. Finalmente se añaden 90  $\mu$ l de CHO-U+ por pocillo.

La medición de las señales de fluorescencia se realiza a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de emisión de 520 nm en un lector de placa de multidetección Fluostar Optima (BMG), equipado con bombas de inyección.

50 Para analizar el tiempo exacto de los cambios inducidos por ghrelina en las concentraciones de calcio, se preparan soluciones para estimulación como soluciones concentradas 10x en CHO-U+ y se inyectan con la ayuda de las bombas de inyección. Cada pocillo se analiza separadamente en esta clase de medición. Al final del registro de cada pocillo, se inyectan 10  $\mu$ l de Triton-X-100 1% para controlar la carga apropiada.

Para la medición paralela de varias muestras, los pocillos de una hilera (perpendicular) de una placa de 96 pocillos se registran juntos. Primero se realizaron tres lecturas con un período de retardo de 4 seg para la determinación de la línea de base. Posteriormente se interrumpe el registro y la placa se saca del instrumento. Por medio de una pipeta multicanal, se añaden 10 µl de la solución de estimulación a los pocillos, posteriormente la placa se mueve al instrumento nuevamente y continúa la medición. En total se realizan 20 registros con los intervalos de tiempo de 4 segundos.

Para cada pocillo la diferencia entre los valores de fluorescencia máxima y línea base se determina y grafica contra concentración de ghrelina o, en los experimentos sobre la inhibición de la liberación de calcio por los Spiegelmers, contra la concentración de Spiegelmer.

#### 10 **Ejemplo 6: Reselección automatizada**

A fin de obtener aglutinantes de ARN con mejores afinidades de unión, se realizó una reelección sobre la base de aptámero de unión a ghrelina C12. La secuencia de la mezcla de ADN respectiva fue 5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGGAGC TCA GAC TTA GCA GGT GGG TGA GG caa aaa cgt aag acc gaa ggt aac cat t CCT ACC CAC CAT CGA GTGTCG GTT CCA C-3' con letras minúsculas que simbolizan una mezcla de la base respectiva a 34%, las otras tres bases a 22%. El cebador delantero DE2.T7 presentó una secuencia 5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AGC TCA GAC TTA GCAGG-3', el cebador inverso DE2.R presentó la secuencia 5'-GTG GAA CCG ACA CTC GAT GG-3'.

Las primeras dos rondas de selección se realizaron manualmente como se describe en el ejemplo 1 "Selección in vitro manual"; las rondas 3 a 10 se realizaron con el robot como se describe en el ejemplo 2 "Selección in vitro automatizada".

La población de moléculas de ADNsd de la ronda 10 (a 12 nM de D-ghrelina) se clonó y secuenció. En total, se secuenciaron 46 clones. Las secuencias de nucleótidos de los 25 clones diferentes cuyas propiedades se examinaron se ilustran en la Fig. 31.

#### **Ejemplo 7: Análisis de clones individuales de la reelección**

Se han elegido 25 clones de la mezcla de reelección (Ejemplo 6, Figura 31) que muestran las variaciones en diferentes posiciones para calificar por medio del "ensayo de microesfera" que se describió en el Ejemplo 3. La unión de los aptámeros de D-ARN se analizó a las concentraciones de D-ghrelina de 0, 10, 20, 50, 100, 200, 400, y 800 nM; como una referencia, el aptámero NOX-SOT-D (C12) se ha analizado en paralelo. Varios candidatos se unieron más fuerte a D-ghrelina que el aptámero control NOXSOT-D (C12), que muestra una KD menor o una cantidad mayor de la conformación activa.

Además, la unión de estos aptámeros se analizó por medio del instrumento de Biacore 2000 (Ejemplo 3). Resultó que todos los ARN se unen a bio-D-Ghrelina, aunque con desviaciones de la intensidad de señal, así como el comportamiento de asociación y disociación (ver Fig. 32). Los clones SOT-108-B1, SOT-108-C8, SOT-108-F2, SOT-108-B6, SOT-108-B7, SOT-108-D5, SOT-108-F7, SOT-108-G3, SOT-108-H4, SOT-108-E6, y SOT-108-C6 parecen tener una unión mejor que los clones control NOX-SOT-C (B11) y NOX-SOT-D (C12), que muestran una señal más alta en la medición, o una velocidad de disociación más lenta. Se ha de mencionar, que estos clones también fueron excepcionales en el "ensayo de microesferas".

En consecuencia estos clones se han analizado en cuanto a su actividad como Spiegelmers en un ensayo de cultivo celular (Ejemplo 5). Al mismo tiempo, se analizó, si estas secuencias se pueden truncan a tamaños de menores de 50 nucleótidos. Los Spiegelmers analizados se sintetizan en la Fig. 33.

En un primer conjunto de ensayos celulares, la influencia inhibitoria de los Spiegelmers sobre la liberación de calcio dependiente de ghrelina se detectó en las concentraciones de ARN-L de 10 nM y 3 nM, respectivamente. Esto permite una estimación aproximada de la actividad biológica de los clones truncados. Los resultados de estas mediciones de dos puntos se dan en la Fig. 34.

En las condiciones del ensayo celular, estos clones de reelección truncados muestran una actividad inhibitoria comparable a la de NOX-SOT-D (C12). Sin embargo, los Spiegelmers sot\_d\_1r\_054, sot\_d\_1r\_056, y sot\_d\_1r\_064 inhiben la actividad de ghrelina a 3 nM y 10 nM en forma significativamente más fuerte, en comparación con los controles NOX-SOT-C (B11) y NOX-SOT-D (C12).

Un segundo conjunto de experimentos analiza la actividad inhibitoria de estos Spiegelmers sot\_d\_1r\_054, sot\_d\_1r\_056, y sot\_d\_1r\_064 en diferentes concentraciones de L-ARN (Ejemplo 5). Las curvas de dosis respuesta resultantes se muestran en la Fig. 35. Todos los clones mostraron inhibición casi máxima de la liberación de calcio inducida por ghrelina a 10 nM. La IC50 aparente se puede detectar a -5 nM, mientras que a las concentraciones de Spiegelmer de 1 nM no se puede observar respuesta. En comparación, la IC50 de NOX-SOT-C (B11) en este ensayo se detectó por encima de 10 nM.

Se ha de considerar, que el ensayo celular actúa a una concentración de ghrelina de 5 nM, que dificulta analizar los eventos de unión con IC50 menor; la inhibición completa no se puede observar, cuando el Spiegelmer está presente en cantidades subestequiométricas en comparación con ghrelina. Sin embargo, la inhibición casi completa de la actividad de ghrelina a 10 nM indica, que la actividad biológica de los Spiegelmers sot\_d\_1r\_054, sot\_d\_1r\_056, y sot\_d\_1r\_064 se puede detectar aún mejor.

**Ejemplo 8: Investigación del efecto del Spiegelmer anti-ghrelina administrado i.v. sobre la ingesta de alimentos de ratones normales**

Antes de comenzar el estudio, los ratones (NMRI) se aclimataron durante al menos 5 días. Los ratones tuvieron acceso libre a alimento y agua y se alojaron en forma individual. El experimento se realizó con 3 grupos de 8 animales cada uno. Los grupos recibieron solución salina, un Spiegelmer control no activo, o el Spiegelmer B11 PEGilado por inyección i.v. al final de la fase luminosa. Los Spiegelmers se aplicaron a una dosis de 90 mg/kg (1,8 µM/kg). Después de la administración, los animales tuvieron acceso irrestricto a alimento y comida y se registró la ingesta de alimentos en intervalos de cinco minutos durante 24 horas. El experimento con un total de 24 animales se dividió en dos conjuntos de 12 animales cada uno y se llevó a cabo en dos días diferentes.

En el primer conjunto se observó una disminución de la ingesta de alimentos (Fig. 36A y 36B) mientras que en el segundo conjunto o se pudo observar diferencia entre anti-Ghrelina y el Spiegelmer control (Figs. 37A y 37B). En total se indica una tendencia a la disminución en la ingesta de alimentos en el período de tiempo después de la administración de Spiegelmer anti-ghrelina (Fig. 38<sup>a</sup> y 38B).

**Ejemplo 9: Investigación del efecto de Spiegelmer anti-ghrelina administrada i.v. sobre la ingesta de alimentos de ratones entrenadas con alimento**

Los ratones (NMRI) se entrenaron para tener acceso a alimentos solo dos veces durante la fase oscura durante el período de 1 hora. En estas condiciones ellos aprenden rápidamente a alimentarse durante este momento para cumplir sus requerimientos dietarios. El fundamento para este abordaje es obtener mejor comparabilidad entre los animales de ensayo individuales y los grupos en total.

El experimento se llevó a cabo con 3 grupos de 8 animales cada uno. Los grupos recibieron solución salina, un Spiegelmer control no activo, o el Spiegelmer B11 PEGilado por inyección i.v. en el final de la fase luminosa. Los Spiegelmers se aplicaron a una dosis de 60 mg/kg (1 µM/kg). El experimento con un total de 24 animales se dividió en dos conjuntos de 12 animales cada uno y se llevó a cabo en dos días diferentes. Los animales de ensayo tuvieron acceso al alimento durante el período de 1 hora a 1 y 7 horas después de la administración. La cantidad de alimento consumido se determinó manualmente después de cada período de alimentación. La Fig. 39 muestra la ingesta de alimentos de 12 animales en el primer experimento y la Fig. 40 sintetiza el segundo experimento. La ingesta total de alimentos de todos los animales por grupo se muestra en la Fig. 41.

Los animales mostraron una tendencia a la disminución del consumo de alimentos especialmente durante el primer período de alimentación (Fig. 39A y 39B). Sin embargo, en total solo se pudo observar un efecto débil y transitorio del Spiegelmer anti-ghrelina sobre el consumo de alimentos.

**Ejemplo 10: Investigación del efecto de Spiegelmer anti-ghrelina administrada i.c.v. sobre la ingesta de alimentos de ratas canuladas**

Las ratas macho Wistar se alojaron en un cuarto controlado por la luz (ciclo de 12-h luz/12-h oscuridad) y se les permitió libre acceso a alimento de rata estándar. Las ratas macho Wistar se prepararon 1-2 semanas antes de los experimentos para la inyección intracerebroventricular. Se implantó una cánula de acero inoxidable intracerebroventricular (icv) bajo anestesia en el cráneo de las ratas. La colocación de la cánula icv fue confirmada en todas las ratas por la introducción del colorante después del experimento. En el día de tratamiento 4 ratas por grupo recibieron una administración icv única de a) control Spiegelmer (0,7 mM/5 µl/rata) b) Spiegelmer B11 (0,7 mM/5 µl/rata) o c) vehículo (0,9% salina/5 µl/rata) al final de la fase luminosa. La ingesta de alimentos se midió durante 24 horas y se comparó con el día antes de la inyección (registro basal) Fig. 42.

En este experimento el efecto del Spiegelmer anti-ghrelina no fue significativamente diferente de los resultados observados en los grupos control.

**Ejemplo 11: Inhibición de la liberación de la hormona de crecimiento después de la administración de ghrelina exógena por el Spiegelmer anti-Ghrelina**

El experimento se realizó en ratas Sprague Dawley después de 7 días de adaptación en tres grupos 6 animales por grupo. Dos grupos recibieron una inyección i.v. única de 150 nmol de Spiegelmer anti-ghrelina PEGilado o Spiegelmer control PEGilado. 30 minutos después de la administración del Spiegelmer cada rata recibió una inyección intravenosa de 3 nmol de ghrelina (250 µl). Se extrajeron muestras de sangre bajo anestesia antes de la administración de ghrelina para el registro basal del nivel de hormona de crecimiento y 5 min, 15 min, 30 min y 45 min después de la inyección. Las muestras de plasma resultante se analizaron con un sistema de

radioinmunoensayo (Hormona de crecimiento, Rata, kit de ensayo Biotrak, RPN2561, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg).

5 La liberación de GH fue inhibida con supresión sostenida durante el período completo de observación en el grupo tratado con Spiegelmer (Fig. 43) que demuestra la actividad in vivo del Spiegelmer anti-ghrelina en el modelo descrito.

Más aún, la inhibición de la liberación de GH fue investigada por la administración de dosis diferentes del Spiegelmer anti-ghrelina (Fig. 45). Una dosis única de 15 nmol suprimió el efecto de la ghrelina sobre la liberación de GH, mientras que no fue suficiente una dosis de 3 nmol.

#### 10 **Ejemplo 12: Neutralización de la estimulación de la ingesta de alimentos de la ghrelina exógena por un Spiegelmer anti-ghrelina**

15 El estudio se dividió en dos experimentos con cuatro grupos de animales por medio de treinta y dos ratas macho Sprague Dawley en total. Después de 7 días de adaptación, los animales se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos de 8 animales cada uno. Las ratas se alojaron en forma individual y se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad normal. Los animales tenían libre acceso a alimento y agua. Los animales, frascos de alimentación y las botellas de agua se pesaron (con aproximación de 0,1 g) aproximadamente 2 horas después del comienzo del período de luz. Los frascos de alimentación y las botellas de agua se pesaron 4 horas después y se calcularon las ingestas de alimento y agua de los diferentes grupos de ratas.

20 En el primer conjunto se analizó la dosis óptima de ghrelina exógena. Se administraron tres dosis diferentes de ghrelina (16,7 nmol/kg, 33,4 nmol/kg y 83,5 nmol/kg, respectivamente) por vía intraperitoneal. Las ingestas de alimento y agua de los diferentes grupos de dosis se determinaron en forma concurrente. Los frascos de alimentación y las botellas de agua se pesaron en el momento de administración del fármaco y después de 1, 2 y 4 horas (Fig. 44). La dosis óptima para la estimulación de la ingesta de alimentos en las ratas después de la administración i.p. fue 10 nmol/animal (Fig. 44).

25 En un experimento posterior realizado de acuerdo con el mismo protocolo descrito antes se investigó la neutralización del efecto de la ghrelina exógena sobre la ingesta de alimentos por un Spiegelmer anti-ghrelina. El primer Spiegelmer en dos niveles de dosis de 150 nmol/animal y 30 nmol/animal se administró s.c.. Una hora después las ratas recibieron ghrelina por administración i.p. El grupo control recibió vehículo. Las ingestas de alimento y agua se controlaron después de 1, 2 y 4 horas como se describió antes. El Spiegelmer anti-ghrelina mostró un efecto sobre la ingesta de alimentos.

30

LISTADO DE SECUENCIA

<110> NOXXON Pharma AG

<120> Ácidos nucleicos de unión a ghrelina <130> N 10038 PCT

5 <160>

<170> Patent In version 3.1

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

10 <213> Rattus rattus

<400> 1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys  
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

<210> 2

<211> 83

15 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> mezcla de ARN

20 <220>

<221> misc rasgo

<222> (22)..(61)

<223> -nucleótido = a, g, c o u

25 <400> 2

ggagcucaga cuucacucgu gnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

ncacguacca cugucgguuc cac 83

<210> 3

<211> 83

<212> ARN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mezcla de ARN (cadena complementaria inversa)

<220>

5 <221> misc\_rasgo

<222> (23)..(62)

<223> nucleótido = a,g,c or u

<400> 3

guggaaccga cagugguacg ugnnnnnnnn dnnnnnnnnn rnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nncacgagug aagucugagc ucc 83

10 <210> 4

<211>38

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> cebador

<220>

<221> promotor

20 <222> (1)..(19)

<223> promotor T7

<400> 4

tctaatacga ctcactatag gagctcagac tcactcg 38

25 <210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> cebador

<400> 5  
 gtggaaccga cagtggtacg 20  
 <210> 6  
 <211> 102  
 5 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> mezcla de ADN

10 <220>  
 <221> misc\_rasgo  
 <222> (41)..(80)  
 <223> nucleótido es a, g, c o t

15 <400> 6  
 tctaatacga ctactatag gagtcagac ttcactcgtg nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60  
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn cacgtaccac tgcggttcc ac 102

<210> 7  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina  
 <400> 7  
 ggagcucaga cuucacucgu gugaggcaau aaaacuuaag uccgaaggua accaauccua 60  
 cacguaccac ugucgguucc ac 82

25 <210> 8  
 <211> 47  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 8

cgugugaggc aauaaaacuu aaguccgaag guaaccaauc cuacacg 47

5 <210> 9

<211> 82

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 9

**ggagcucaga cuucacucgu gugaggcagu aaaacuuaag uccgaaggua accaauccua 60**

**cacguaccac ugucgguucc ac 82**

15 <210> 10

<211> 47

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400>10

cgugugaggc aguaaaacuu aaguccgaag guaaccaauc cuacacg 47

25 <210> 11

<211> 82

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400>11

**ggagcucaga cuucacucgu gugaggcaau aaaacuuaag uccgaaggua accaauccug 60**  
**cacguaccac ugucgguucc ac 82**

<210> 12

<211> 47

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

10 <400> 12

cgugugaggc aauaaaacuu aaguccgaag guaaccaauc cugcacg 47

<210> 13

<211> 82

15 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

20 <400>13

**ggagcucaga cuucacucgu gugaggcaau aaaacauaag uccgaaggua accaauccua 60**

**cacguaccac ugucgguucc ac 82**

<210> 14

<211> 47 .

25 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 14

30 cgugugaggc aauaaaacau aaguccgaag guaaccaauc cuacacg 47

<210> 15

<211> 82

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

5 <400>15

ggagcucaga cuucacucgu gugaggcaau aaaacguaag uccgaaggua accaauccua 60

cacguaccac uguocggucc ac 82

<210>16

<211> 47

10 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

15 <400>16

cgugugaggc aauaaaacgu aaguccgaag guaaccaauc cuacag 47

<210> 17

<211> 84

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

25 <400>17

ggagcucaga cuucacucgu gugaggcaau aaaacuugua aguccgaagg uaaccaaucc 60

uacacguacc acugucgguu ccac 84

<210> 18

<211> 49

30 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400>18

cgugugaggc aa metaaaacu gaaaguccga agguaaccaa uccuacacg 49

5

<210> 19

<211> 83

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400>19

**ggagcucaga cuucacucgu gugaggcaau metaaacuaa guccgaaggu aaccaauccu 60**

**acacguacca cugucgguuc cac 83**

15

<210> 20

<211> 48

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 20

cgugugaggc aa metaaaacu uaaguccgaa gguaaccaau ccuacacg 48

25

<210> 21

<211> 85

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina -

<400> 21

**ggagcucaga cuucacucgu gcgugagggc aaaaacguaa gaccgaaggu aaccuuuccu 60**

**accacguac cacugucggu uccac 85**

<210> 22

<211> 50

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

10

<400> 22

cgugcgguga ggcaaaaacg uaagaccgaa gguaaccauu ccuaccacg 50

<210> 23

15 <211> 85

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 23

**ggagcucaga cuucacucgu gugagguagu aaaaaaacgu aaauccgaag guaaccaauc 60**

**cuacacguac cacugucggu uccac 85**

<210> 24

<211> 50

25 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

30 <400> 24

cgugugaggu aguaaaaaaaa cguaaaucg aagguaacca auccuacacg 50

<210> 25

<211> 88

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 25

**ggagcucaga cuucacucgu gugagguagu aaaaaaaaaa cguaaaucgg aagguaacca 60**

**auccuacacg uaccacuguc gguuccac 88**

10 <210> 26

<211> 53

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 26

cgugugaggu aguaaaaaaaa aaacguaaau ccgaagguaa ccaauccuac acg 53

20

<210> 27

<211> 89

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 27

**ggagcucaga cuucacucgu gugagguagu aaaaaaaaaa acguaaaucc gaagguaacc 60**

**aguuccuacac guaccacugu cgguuccac 89**

30 <210> 28

<211> 54

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

5 <400> 28

cgugugaggu aguaaaaaaaa aaaacguaaa uccgaaggua accaguccua cacg 54

<210> 29

<211> 90

10 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

15

<400> 29

ggagcucaga cuucacucgu gugagguagu aaaaaaaaaa aacguaaauc cgaagguaac 60

caauccuaca cguaccacug ucgguuccac 90

<210> 30

20 <211> 55

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400>

cgugugaggu aguaaaaaaaa aaaacguaa auccgaaggu aaccaauccu acacg55

<210> 31

30 <211> 91

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 31

**ggagcucaga cuucacucgu gugagguagu aaaaaaaaaa aaacguaaau ccgaagguaa 60**

**ccaauccuac acguaccacu gucgguucca c' 91**

5 <210> 32

<211> 56

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 32

cgugugaggu aguaaaaaaaa aaaaaacgua aaucggaagg uaaccaaucc uacacg 56

15 <210> 33

<211> 94

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 33

**ggagcucaga cuucacucgu gugagguagu aaaaaaaaaa aaaaaacaua aaucggaagg 60**

**uaaccaaucc uacacguacc acugucgguu ccac 94**

25

<210> 34

<211> 59

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 34

cgugugaggu aguaaaaaaaa aaaaaaaaaac auaaaucgga agguaaccaa uccuacacg 59

<210> 35

<211> 19

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de unión al cebador

10 <400> 35

ggagcucaga cuucacucg 19

<210> 36

<211> 20

15 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de unión al cebador

20

<400> 36

cguaccacug ucgguuccac 20

<210> 37

25 <211> 47

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> B11 truncado

30

<400> 37

cgugugaggc aauaaaacuu aaguccgaag guaaccaauc cuacacg 47

<210> 38

35 <211> 83

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 38

\*\*\*\*\* \*\*  
**ggagcucaga cuucacucgu gcgugagggc agacguaaga ccgaagguaa ccauuccuac** 60

5 **ccacguacca cugucgguuc cac** 83

<210> 39

<211> 83

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

15 <400> 39

\*\*\*\*\* \*\*  
**ggagcucaga cuucacucgu gcgugagggc uaacguaaga ccgaagguaa ccauuccuac** 60

**ccacguacca cugucgguuc cac** 83

<210> 40

<211> 83

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

25

<400> 40

**ggagcucaga cuucacucgu guggugagggc uaacguaaga ccgaagguaa ccauuccuac** 60

**ccacguacca cugucgguuc cac** 83

<210> 41

<211> 81

30 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 41

ggagcucaga cuucacucgu gugagguaau aaaacuaaa cccaagguaa ccaauccuac 60

5 acguaccacu gucgguuca c 81

<210> 42

<211> 83

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 42

ggagcucaga cuucacucgu gcguaccguu auaaagggag uccugcagac ugaugccagg 60

15 ccacguacca cugucgguuc cac 83

<210> 43

<211> 82

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 43

ggagcucaga cuucacucgu gcggugaggo agacguaaga cccaagguaa ccauuccuac 60

25 cacguaccac ugucgguucc ac 82

<210> 44

<211> 82

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 44

**ggagcucaga cuucacucgu gcggugagggc aaacguaaga ccgaagguaa ccauuccuac 60**  
**cacguaccac ugucggguucc ac 82**

5

<210> 45

<211> 82

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 45

**ggagcucaga cuucacucgu gcggugagggc uaacguaaga ccgaagguaa ccauuccuac 60**  
**cacguaccac ugucggguucc ac 82**

210> 46

15 <211> 84

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ácido nucleico de unión a ghrelina

20 <400> 46

**ggagcucaga cuucacucgu gcggugagggc aaaaacguaa gaccgaaggu aaccuuccu 60**  
**accacguacc acugucgguu ccac 84**

<210> 47

<211> 80

25 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 47

	<b>ggagcucaga cuucacucgu gugagguaau aaaacuaaa cccaagguaa ccaauccuaa</b>	<b>60</b>
	<b>cguaccacug ucgguuccac</b>	<b>80</b>
	<210> 48	
	<211> 81	
	<212> ARN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Ácido nucleico de unión a ghrelina	
	<400> 48	
	<b>ggagcucaga cuucacucgu gugaggcagu aaaacuuaag uccgaaggua accaauccua</b>	<b>60</b>
	<b>acguaccacu gucgguucca c</b>	<b>81</b>
10	<210> 49	
	<211> 82	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Ácido nucleico de unión a ghrelina	
	<400> 49	
	<b>ggagcucaga cuucacucgu gugaggcaau uaaacuugaa guccgaaggu aaccaauccu</b>	<b>60</b>
	<b>aacguaccac ugucgguucc ac</b>	<b>82</b>
	<210> 50	
	<211> 83	
20	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Ácido nucleico de unión a ghrelina	
	<400> 50	
	<b>ggagcucaga cuucacucgu gugaggcgau aaaacuugua aguccgaagg uaaccaaucc</b>	<b>60</b>
25	<b>uaacguacca cugucgguuc cac</b>	<b>83</b>
	<210> 51	
	<211> 81	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	

<223> Ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 51

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guuucucaua cgucgccgca 60**

**acguaccacu gucgguucca c 81**

5 <210> 52

<211> 83

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 52

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac cuuucucaua ggucgccgca 60**

**ccacguacca cugucgguuc cac 83**

15

<210> 53

<211> 82

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

25 <221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 53

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac cuuucuaauag gucgccgcac 60**

**cacguaccac ugucgguucc ac 82**

30 <210> 54

<211> 84

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

5

<220>  
 <221> misc\_rasgo  
 <223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

10 <400> 54

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guuucuccau acgucgccgc 60**

**accacguacc acugucgguu ccac 84**

<210> 55  
 <211> 84  
 <212> ARN

15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

20 <220>  
 <221> misc rasgo  
 <223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 55

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guuucuccaa acgucgccgc 60**

**accacguacc acugucgguu ccac 84**

25

<210> 56  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

5 <400> 56

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guucuccaua cgucgccgca 60**

**ccacguacca cugucgguuc cac 83**

<210> 57

<211> 82

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

15 <220>

<221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 57

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac cuuucuccau aggucgccac 60**

**cacguaccac ugucgguucc ac 82**

20

<210> 58

<211> 84

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

30 <221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro <400> 58

	<b>ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guuucucau acgucgccgc</b>	<b>60</b>
	<b>accacguacc acugucgguu ccac</b>	<b>84</b>
	<210> 59	
	<211> 82	
	<212> ARN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico de unión a ghrelina	
10	<220>	
	<221> misc_rasgo	
	<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro	
	<400> 59	
	<b>ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugauucagac guuuccauac gucgccgcac</b>	<b>60</b>
15	<b>cacguaccac ugucgguucc ac</b>	<b>82</b>
	<210> 60	
	<211> 81	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ácido nucleico de unión a ghrelina	
25	<220>	
	<221> misc_rasgo	
	<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro	
	<400> 60	
	<b>ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac cuuucuauagg ucgccgcacc</b>	<b>60</b>
30	<b>acguaccacu gucgguucca c</b>	<b>81</b>
	<210> 61	

<211> 81

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

10

<400> 61

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guuucauacg ucgccgcacc 60**

**acguaccacu gucgguucca c 81**

<210> 62

<211> 80

15 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

20 <220>

<221> misc rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 62

25 **ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guccauacgu cgccgcacca 60**

**cguaccacug ucgguuccac 80**

<210> 63

<211> 85

<212> ARN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 63

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guuuucucca uacgucgccc 60**

**caccacguac cacugucggu uccac 85**

5

<210> 64

<211> 84

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

15

<221> misc rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 64

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guuuuuccau acgucgccc 60**

**accacguacc acugucgguu ccac 84**

20

<210> 65

<211> 82

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

30

<400> 65

**ggagcucaga cuucacucgu gcgcuuucug uuagcugccg accgucagug cggcacgaga** 60  
**uacguaccac ugucgguucc ac** 82

<210> 66  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>  
 10 <221> misc\_rasgo  
 <223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro  
 <400> 66

**ggagcucaga cuucacucgu gcgcuuucug uuagcugcug accgucagug cggcacgaga** 60  
**uacguaccac ugucgguucc ac** 82

<210> 67  
 15 <211> 81  
 <212 > ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

20 <220>  
 <221> misc\_rasgo  
 <223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 67

**ggagcucaga cuucacucgu gcgcuuucug uuagcuccga ccgucagugc ggcacgagau** 60  
**acguaccacu gucgguucca c** 81

25

<210> 68  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

5 <221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 68

```

      -----
      ggagcucaga cuucacucgu gcgcuuucug uuagcucaga ccgucagugc ggcacgagau      60
      acguaccacu gucgguucca c                                                    81
  
```

10

<210> 69

<211> 80

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc\_rasgo

20

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 69

```

      ggagcucaga cuucacucgu gcgcuuuugu uagcucagac ccgucagugc gcacgagau      60
      cguaccacug ucgguuccac                                                    80
  
```

25

<210> 70

<211> 77

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 70

**ggagcucaga cuucacucgu gcgcuuucua gcucuuaacc gaccgugcgg cacgagacgu 60**

**accacugucg guuccac 77**

<210> 71

<211> 82

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

15 20 <221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 71

**ggagcucaga cuucacucgu gugccgccc uauugucagg gagcuugagc cgacacugcg 60**

**gacguaccac ugucgguucc ac 82**

20

<210> 72

<211> 83

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

30 <221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 72

ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guuucucaua cgucgccgca 60  
 ccacguacca cugucgguuc cac 83

<210> 73

<211> 83

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

10

<220>

<221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 73

ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guuucucaaa cgucgccgca 60  
 ccacguacca cugucgguuc cac 83

15

<210> 74

<211> 82

<212> ARN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

25

<220>

<221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 74

ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guuuccauac gucgccgcac 60  
 cacguaccac ugucgguucc ac 82

30

<210> 75  
 <211> 79  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina  
  
 <220>  
 10 <221> misc\_rasgo  
 <223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro  
  
 <400> 75  
     **ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guucauguc gccgcaccac**      60  
     **guaccacugu cgguuccac**      79  
 15 <210> 76  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina  
 <220>  
 <221> misc\_rasgo  
 <223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro  
 25  
 <400> 76  
     **ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guucauacg ucgccgcacc**      60  
     **acguaccacu gucgguucca c**      81  
  
 <210> 77  
 30 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc rasgo

5 <223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 77

ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guuucacuacg ucgccgcacc 60

acguaccacu gucgggucca c 81

10 <210> 78

<211> 80

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

20

<400> 78 -

ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guccauacgu cgccgcacca . . . 60

cguaccacug ucggguccac 80

25 <210> 79

<211> 82

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro <400> 79

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac cuuuccauag gucgcccgcac 60**  
**cacguaccac ugucgguucc ac 82**

<210> 80

<211> 83

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

10

<220>

<221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

15 <400> 80

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac cuuucucaua ggucgcccga 60**  
**ccacguacca cugucgguuc cac 83**

<210> 81

<211> 84

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

25

<220>

<221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

30 <400> 81

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac guuucuccau acgucgcccgc 60**  
**accacguacc acugucgguu ccac 84**

<210> 82

<211> 84

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc\_rasgo

10 <223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 82

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucaggc cuuucuucau aggucgccgc 60**

**accacguacc acugucgguu ccac - 84**

<210> 83

15 <211> 82

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

25

<400> 83

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacccagac guuuucauac gucgccgcac 60**

**cacguaccac ugucgguucc ac 82**

<210> 84

<211> 83

30 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc\_rasgo

5 <223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 84

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac cuuuuucuaa ggucgccgca 60**

**ccacguacca cugucgguuc cac 83**

10 <210> 85

<211> 83

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

<221> misc\_rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

20

<400> 85

**ggagcucaga cuucacucgu ggaauaggaa ugacucagac cuuuuucuaa ggucgccgca 60**

**ccacguacca cugucgguuc cac 83**

<210> 86

<211> 82

25 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

30 <220>

<221> misc rasgo

<223> pirimidinas modificadas con 2'-Fluoro

<400> 86

ggagcucaga cuucacucgu ggcuuucug uuagcugccg accgucagug cggcacgaga 60  
 uacguaccac ugucgguucc ac 82

<210> 87

<211> 49

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 87

10 ggugggugag gcaguaaugu aaguccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

<210> 88 <211> 43

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 88

gggugaggca gaauguaag uccgaaggua accaauccua ccc 43

20 <210> 89

<211> 43 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 89

gggugaggca gacacguaag accgaaggua accaauccua ccc 43

30 <210> 90

<211> 49

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 90

ggugggugag gcagcuaugu aaguccgaag gaaaccauc cuaccacc 49

5

<210> 91

<211> 43

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 91

gggugaggca gcuauguaag uccgaaggua accaauccua ccc 43

15

<210> 92

<211> 43

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 92

gggugaggca ugcaaguaag uccgaaggua cccaauccua ccc 43

25

<210> 93

<211> 43

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 93

35 gggugaggca guuauguaag accgaaggua cccaauccua ccc 43

<210> 94

<211> 49

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 94

gguggugag gcacaccgau aaguccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

10

<210> 95

<211> 43

<212> ARN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 95

20 gggugaggca cacccauaag uccgaaggua accaauccua ccc 43

<210> 96

<211> 43 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 96

gggugaggca auccgauaag uccgaaggua accaauccua ccc 43

30

<210> 97

<211> 43

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 97

gggugaggca guaaaguaag accgaaggua accaauccua ccc 43

5 <210> 98

<211> 43

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 98

gggugaggca guucaguaag uccgaaggua accaauccua ccc 43

15

<210> 99

<211> 43

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 99

25 gggugaggcg uacaaauaag uccgaaggua accaguccua ccc 43

<210> 100

<211> 43

<212> ARN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

35 <400> 100

gggugaggca cacaaauaag uccgaaggua uccaguccua ccc 43

<210> 101

<211> 49

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<220>

10 <221> misc\_rasgo

<222> (1).. (1)

<223> Cebador

<400> 101

15 ggugggugag gcacaccgu aaguccgaag gaaaccaauc cuaccacc 49

<210> 102

<211> 49

<212> ARN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

25 <400> 102

ggugggugag gcauaaacgu aagaccgaag gaaaccaauc cuaccacc 49

<210> 103

<211> 49

30 <212 > ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

35

<400> 103

ggugggugag gcaguuaugu aagaccgaag guaccaauc cuaccacc 49

<210> 104

<211> 49 <212> ARN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

10 <400> 104

ggugggugag gcagucuugu aaguccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

<210> 105

<211> 49

<212> ARN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 105

20 ggugggugag gcauaaacgu aagaccgaag guaaccaauc cuaccgcc 49

<210> 106

<211> 49

<212> ARN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

30 <400> 106

ggugggugag gcaaugucgu aaguccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

<210> 107

<211> 49

35 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 107

5 ggugggugag gcacuaaaau aagaccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

<210> 108

<211> 49

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

15 <400> 108

ggugggugag gcacgcaau aagaccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

<210> 109

<211> 49

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

25

<400> 109

ggugggugag gcguacau aaguccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

<210> 110

30 <211> 49

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 110

ggugggugag gcaguaaagu aaguccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

<210>111

<211> 49

5 <212 > ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

10

<400>111

ggugggugag gcaauuaagu aaguccgaag guaaccaguc cuaccacc 49

<210> 112

15 <211> 49

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 112

ggugggugag gcaugcaagu aaguccgaag guaccaauc cuaccacc 49

<210> 113

25 <211> 49

30 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 113

ggugggugag gcauuuacgu aaguccgaag guaaccaauc cuaccuacc 49

<210> 114

35 <211> 49

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

5 <400> 114

ggugggugag gcacacaaau aaguccgaag guauccaguc cuaccacc 49

<210> 115

<211> 49

10 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

15

<400> 115

ggugggugag gcagacacgu aagaccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

<210> 116

20 <211> 49

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 116

ggugggugag gcacacccau aaguccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

<210> 117

30 <211> 49

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 117

ggugggugag gcguacaaau aaguccgaag guaaccaguc cuaccuacc 49

<210>118

<211> 49

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

10 <400> 118

ggugggugag gcaauaaagu aagaccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

<210> 119

<211> 49

15 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

20

<400> 119

ggugggugag gcagcuaugu aaguccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

<210> 120

25 <211> 49

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 120

ggugggugag gcaauccgau aaguccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

35 <210> 121

<211> 49

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

5

<400> 121

ggugggugag gcaguaaagu aagaccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

<210> 122

10 <211> 49

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 122

ggugggugag gcauacaagu aaguccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

20 <210> 123

<211> 49

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 123

ggugggugag gcaguucagu aaguccgaag guaaccaauc cuaccacc 49

30

<210> 124

<211> 49

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 124

ggugggugag gcaguaaaau aaguccgaag gUAUCCAUC CUACCCACC 49

<210> 125

5 <211> 60

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> ácido nucleico de unión a ghrelina

<400> 125

ggugggugag gcaaucuggu gaggcagaug uaagaccgaa gguaaccaau ccuacccacc 60

15

## REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que se une a ghrelina y que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de acuerdo con SEQ. ID. No. 7 a SEQ. ID. No.125.
- 5 2. Un ácido nucleico que consiste en una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de acuerdo con las SEQ. ID. No. 7 a SEQ. ID. No. 125.
3. Un antagonista de ghrelina, en el que el antagonista es un ácido nucleico, y a través del cual el ácido nucleico se une a la ghrelina y el ácido nucleico comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de acuerdo con las SEQ. ID. No.7 a SEQ. ID. No.125.
- 10 4. Un antagonista de ghrelina, en el que el antagonista es un ácido nucleico que consiste en una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de acuerdo con las SEQ. ID. No. 7 a SEQ. ID. No. 125.
5. Un antagonista del sistema receptor de GHSR 1a, en el que el antagonista es un ácido nucleico, y por el cual el ácido nucleico se une al ligando del receptor y por el cual el ligando es ghrelina y el ácido nucleico comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de acuerdo con SEQ. ID. No.7 a SEQ. ID. No.125.
- 15 6. Un antagonista del sistema receptor de GHSR 1a, en el que el antagonista es un ácido nucleico que consiste en una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en SEQ. ID. No. 7 a SEQ. ID. No. 125.
7. El antagonista de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el ácido nucleico se une al ligando del receptor.
8. El antagonista de acuerdo con la reivindicación 7, en e que el ligando es ghrelina.
- 20 9. El ácido nucleico o antagonista de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 8, en el que el ácido nucleico comprende al menos un nucleótido L.
10. El ácido nucleico o antagonista de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el antagonista es un ácido nucleico L.
11. El ácido nucleico o antagonista de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el ácido nucleico comprende al menos un nucleótido L.
- 25 12. El ácido nucleico o antagonista de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el ácido nucleico es un ácido nucleico L.
13. El ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende ADN, ARN y sus combinaciones.
- 30 14. El ácido nucleico o antagonista de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la Kd del ácido nucleico es menor de 1  $\mu\text{M}$ , preferiblemente menor que 0,25  $\mu\text{M}$ , más preferiblemente menor que 0,1  $\mu\text{M}$  y con máxima preferencia menor que 0,01  $\mu\text{M}$ .
15. El ácido nucleico o antagonista de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la Kd del ácido nucleico es mayor que 100 nM, preferiblemente mayor que 10 nM, más preferiblemente mayor que 1 nM y con máxima preferencia mayor que 0.05 nM.
- 35 16. El ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el ácido nucleico es una longitud seleccionada del grupo que comprende 15 a 150 nucleótidos, 20 a 100 nucleótidos, 20 a 80 nucleótidos, 20 a 60 nucleótidos, 20 a 50 nucleótidos y 30 a 50 nucleótidos.
17. Uso de un ácido nucleico y/o de un antagonista de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la fabricación del medicamento.
- 40 18. Use de acuerdo con la reivindicación 17 caracterizado porque el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que comprende obesidad, la regulación del balance energético, apetito y peso corporal, trastornos alimenticios, diabetes, metabolismo de glucosa, tumor, presión arterial y enfermedades cardiovasculares.
- 45 19. Un composición que comprende un ácido nucleico y/o un antagonista de de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y un portador farmacéuticamente aceptable.
20. Un complejo que comprende ghrelina y cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
21. El complejo de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el complejo es un complejo cristalino.

22. Uso de cualquiera de los ácidos nucleicos y/o de un antagonista de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la detección de ghrelina.

23. Kit para la detección de ghrelina, que comprende un ácido nucleico y/o un antagonista de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

	1. ronda	2. ronda	3. ronda	4. ronda	5. ronda	6. ronda	7. ronda	8. ronda	9. ronda	10. ronda	11. prueba de unión ronda	CR (1) . 12. ronda	DR (1)	prueba de unión	CR (2) 13. ronda	DR (2)	prueba de unión	CR (3) 14. ronda	DR (3)	
matriz	NA	NA	UL	UL	NA	NA	UL	UL	NA	NA	UL	UL	UL	UL	UL	UL	UL	UL	UL	UL
C																				
[ghrelina]																				
3pM												1218								
1pM	34	48					440													
500nM			3												725					
250nM			3	2	25	57														
100nM						13	50													
50nM							31	9.5	39								362			
25nM								2.5	15	74	27									
10nM																				

Fig 1 Tabla 1 A relación señal/ruido para la selección de ARN para los aptámeros de unión a ghrelina D

Abreviaturas:

NA - agarosa neutraavidina

UL - estreptavidina ultralink

CR - ronda de recolección

DR - doble ronda (ronda de selección sin amplificación con ARN de CR)



	ronda <b>1</b>	ronda <b>2-5</b>	ronda <b>6-11/12</b>	rondas de recolección
<b>RNA</b>	<b>6nmol</b>	<b>1nmol</b>	<b>500pmol</b>	<b>1000pmol</b>
<b>2'F-RNA</b>	<b>3nmol</b>	<b>1nmol</b>	<b>500pmol</b>	<b>1000pmol</b>

Fig 3 cantidad de ARN/2'F-ARN usado en el proceso de selección

Fig 3

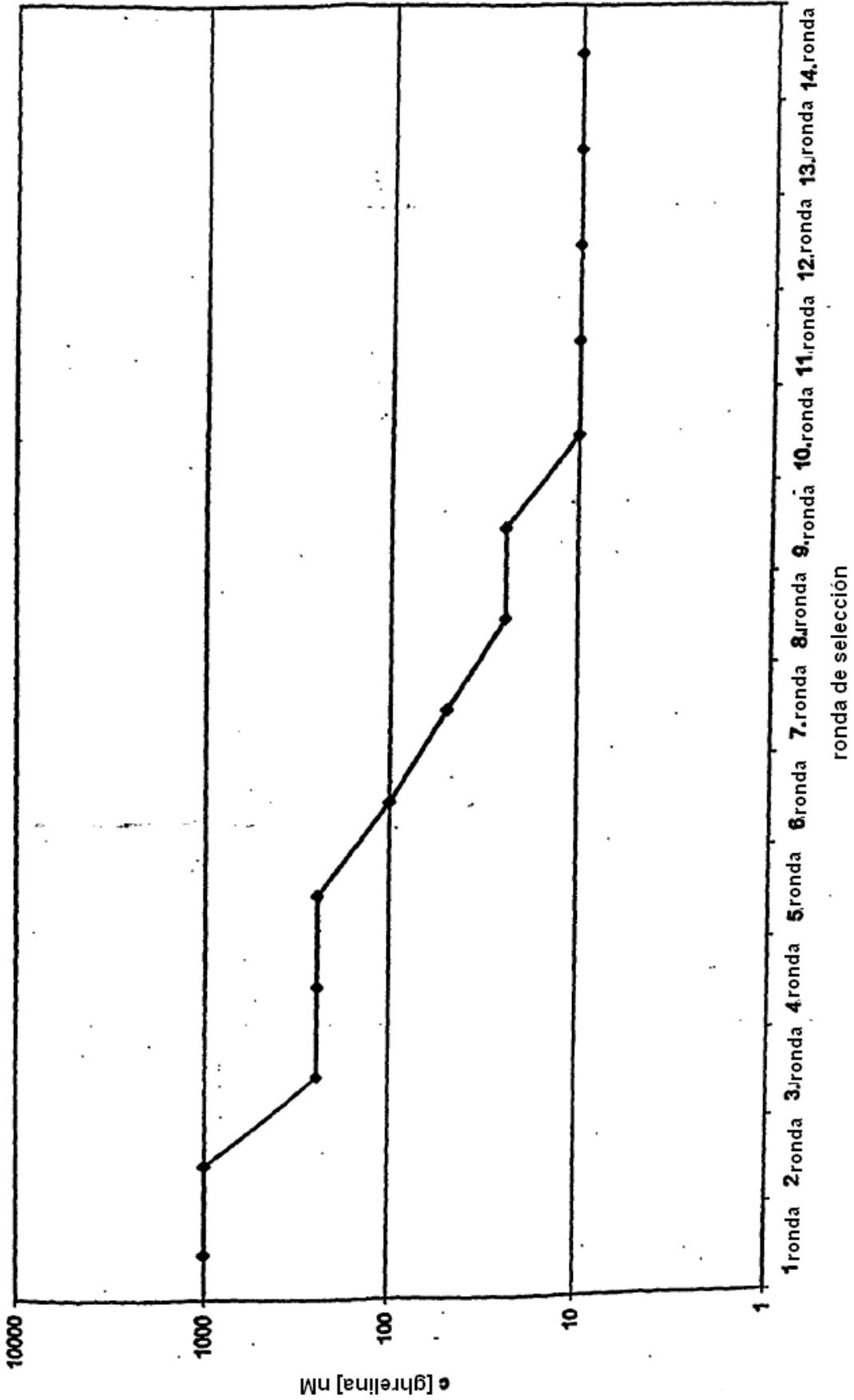


Figura 4A: curso de la concentración de péptido de ghrelina para la selección de ARN

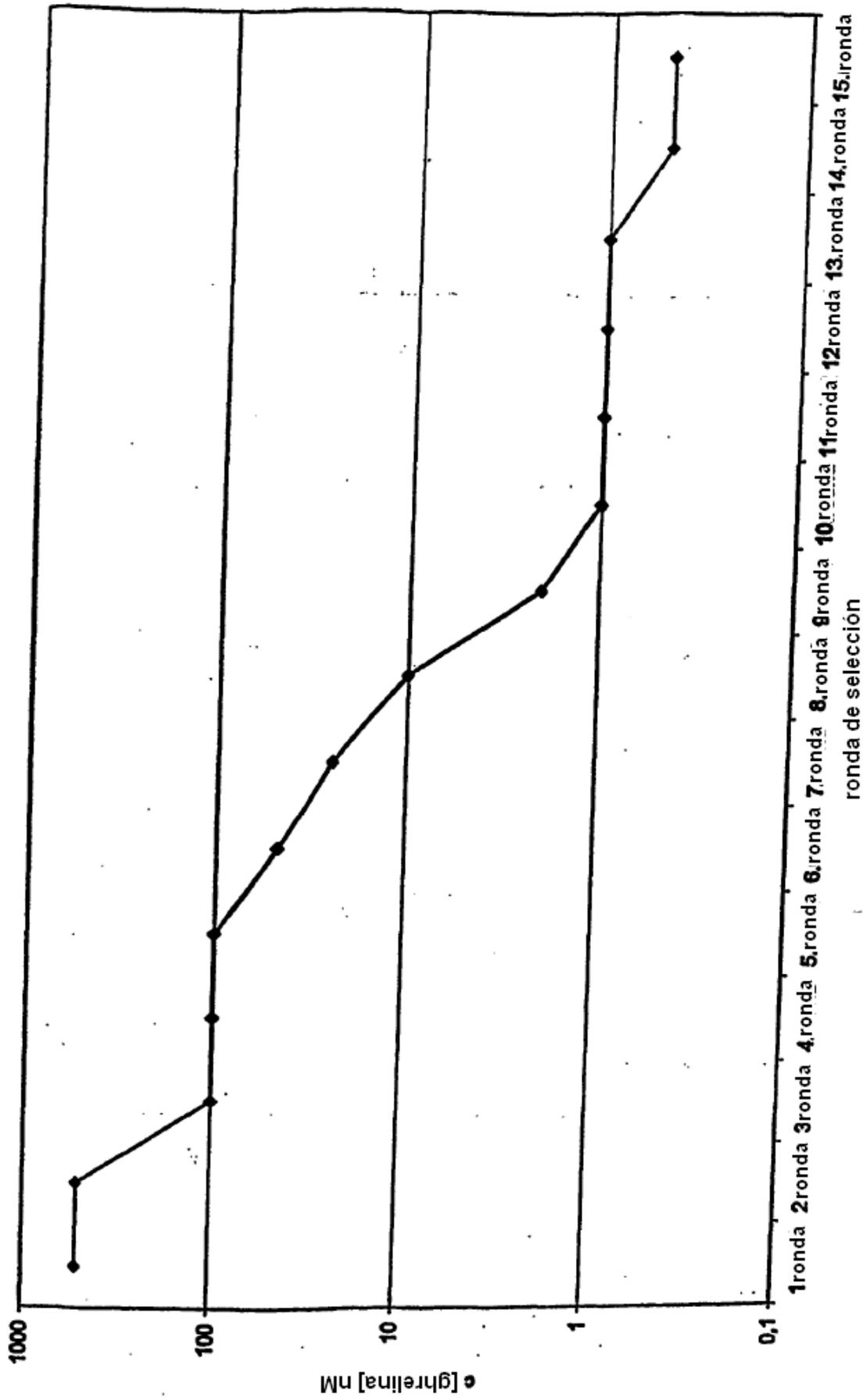


Figura 4B: curso de la concentración de péptido de ghrelina para la selección de 2'-F-ARN

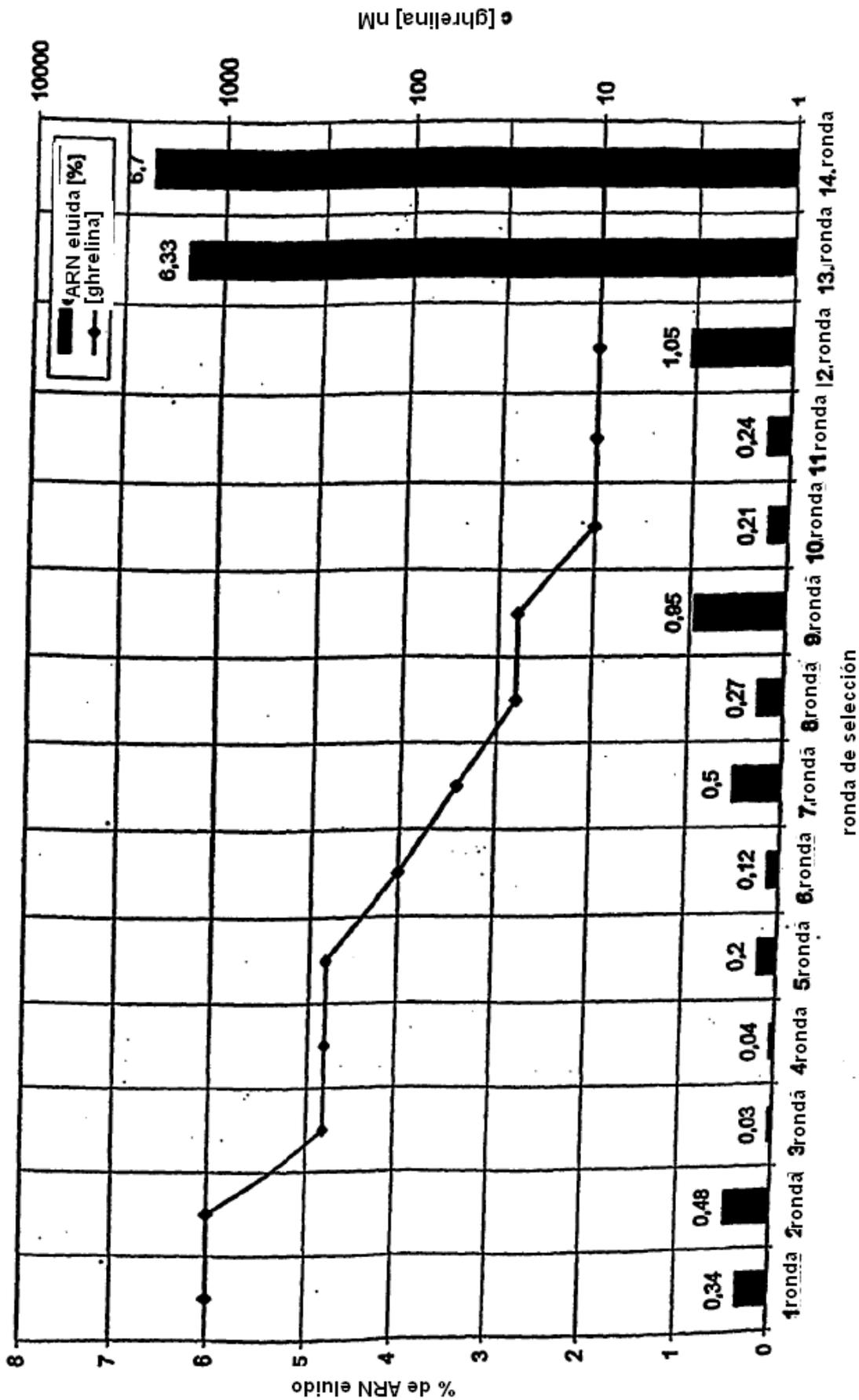


Fig 5: Curso de ARN eluido en por ciento de ARN usado total y concentración del péptido

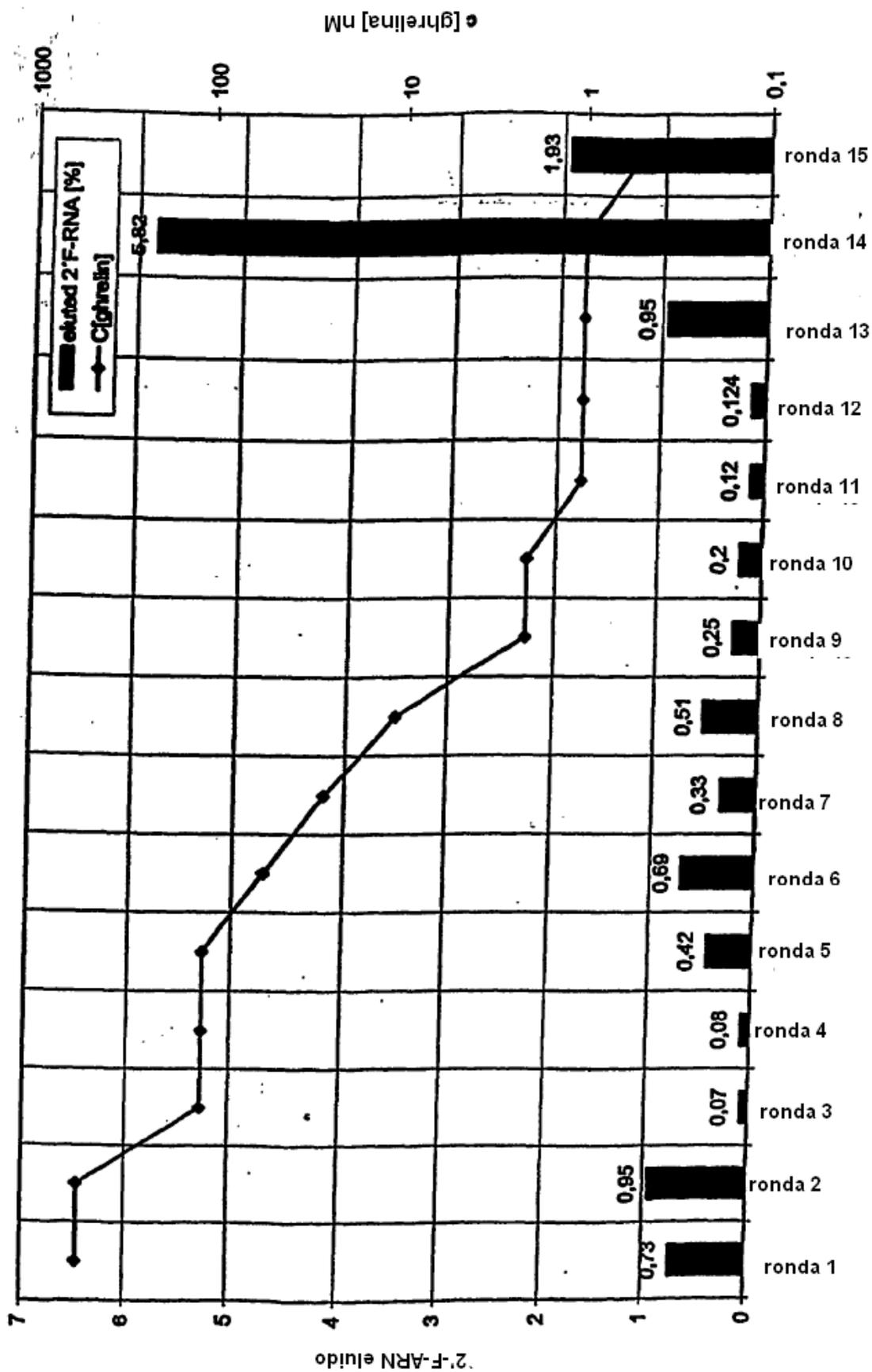


Fig 6: Curso de 2'-F-ARN eluido en por ciento de 2'-F-ARN usado total y concentración del péptido

	prueba para unión	CR (1)	DR (1)	prueba para unión	SCR (2)	DR (2)	prueba para unión	CR (3)	DR (3)
1 Ronda	12	12	12	13	13	13	14	14	14
C									
[ghrelina]									
3µM		31,6							
1µM	22,6			32,5	14,5		53,8		
300nM	4,98			15,6			35,7	25,3	
100nM	0,78			7,9			28,2		
30nM	0,15			3,1			9,9		
10nM	0,13		1,05	1,55		6,33*	3,5		6,7*

Fig 7A. Tabla 3: rondas dobles y ensayos de unión realizado desde la ronda 12 a 10 para la selección de ARN, los datos de por ciento de unión a ghrelina D, \* secuenciado

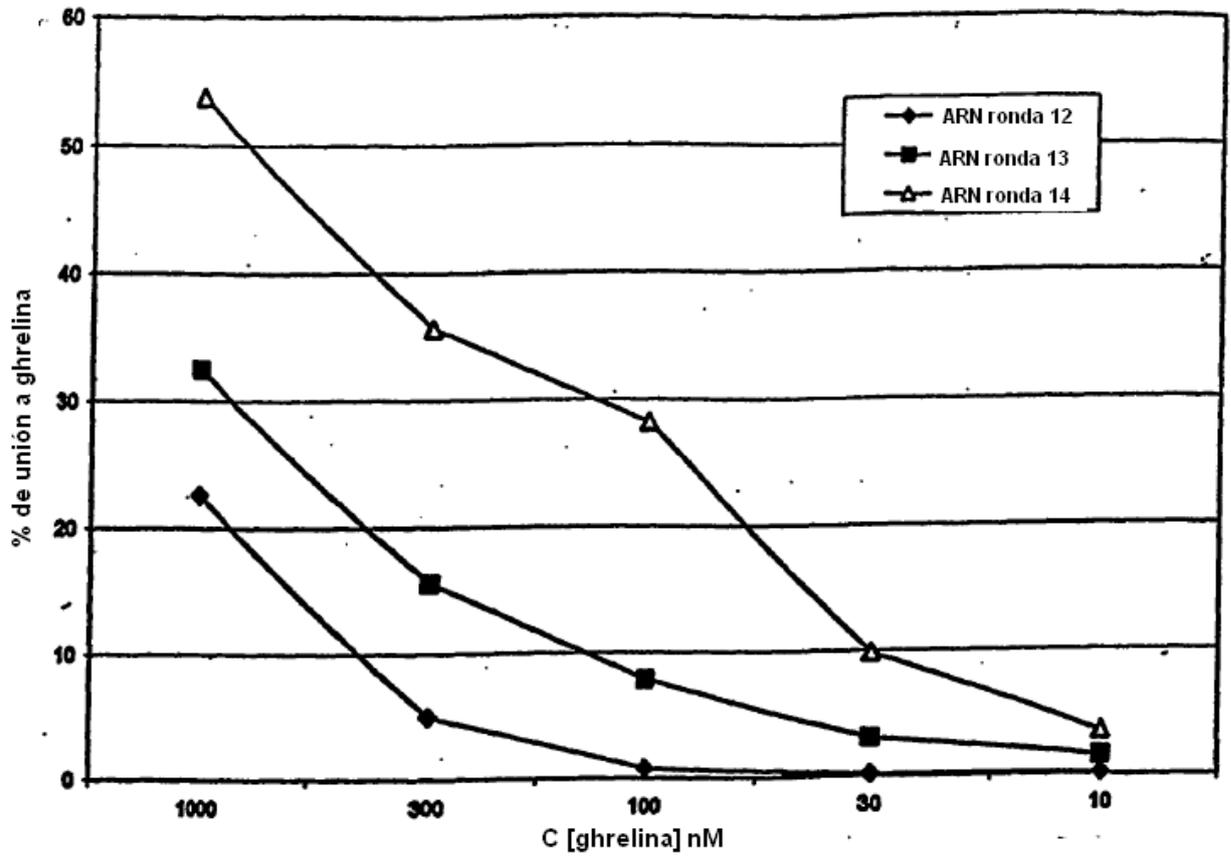


Fig 7B. Aumento de la mezcla de ARN de unión a ghrelina D controlada durante las rondas doble

	prueba para unión	CR (1)	DR (1)	prueba para unión	CR(2)	DR (2)	prueba para unión	CR (3)	DR (3)
Ronda	13	13	13	14	14	14	15	15	15
<b>C</b>									
[ghrelina]									
3µM	42,4	31,4							
1µM	28,8			45	28,7		32,7	19,6	
300nM	16,5			35,2			26,5		
100nM	8,49			29			18,1		
30nM	3,76			9,4			9,1		
10nM	0,72			3,9			1,7		
1nM			0,95				5,82*		5,75
500pM			0,43				0,75		1,93*

Fig 8A. Tabla 4: rondas dobles y ensayos de unión realizados desde la ronda 13 a 15 para la selección de 2'-F-ARN;

datos en por ciento de unión a D-ghrelina, \* secuenciado

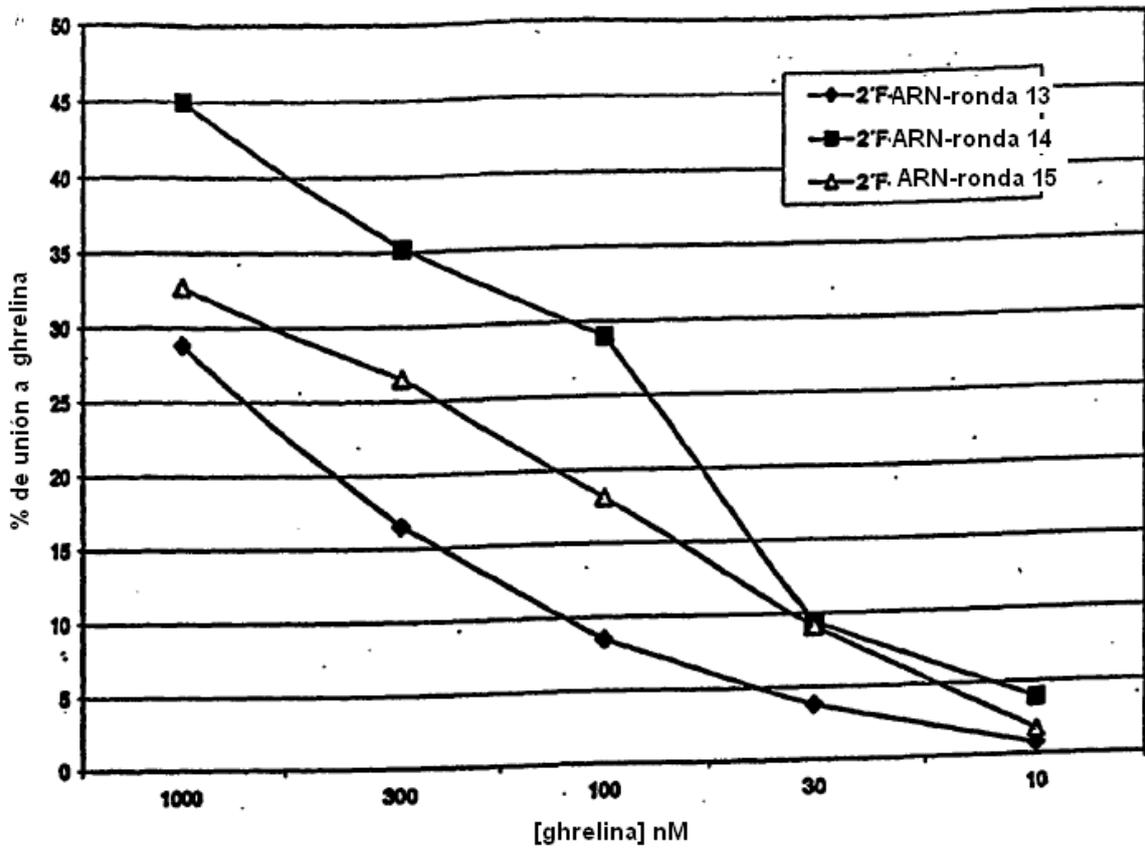
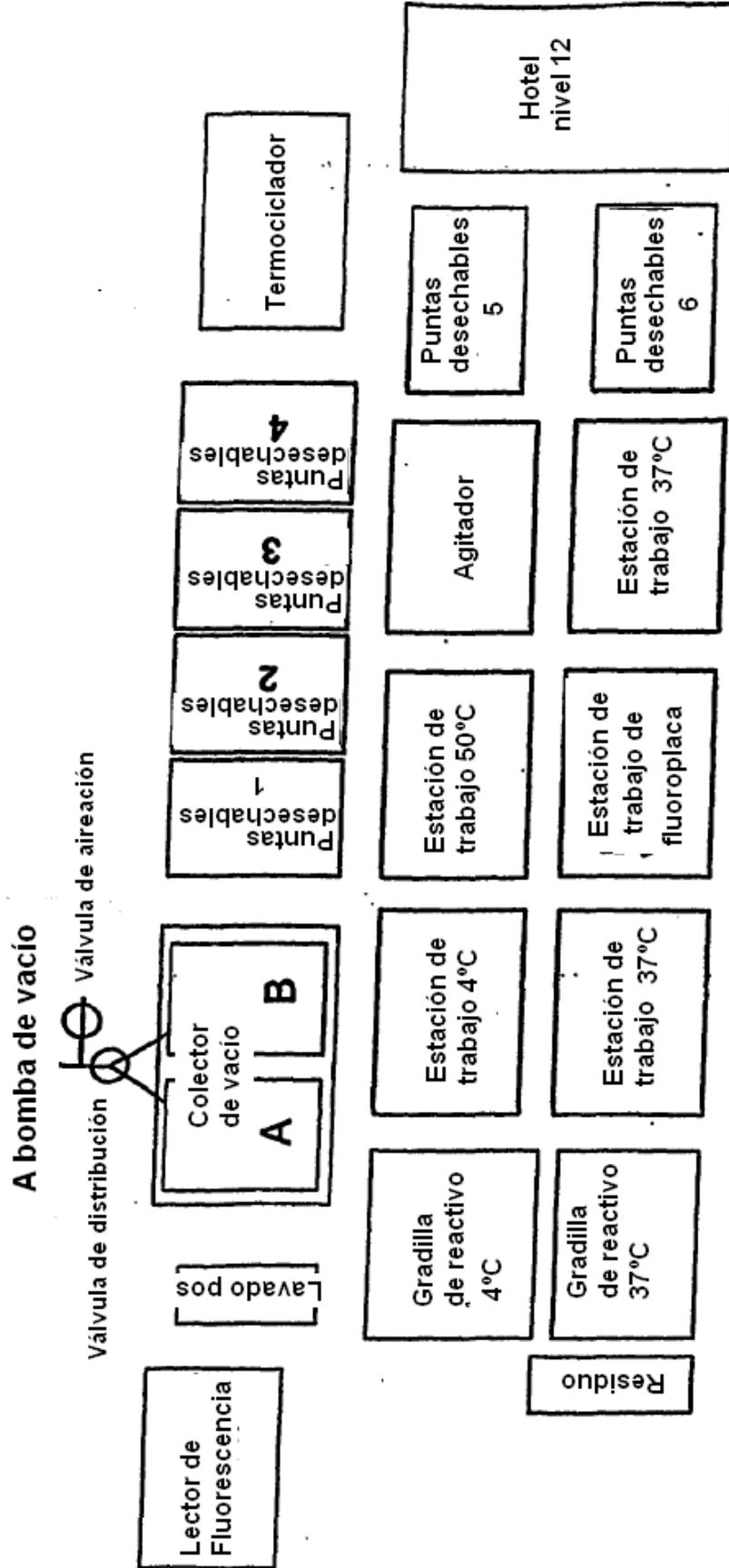


Fig 8B. Aumento de la mezcla de 2'-F-ARN de unión a ghrelina D controlada durante las rondas doble

Selección in vitro automatizada contra Ghrelina de rata

Ronda No.	A	B	C	Vacio	Comentarios
1	1 $\mu$ M				ronda manual
2	1 $\mu$ M				ronda manual
3	5 W	10 W	15 W	vacio 5 W	volumen de lavado: 90 $\mu$ l por lavado (W) [D-Ghrelina]= 500 nM
4	5 W	10 W	15 W	vacio 5 W	
5	500 nM	167 nM	56 nM	vacio	15 lavados de la ronda 5
6	500 nM	167 nM	56 nM	vacio	
7	500 nM	167 nM	56 nM	vacio	
8	500 nM	167 nM	56 nM	vacio	
9	167 nM	56 nM	19 nM	vacio	
10	167 nM	56 nM	19 nM	vacio	
11	167 nM	56 nM	19 nM	vacio	
12	56 nM	19 nM	6.2 nM	vacio	
13	56 nM	19 nM	6.2 nM	vacio	
14	56 nM	19 nM	6.2 nM	vacio	
15	56 nM	19 nM	6.2 nM	vacio	
16	19 nM	6.2 nM	2.1 nM	vacio	
17	19 nM	6.2 nM	2.1 nM	vacio	
18	6.2 nM	2.1 nM	0.7 nM	vacio	
19	6.2 nM	2.1 nM	0.7 nM	vacio	

Superficie de trabajo del robot para la selección in vitro de ARN automatizada



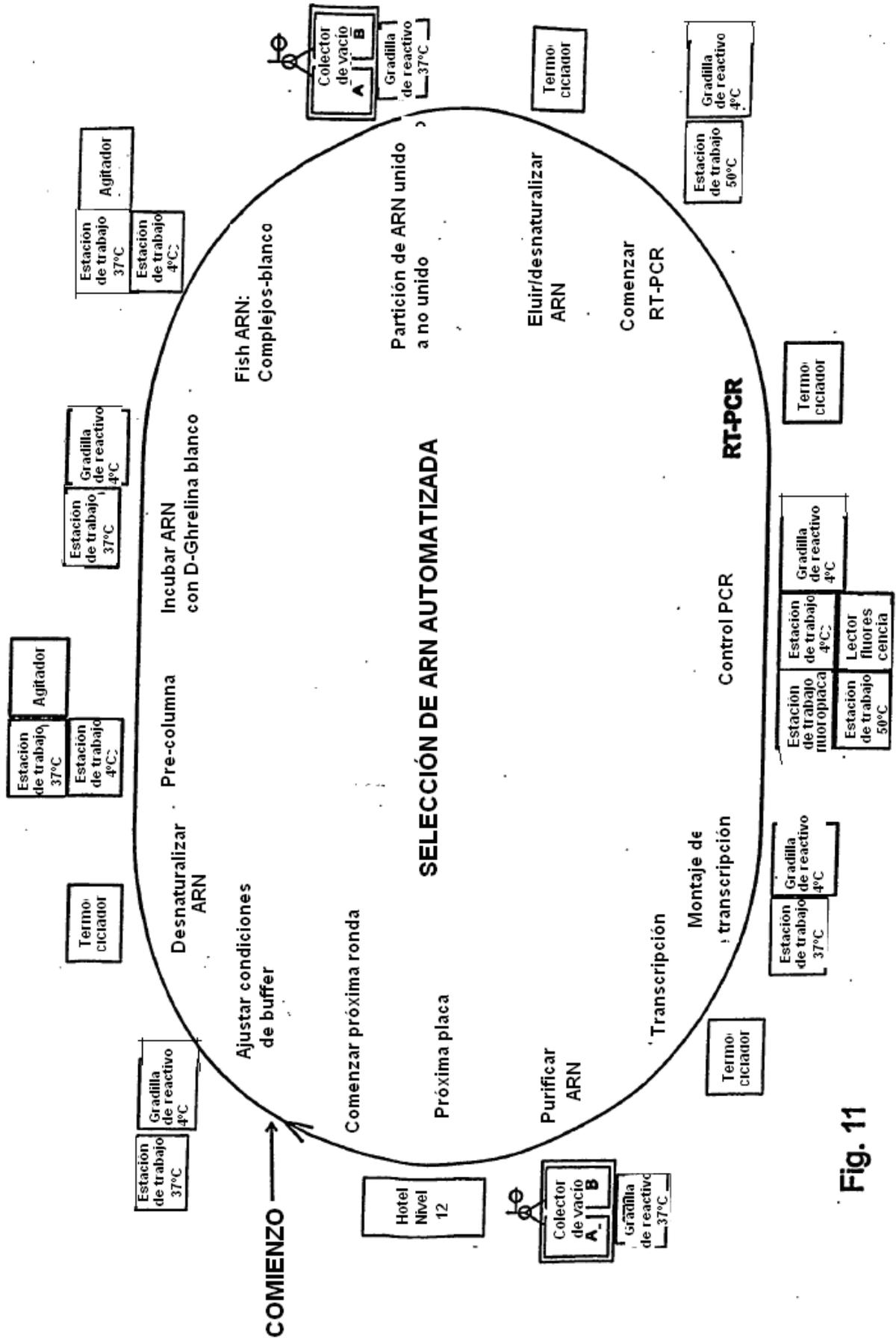


Fig. 11

Tabla 5

Posición en la Fig 13	Identificador	Aparición total	Aparición en ronda 17	Aparición en ronda 19
1	B11	65	35	30
7	E3	5		5
13	F12	2	1	1
4	B7	2		2
5	A8	2		2
9	C11	2		2
10	A3	2	2	
15	G5	1	1	
11	F5	1	1	
2	G2	1	1	
6	B12	1		1
12	A12	1		1
3	E12	1		1
8	C12	1		1

Secuencias de la cadena (+)  
formas completas:

GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAAU-----AAAACU--UAAGUCCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC B11  
GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAU-----AAAACU--UAAGUCCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC G2  
GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAAU-----AAAACU--UAAGUCCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC E12  
GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAAU-----AAAACA--UAAGUCCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC B7  
GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAAU-----AAAACG--UAAGUCCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC A8  
GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAAU-----AAAACUUGUAAGUCCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC B12  
GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAAU-----AAAACU--UAAGUCCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC E3  
GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAAU-----AAAAC--GUAAGACCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC C12  
GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAAU-----AAAAC--GUAAGUCCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC C11  
GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAAU-----AAAAC--GUAAGUCCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC A3  
GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAAU-----AAAAC--GUAAGUCCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC F5  
GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAAU-----AAAAC--GUAAGUCCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC A12  
GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAAU-----AAAAC--GUAAGUCCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC F12  
GGAGCUCAGACUUCACUCUGUGUG---AGGCAAU-----AAAAC--GUAAGUCCGAAAGGUAA CCAAUCCUAC--ACGUACCACUCUGCGGUUCCAC G5

CGUACCACUCUGCGGUUCCAC  
DE.40F-icebador (rev, sub com)

Residuos del cebador subrayados y en negrita

GGAGCUCAGACUUCACUCG  
DE.40F-icebador

formas del núcleo :

CGUGAGGCCAAUAAACUUUAGUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG  
 CGUGAGGCCAGUAAACUUUAGUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG  
 CGUGAGGCCAAUAAACUUUAGUCCGAAGGUAAACCAUCCUGCACG  
 CGUGAGGCCAAUAAACAUUAGUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG  
 CGUGAGGCCAAUAAACGUUAGUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG  
 CGUGAGGCCAAUAAACUUGUAGUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG  
 CGUGAGGCCAAUAAACUUUAGUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG  
 CGUGCGGUGAGGCCAAACGUUAGUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG  
 CGUGAGGUAGUAAACGUUAAUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG  
 CGUGAGGUAGUAAACGUUAAUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG  
 CGUGAGGUAGUAAACGUUAAUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG  
 CGUGAGGUAGUAAACGUUAAUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG  
 CGUGAGGUAGUAAACGUUAAUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG  
 CGUGAGGUAGUAAACGUUAAUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG  
 CGUGAGGUAGUAAACGUUAAUCCGAAGGUAAACCAUCCUACACG

Fig. 13 -2

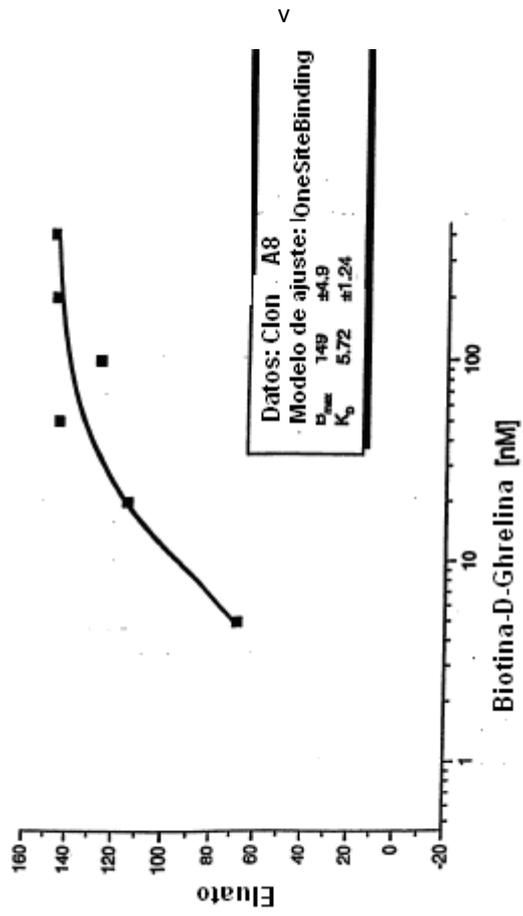


Fig. 14 A.

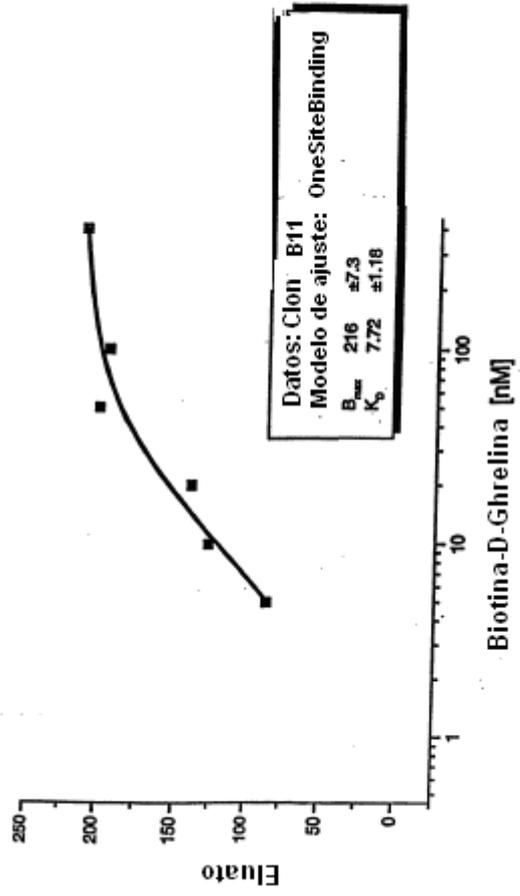


Fig. 14 B

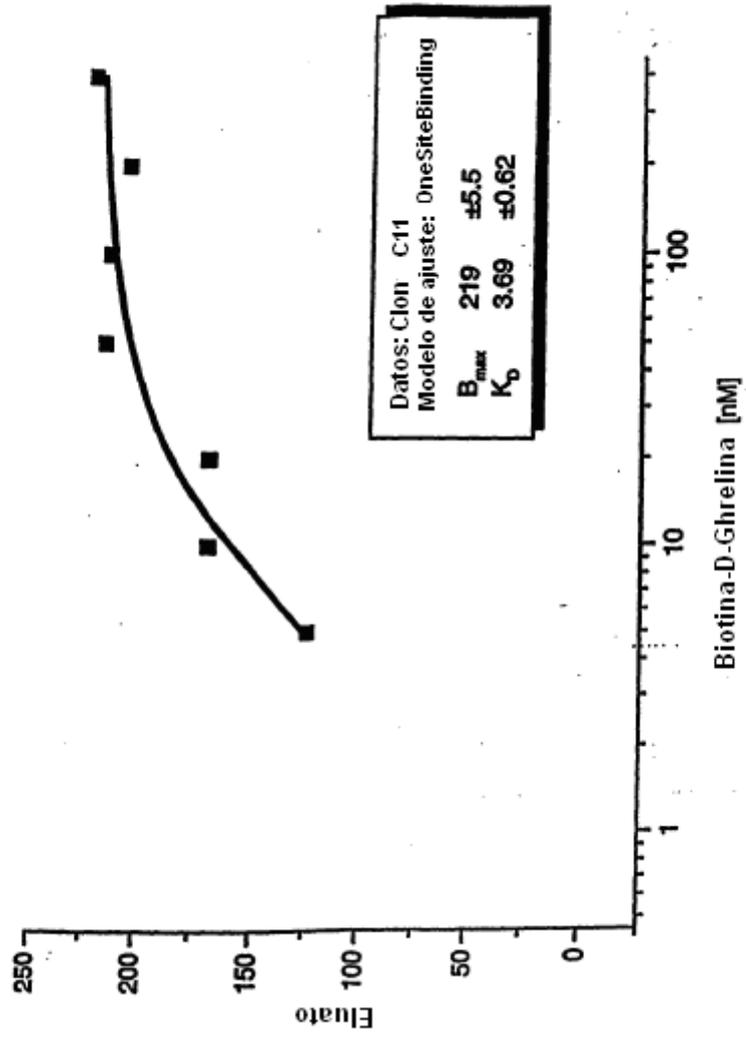
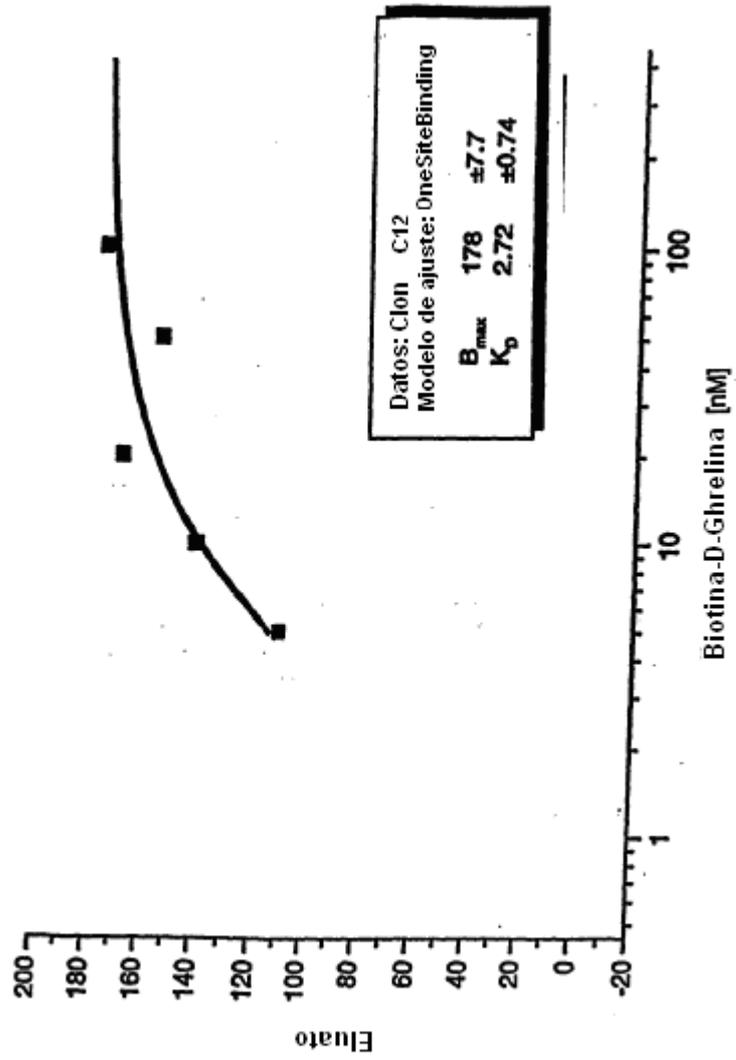


Fig. 14 C



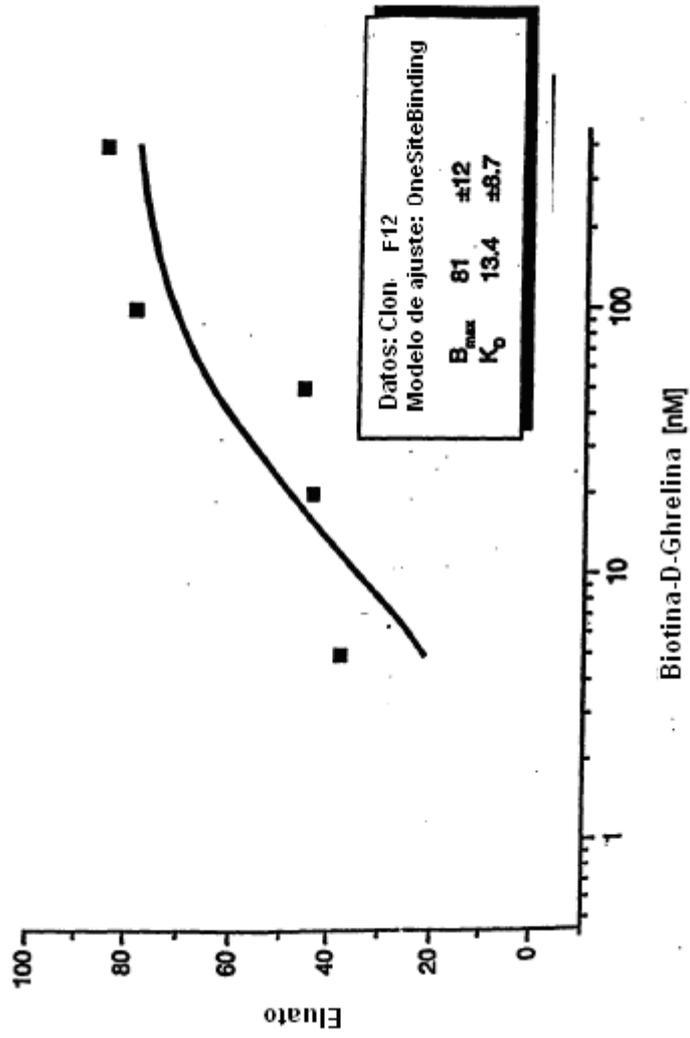


Fig. 14 E

## Clon B11

[D-Ghrelin] en nM % de ARN unido

0	0
3	2
10	8
30	35
100	62
300	76
1000	75
3000	83

## Clon F12

[D-Ghrelin] en nM % de ARN unido

0	0
3	3
10	10
30	29
100	48
300	64
1000	91
3000	88

## Clon E3

[D-Ghrelin] en nM % de ARN unido

0	0
3	1
10	5
30	20
100	54
300	65
1000	89
3000	85

Fig. 15

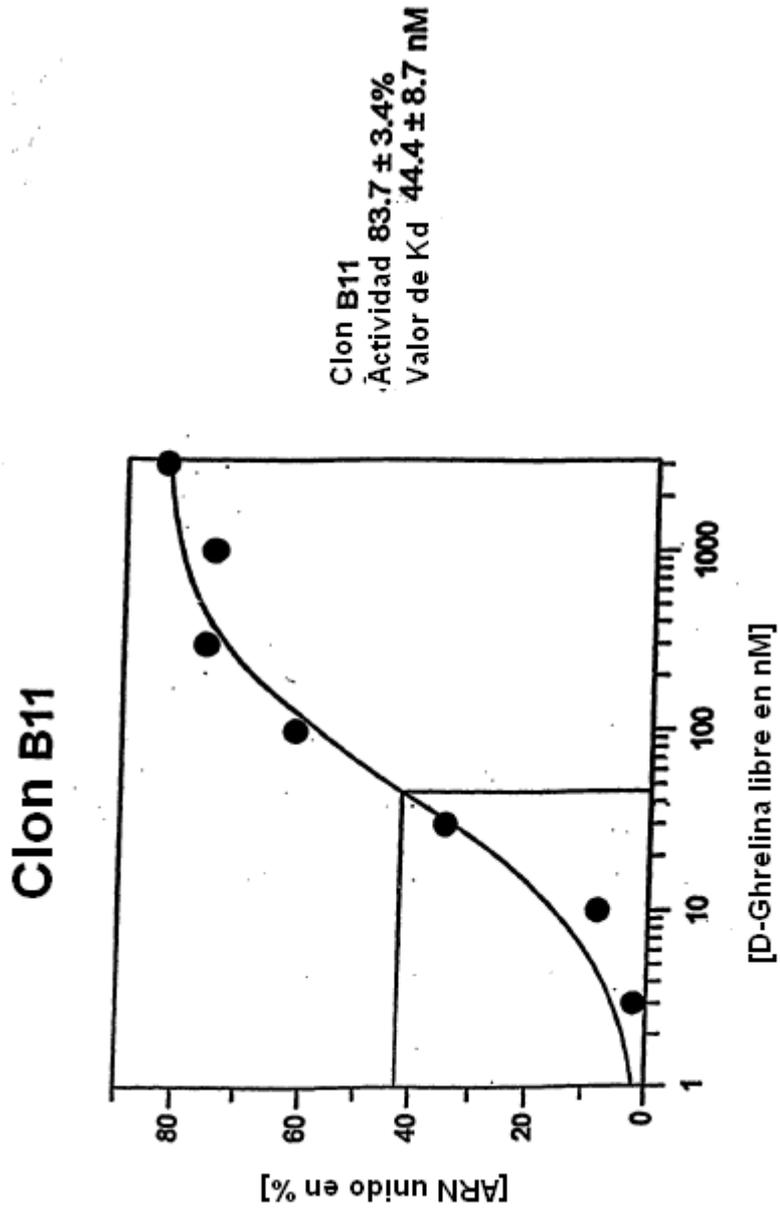


Fig. 16 A

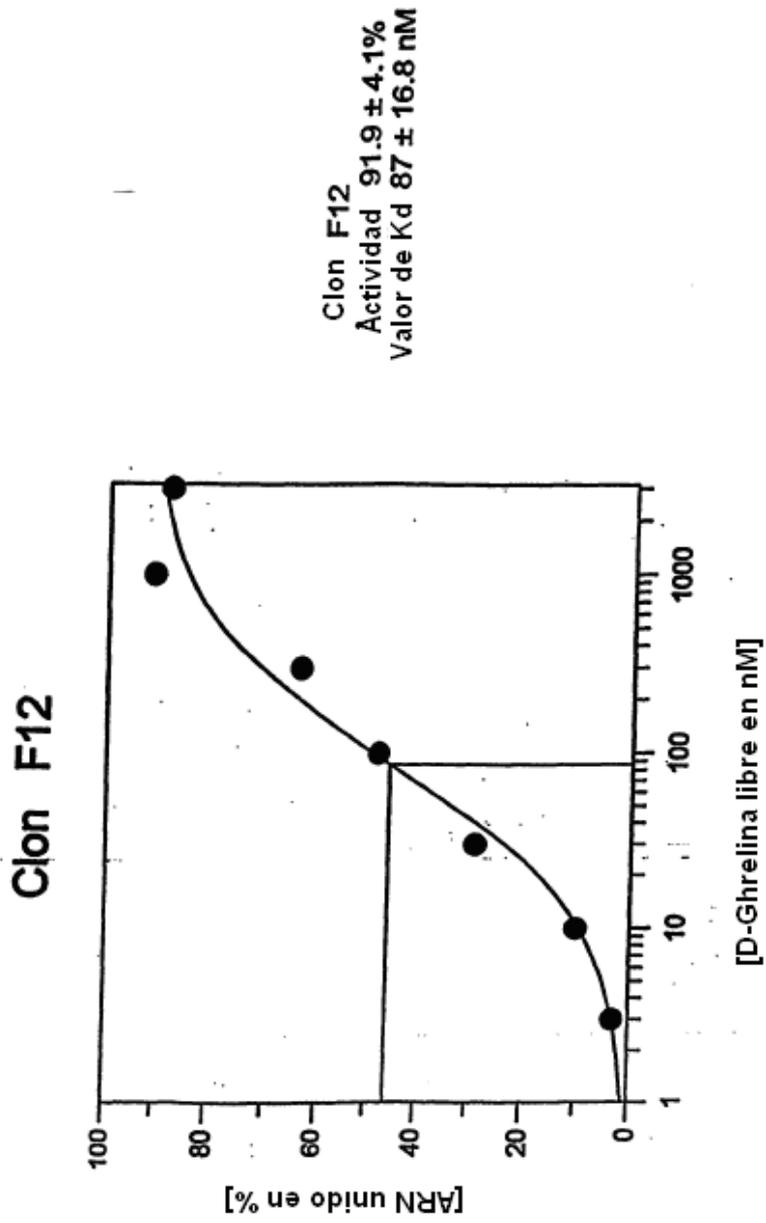


Fig. 16 B

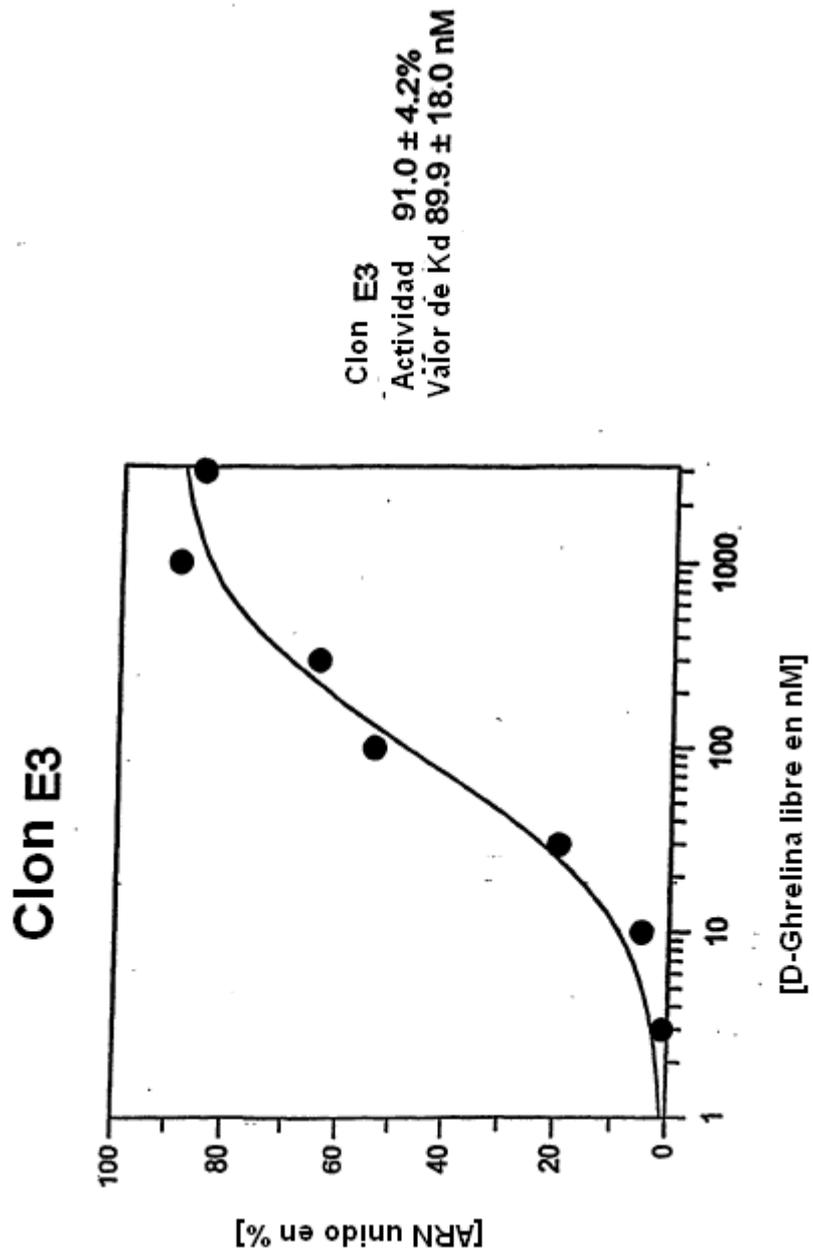


Fig. 16 C

Tabla 7

Clon	K <sub>D</sub> [nM]
A3	203
A8	98
A12	237
B7	139
B11	205
B12	135
C11	135
C12	17
E3	227
E12	171
F5	142
F12	111
G2	207
G5	164

Fig. 17

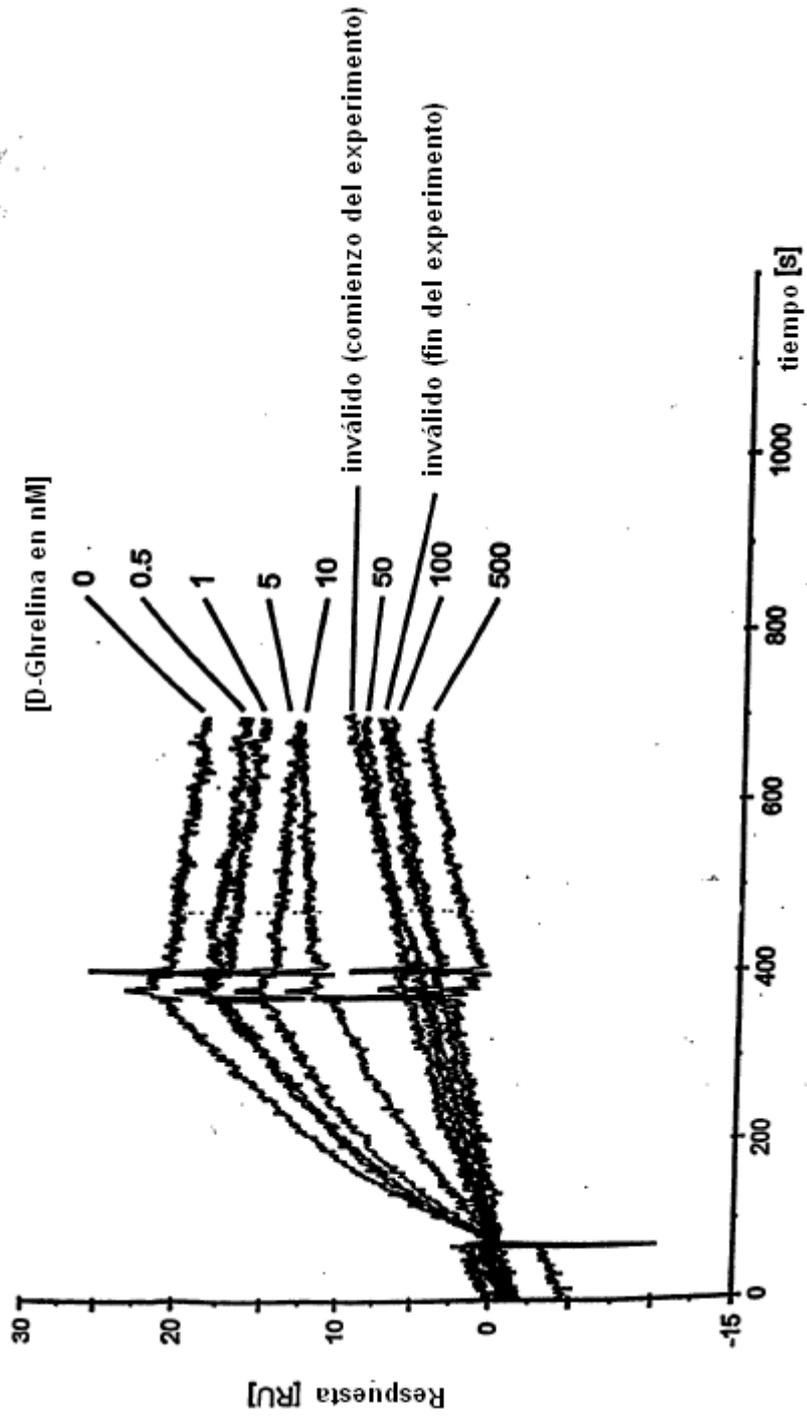


Fig. 18

**Clon B11**

**Clon B11trc**

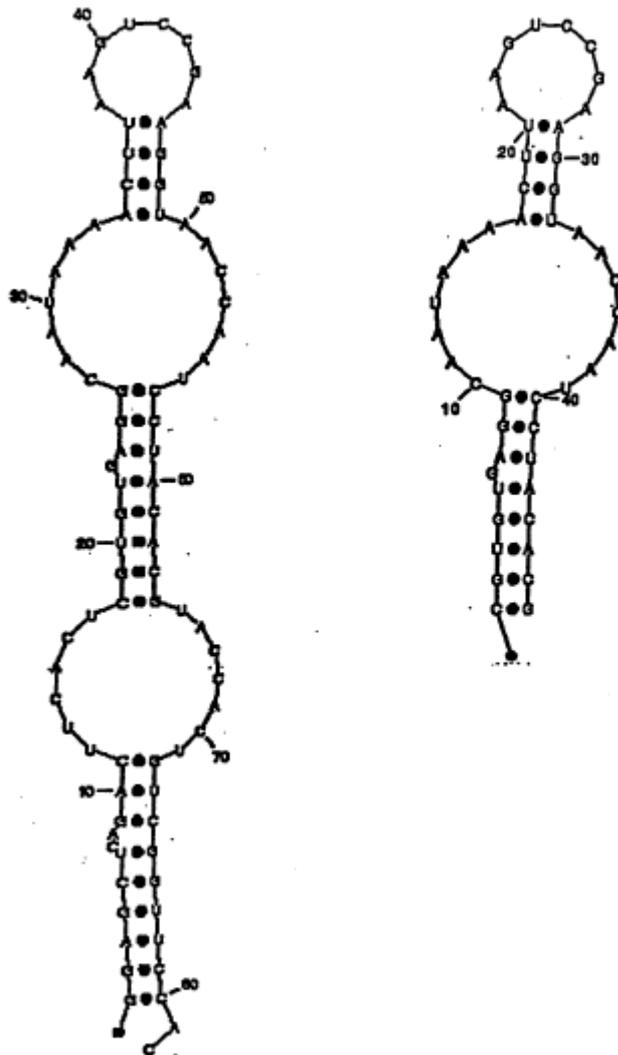


Fig. 19

Tabla 8

Clon	$K_D$ [nM]
<b>D-B11</b>	<b>205</b>
<b>L-B11</b> truncado	<b>104.</b>
<b>D-B11</b> truncado	<b>122</b>

Fig 20

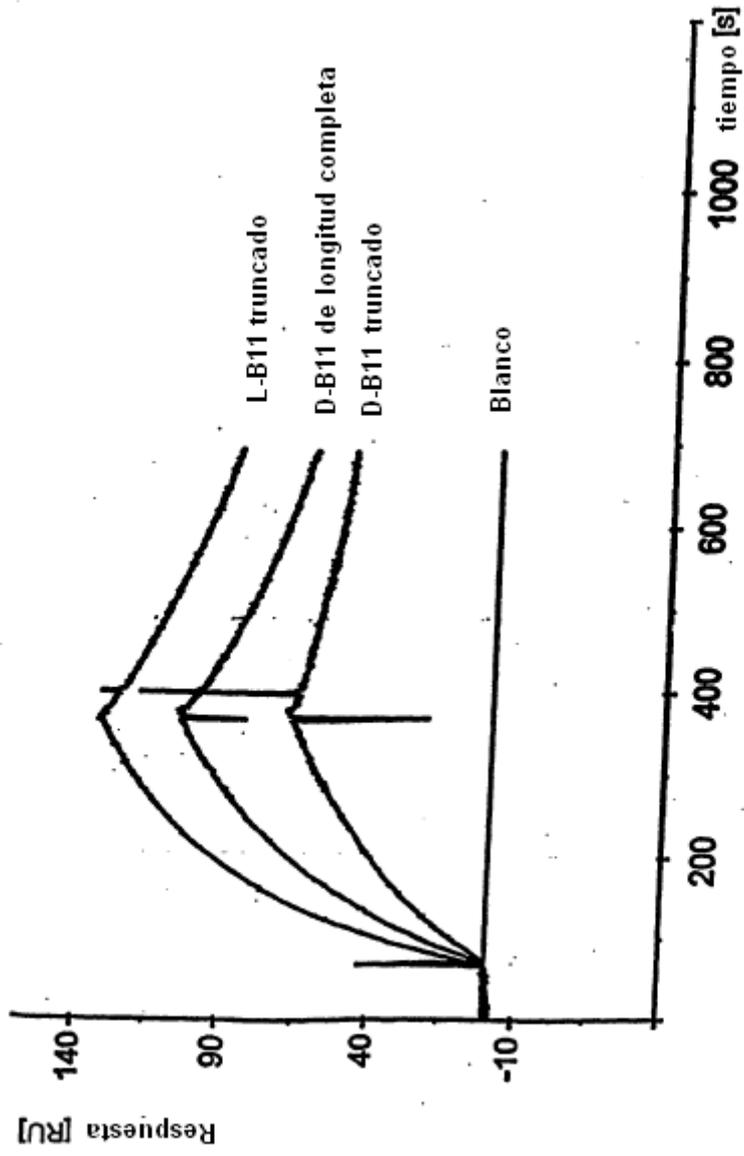


Fig. 21

Secuencias derivadas de la selección del ARN (ronda 13)

ARN ronda 13

grupo1

2.1 clon principal  
 'SOT-R04-DR13-E5 GGAGCTCAGACTTTCACCTGTCGGTGGGCGGCG-TAAGACCCAGGTACCCATTCTTACCCGTTACCCTGTGCGGTTCCAC

---

grupo2

2.1 clon principal  
 'SOT-R04-DR13-A2 GGAGCTCAGACTTTCACCTGTCGGTGGGCGGCTAACG-TAAGACCCAGGTACCCATTCTTACCCGTTACCCTGTGCGGTTCCAC

variaciones de 2.1  
 'SOT-R04-DR13-C4 GGAGCTCAGACTTTCACCTGTCGGTGGGCGGCTAACG-TAAGACCCAGGTACCCATTCTTACCCGTTACCCTGTGCGGTTCCAC

---

grupo3

3.1 clon principal  
 'SOT-R04-DR13-C1 GGAGCTCAGACTTTCACCTGTCGGTGGGCTAATAAAC-TAATTCGAGGTACCCATTCTTAC--AGGTACCCTGTGCGGTTCCAC

---

grupo4

4.1 clon principal  
 'SOT-R04-DR13-O2 GGAGCTCAGACTTTCACCTGTCGGTGGGCTAATAAGGGGAGTCTCTGCACTGATGCCAGGCCAGGTTACCCTGTGCGGTTCCAC

Fig. 22

Secuencias derivadas de la selección del ARN (ronda 14) ;

ARN ronda 14

grupo1

1.1 (clon principal)

'SOT-R04-DR14-F7 GGAGCTCAGACTTCTCACTCTGTCGGTGGGSCAGR--CGTAAGACCGAAGGTANCCATTCTACCACTGTAACAATCTGTCGGTTCAC

variations of clones 1.1

1.2

'SOT-R04-DR14-C11 GGAGCTCAGACTTCTCACTCTGTCGGTGGGCAAA--CGTAAGACCGAAGGTANCCATTCTACCACTGTAACAATCTGTCGGTTCAC

1.3

'SOT-R04-DR14-A8 GGAGCTCAGACTTCTCACTCTGTCGGTGGGCTAA--CGTAAGACCGAAGGTANCCATTCTACCACTGTAACAATCTGTCGGTTCAC

1.4

'SOT-R04-DR14-C12 GGAGCTCAGACTTCTCACTCTGTCGGTGGGCAAAAACGTANAGTANCCATTCTACCACTGTAACAATCTGTCGGTTCAC

grupo3

3.1 (clon principal)

'SOT-R04-DR14-C7 GGAGCTCAGACTTCTCACTCTGTCGGTGGGTAATAAAC---TAATCCGAGGTAAACCAATCTTACCACTGTCGGTTCAC

variaciones de clon 3.1

1.2

'SOT-R04-DR14-E11 GGAGCTCAGACTTCTCACTCTGTCGGTGGGCACTTAARACTT--AGTCCGAGGTAAACCAATCTTACCACTGTCGGTTCAC

1.3

'SOT-R04-DR14-H11 GGAGCTCAGACTTCTCACTCTGTCGGTGGGCAATTAARACTTG-AGTCCGAGGTAAACCAATCTTACCACTGTCGGTTCAC

1.4

'SOT-R04-DR14-E8 GGAGCTCAGACTTCTCACTCTGTCGGTGGGCAATTAARACTTGTAAAGTCCGAGGTAAACCAATCTTACCACTGTCGGTTCAC

Fig. 23

Secuencias derivadas de la selección del 2-F-ARN (ronda 14) ( 14)

2-F-ARN Ronda 14, grupo 1

1.1 (clon principal)

'SOT-F03-DR14-G6 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGAGCTTCT-CATACGTGCGCGCACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC

mutaciones del clon 1.1

- 1.2 'SOT-F03-DR14-F2 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGACTTCT--CATAGGTGCGCGCACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC
- 1.3 'SOT-F03-DR14-F4. GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGACTTCT---ATAGGTGCGCGCACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC
- 1.4 'SOT-F03-DR14-D5 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGAGCTTCTC-CATACGTGCGCGCACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC
- 1.6 'SOT-F03-DR14-G3 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGACTTCTC-CAAACGTGCGCGCACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC
- 1.7 'SOT-F03-DR14-B5 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGACTTCTC-CATACGTGCGCGCACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC
- 1.8 'SOT-F03-DR14-C2 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGACTTCTC-CATAGGTGCG---CACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC
- 1.9 'SOT-F03-DR14-F3 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGACTTCTT-CATACGTGCGCGCACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC
- 1.10 'SOT-F03-DR14-B6 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGACTTCTC---CATACGTGCGCGCACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC
- 1.11 'SOT-F03-DR14-H1 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGACTTCTC---ATAGGTGCGCGCACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC
- 1.12 'SOT-F03-DR14-F6 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGACTTCTC---CATACGTGCGCGCACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC
- 1.13 'SOT-F03-DR14-B1 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGACTTCTC---CATACGTGCGCGCACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC
- 1.14 'SOT-F03-DR14-C1 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGACTTCTC-CATACGTGCGCGCACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC
- 1.15 'SOT-F03-DR14-H5 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGGANTAGGANTACTCAGACTTCTTTC-CATACGTGCGCGCACCCAGCTTACCACTGTCCGGTTCCAC

Fig. 24 - 1

grupo2

2.1 (clon principal)  
'SOT-F03-DR14-G5 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGCGCTTTCCTGTTAGCTGCCGACCGTTCAGTGCGGCACGAGATACGTAACAACCTGTCCGTTCCAC

variaciones del clon 2.1

2.2  
'SOT-F03-DR14-D3 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGCGCTTTCCTGTTAGCTGTCGACCGTTCAGTGCGGCACGAGATACGTAACAACCTGTCCGTTCCAC

2.3  
'SOT-F03-DR14-H2 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGCGCTTTCCTGTTAGCT-CCGACCGTTCAGTGCGGCACGAGATACGTAACAACCTGTCCGTTCCAC

2.4  
'SOT-F03-DR14-D1 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGCGCTTTCCTGTTAGCT-CAGACCGTTCAGTGCGGCACGAGATACGTAACAACCTGTCCGTTCCAC

2.5  
'SOT-F03-DR14-A2 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGCGCTTTCCTGTTAGCT-CAGACCGTTCAGTGCGGCACGAGATACGTAACAACCTGTCCGTTCCAC

2.6  
'SOT-F03-DR14-G2 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGCGCTTTCCT--AGCTCTTACCGACCGTGCGGCACGAG--ACGTAACAACCTGTCCGTTCCAC

---

grupo3

3.1 (clon principal)  
'SOT-F03-DR14-H6 GGAGCTCAGACTTCACTCGTGCGCGCTTATGTCAGGGGCTTGAGCCGACACTGCGGACGTAACAACCTGTCCGTTCCAC

Fig. 24-2:

Secuencias derivadas de la selección del 2-F-ARN (ronda 15)

2-F-ARN Ronda 15 , grupo 1

1.1 (clon principal)  
 'SOT-F03-DR15-G10 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACTCAGACGTTTCT-CATACGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC  
 1.2  
 'SOT-F03-DR15-G7 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACTCAGACGTTTCT-CANACGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC  
 1.3  
 'SOT-F03-DR15-F10 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACTCAGACGTTTC--CATACGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC  
 1.4  
 'SOT-F03-DR15-D9 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACTCAGACGTTTC-----ATGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC  
 1.5  
 'SOT-F03-DR15-F12 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACTCAGACGTTT---CATACGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC  
 'SOT-F03-DR15-G12 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACTCAGACGTTT---CATACGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC  
 1.6  
 'SOT-F03-DR15-H7 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACTCAGACGT--C--CATACGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC  
 1.7  
 'SOT-F03-DR15-A11 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACTCAGACCTTTC--CATAGGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC  
 1.8  
 'SOT-F03-DR15-A8 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACTCAGACCTTCT-CATAGGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC  
 1.9  
 'SOT-F03-DR15-F8 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACTCAGACGTTTCTCCATACGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC  
 1.10  
 'SOT-F03-DR15-C9 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACTCAGGCCCTTCTTCATAGGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC  
 1.11  
 'SOT-F03-DR15-C12 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACCCAGACGTTT--CATACGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC  
 1.12  
 'SOT-F03-DR15-F7 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACTCAGACCTTTTT-CATAGGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC  
 1.13  
 'SOT-F03-DR15-A12 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGAAATAGGAATGACTCAGACCTTTTT-CATAGGT-CGCCGCACCCAGTACCCTGTCCGTTCCAC

---

grupo 2

2.1  
 'SOT-F03-DR15-C7 GGAGCTCAGACTTCACCTCGTGGCTTCTCTGTAGCTGCCAGCCGTCAGTCCGGCAGAGTACAGTACCCTGTCCGTTCCAC

Fig. 25

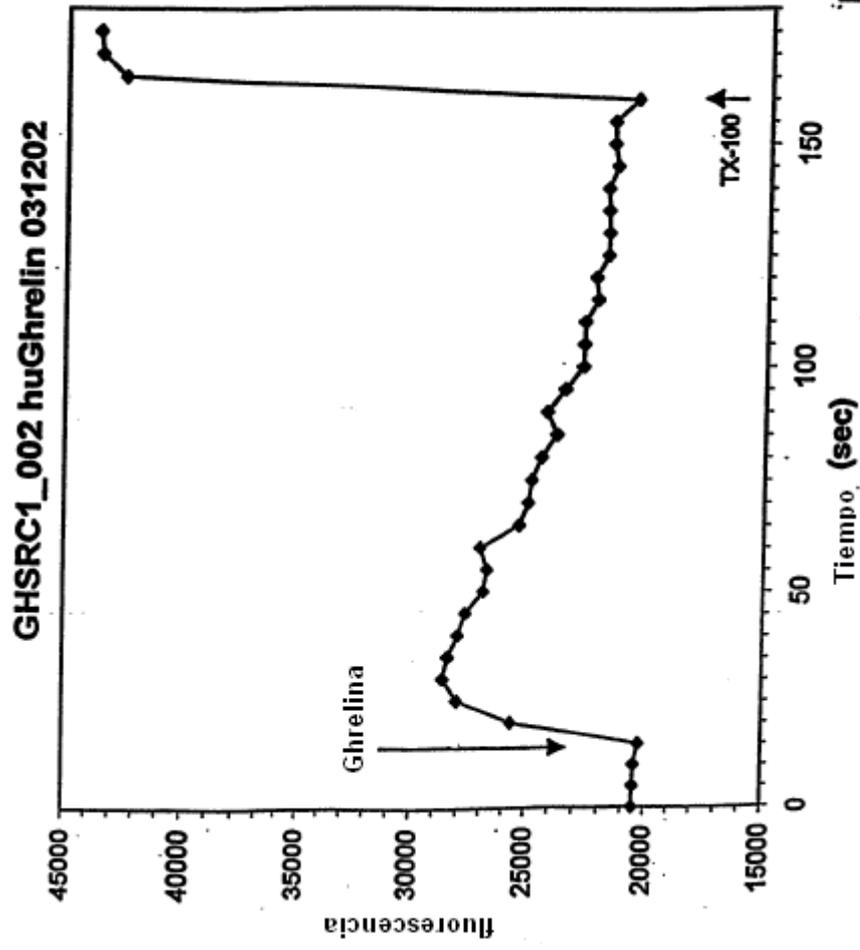
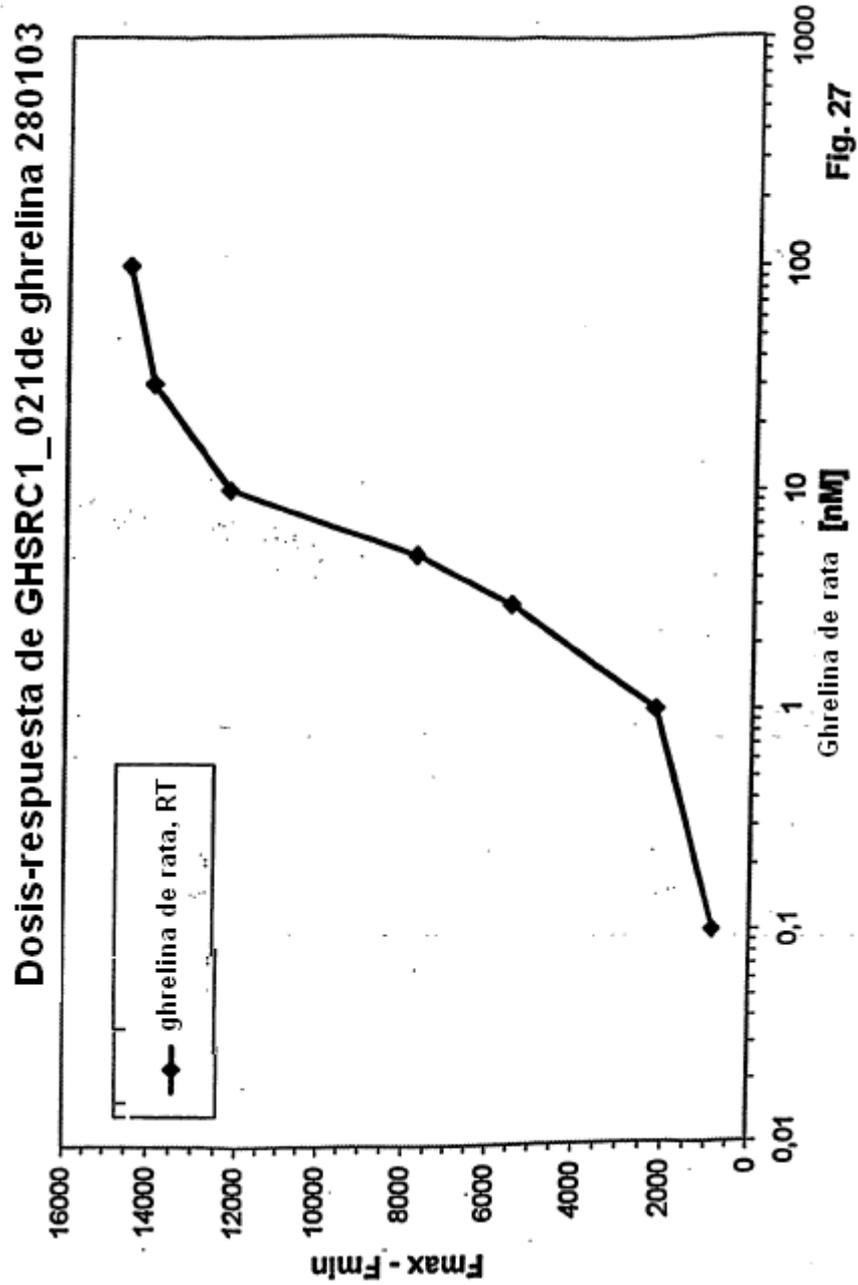
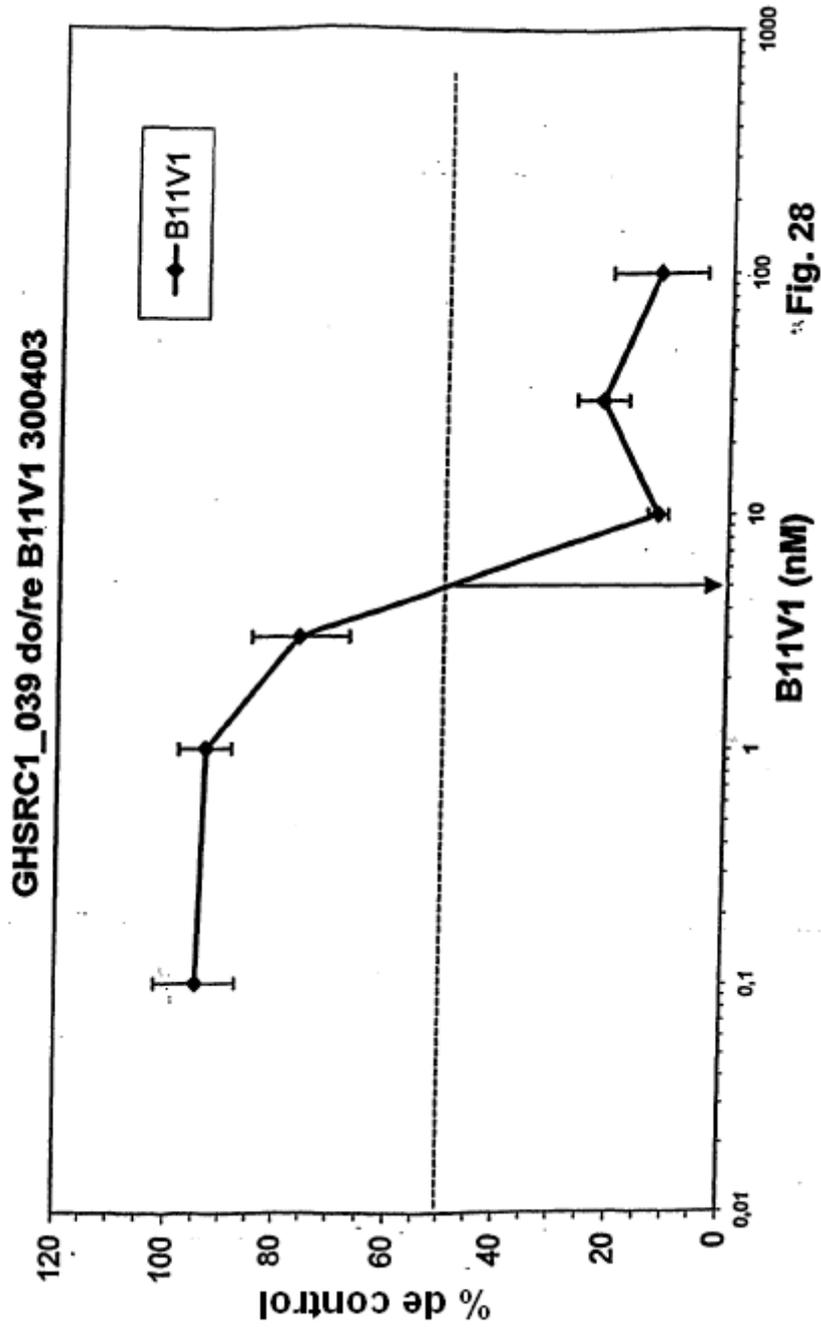


Fig. 26





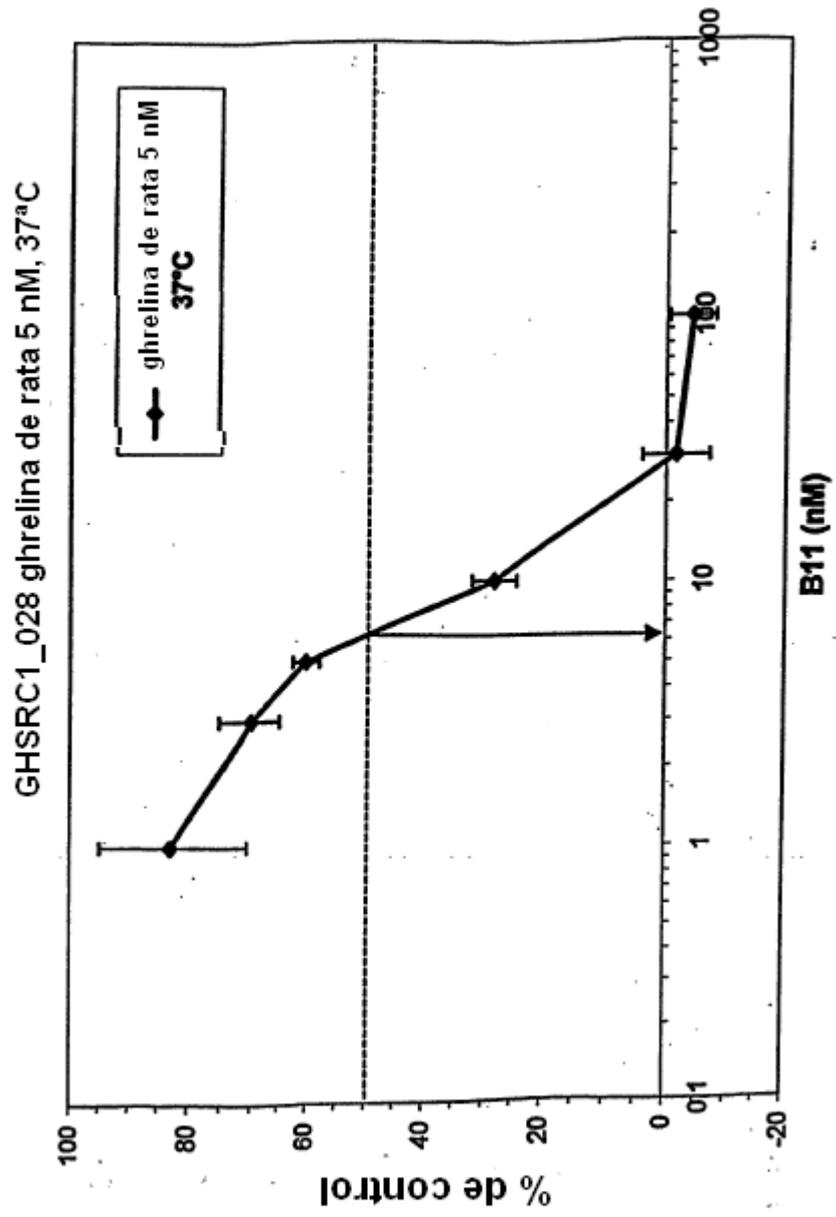


Fig. 29

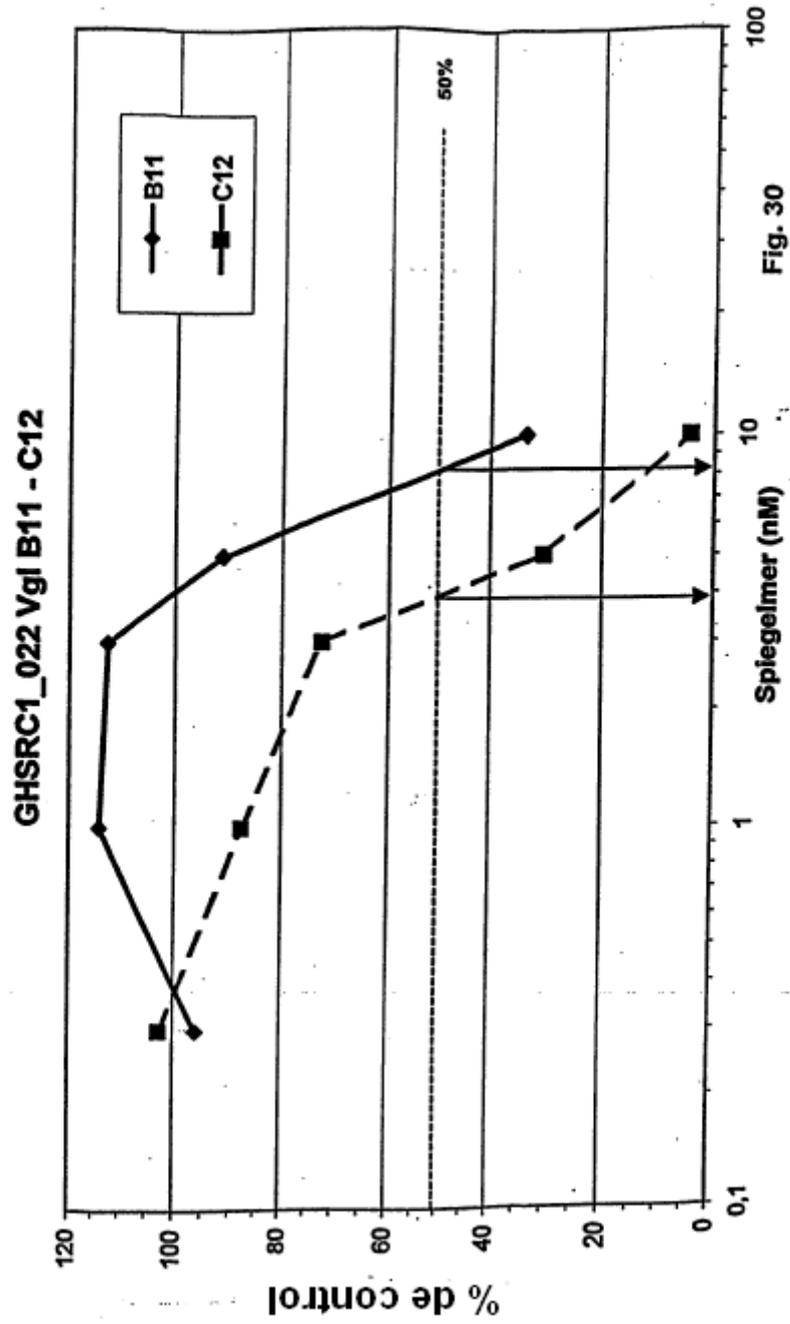


Fig. 30

SEQ ID Identificador Secuencia

NO	SEQ ID	Identificador	Secuencia
101	SOT-108-H3		5'-X-GGTGGGTGAGGCACCCCGTAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
102	SOT-108-A6		5'-X-GGTGGGTGAGGCANTTAACGTAAGACCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
103	SOT-108-B7		5'-X-GGTGGGTGAGGCAGTTATGTAAGACCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
104	SOT-108-C2		5'-X-GGTGGGTGAGGCAGTCTTGTAAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
105	SOT-108-C3		5'-X-GGTGGGTGAGGCATAAACGTAAGACCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
106	SOT-108-A1		5'-X-GGTGGGTGAGGCANTGTCTAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
107	SOT-108-A3		5'-X-GGTGGGTGAGGCATAAATAAGACCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
108	SOT-108-A4		5'-X-GGTGGGTGAGGCAGCAATAAGACCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
109	SOT-108-A5		5'-X-GGTGGGTGAGGCAGTTCACATAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
110	SOT-108-B1		5'-X-GGTGGGTGAGGCAGTAAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
111	SOT-108-B3		5'-X-GGTGGGTGAGGCATAAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
112	SOT-108-B6		5'-X-GGTGGGTGAGGCATGCAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
113	SOT-108-C4		5'-X-GGTGGGTGAGGCATTAACGTAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
114	SOT-108-C6		5'-X-GGTGGGTGAGGCACAAATAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
115	SOT-108-C8		5'-X-GGTGGGTGAGGCACACCCATAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
116	SOT-108-D5		5'-X-GGTGGGTGAGGCACAAATAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
117	SOT-108-E6		5'-X-GGTGGGTGAGGCATAAATAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
118	SOT-108-F1		5'-X-GGTGGGTGAGGCATTAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
119	SOT-108-F2		5'-X-GGTGGGTGAGGCATGTAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
120	SOT-108-F7		5'-X-GGTGGGTGAGGCATCCGATAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
121	SOT-108-G3		5'-X-GGTGGGTGAGGCATAAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
122	SOT-108-G7		5'-X-GGTGGGTGAGGCATAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
123	SOT-108-H4		5'-X-GGTGGGTGAGGCATTCAGTAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
124	SOT-108-H5		5'-X-GGTGGGTGAGGCATAAATAAGTCCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'
125	SOT-108-D4		5'-X-GGTGGGTGAGGCATCTGGTGAGGCAGATGTAAGACCGAAAGGTAACCAATCCTACCCACC-Y-3'

Fig 31

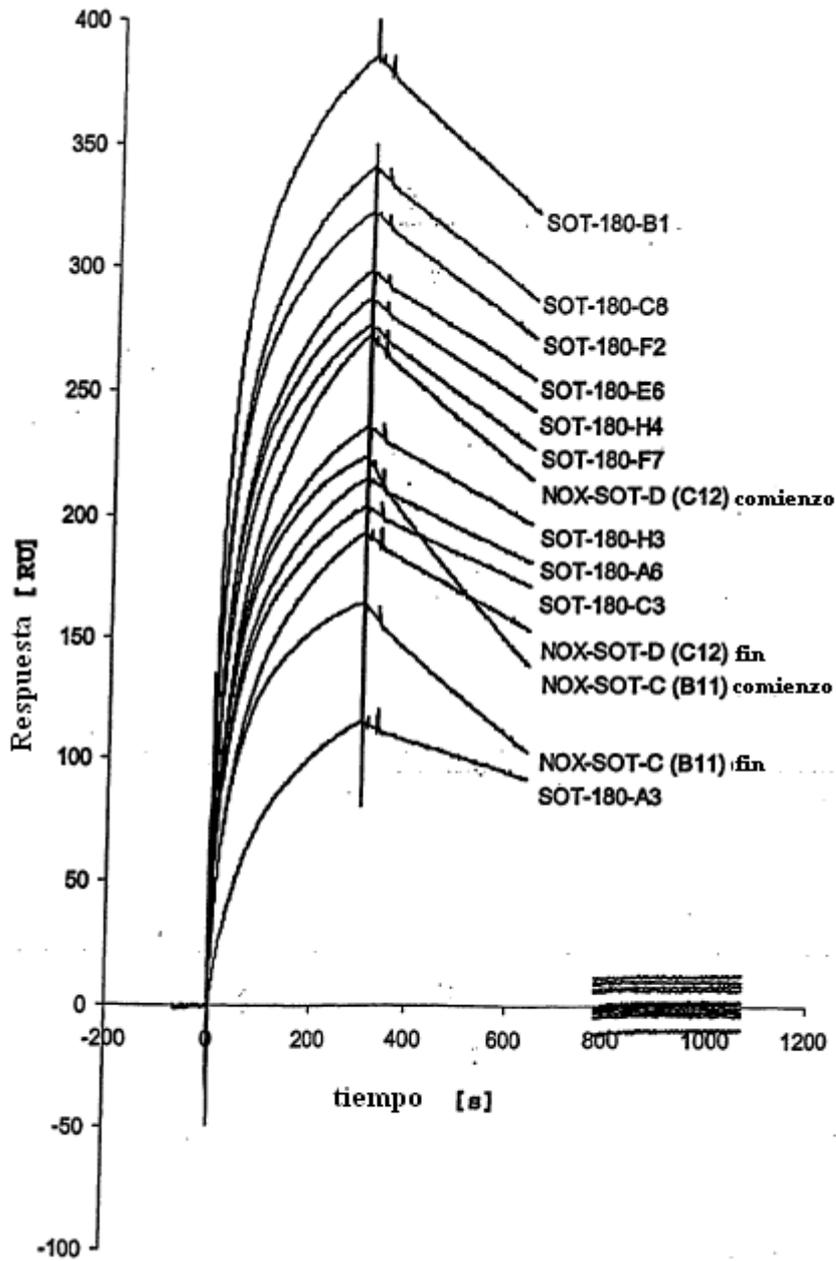


Fig 32A

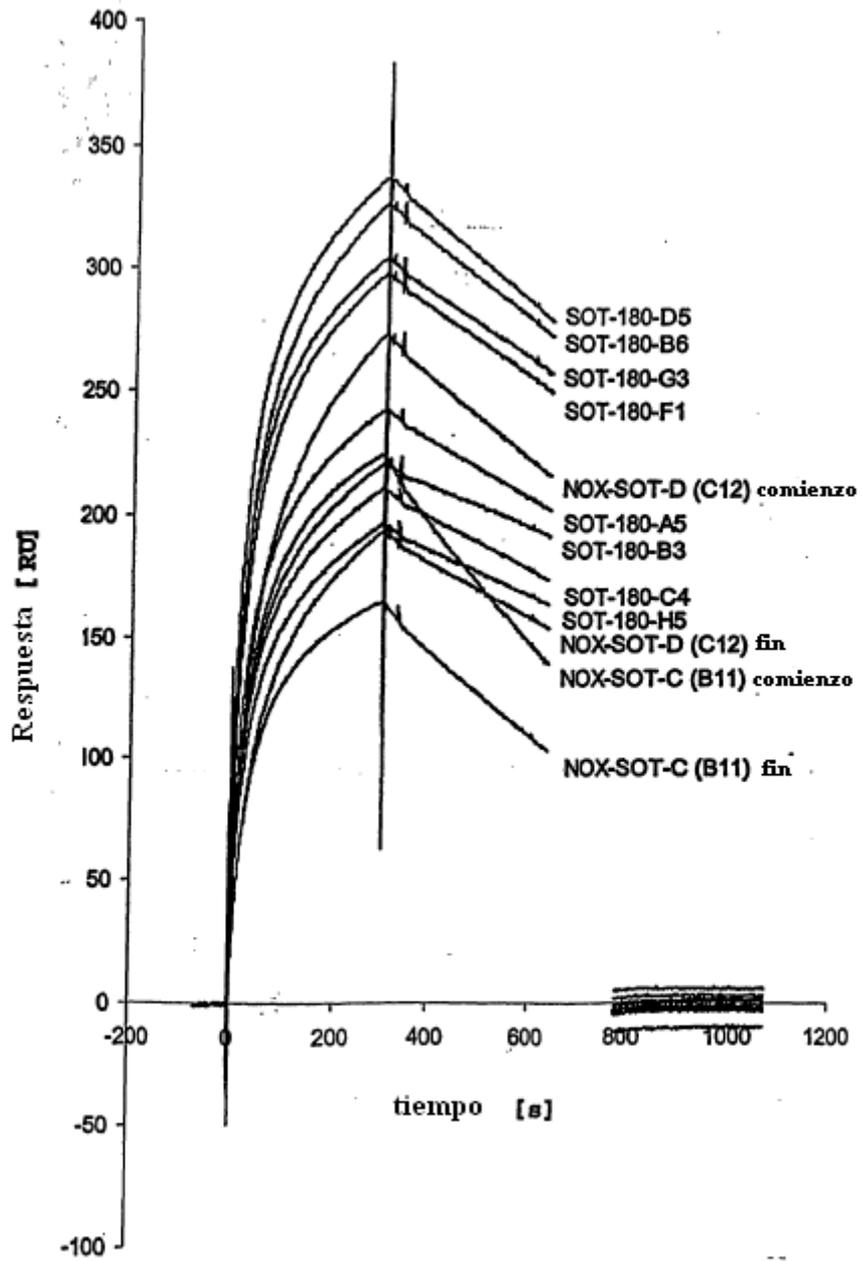


Fig 32B

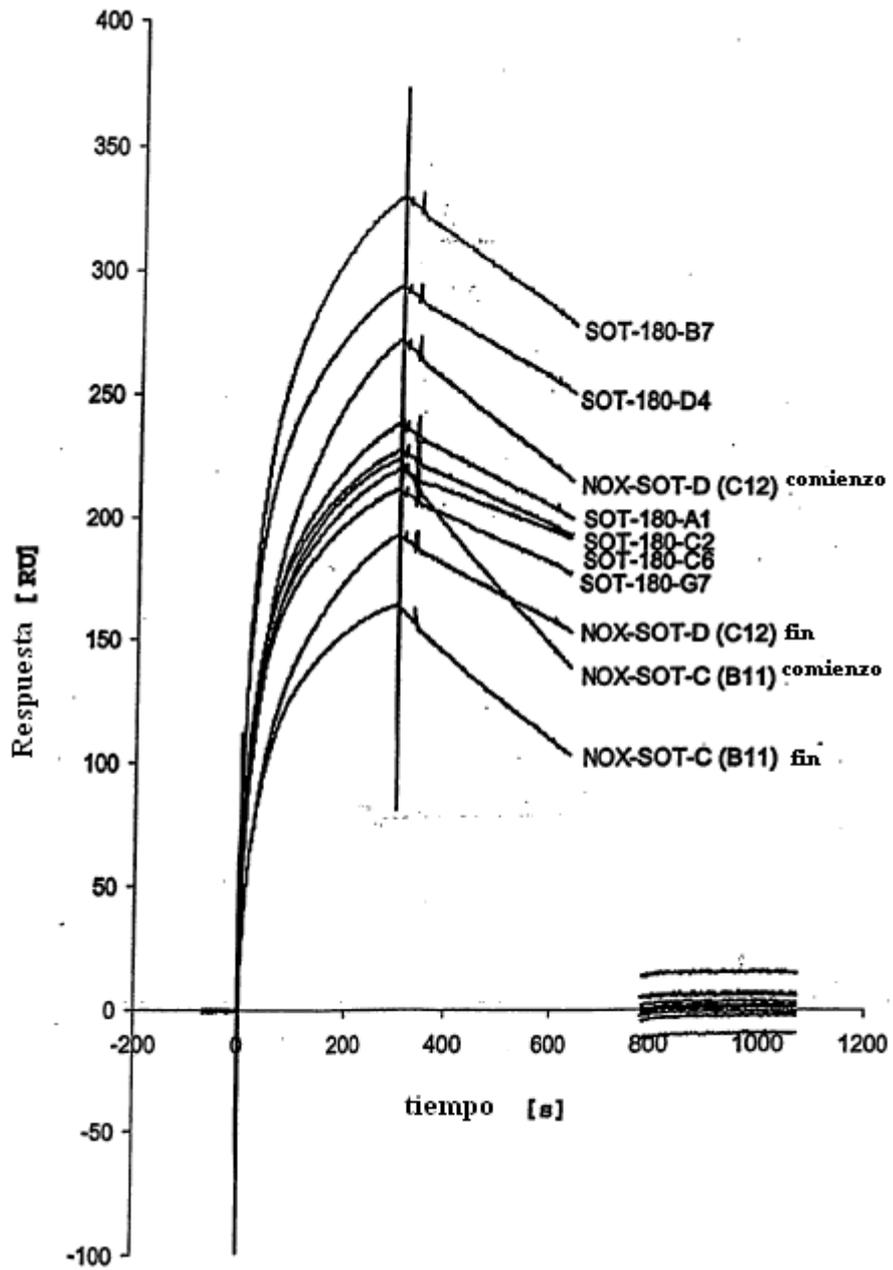


Fig 32C

Seq ID	Nombre	Secuencia	Tamaño (nt)	Clon Original
87	sot_d_lr_054	GGTGGTGAGGCAGTAATGTAAGTCCGGAAGGTAACCAATCCTACCCACC	49	SOT-108-B1
88	sot_d_lr_055	GGTGAGGCAGTAATGTAAGTCCGGAAGGTAACCAATCCTACCC	43	SOT-108-B1
89	sot_d_lr_056	GGTGAGGCAGACACGTAAGACCCGGAAGGTAACCAATCCTACCC	43	SOT-108-C8
90	sot_d_lr_057	GGTGGTGAGGCAGCTATGTAAGTCCGGAAGGTAACCAATCCTACCCACC	49	SOT-108-F2
91	sot_d_lr_058	GGTGAGGCAGCTATGTAAGTCCGGAAGGTAACCAATCCTACCC	43	SOT-108-F2
92	sot_d_lr_059	GGTGAGGCAGTCAAGTAAGTCCGGAAGGTAACCAATCCTACCC	43	SOT-108-B6
93	sot_d_lr_060	GGTGAGGCAGTTATGTAAGACCGAAGGTAACCAATCCTACCC	43	SOT-108-B7
94	sot_d_lr_061	GGTGGTGAGGCACACCATAAGTCCGGAAGGTAACCAATCCTACCCACC	49	SOT-108-D5
95	sot_d_lr_062	GGTGAGGCACACCATAAGTCCGGAAGGTAACCAATCCTACCC	43	SOT-108-D5
96	sot_d_lr_063	GGTGAGGCATCCGATAAGTCCGGAAGGTAACCAATCCTACCC	43	SOT-108-F7
97	sot_d_lr_064	GGTGAGGCAGTAAAGTAAGACCGAAGGTAACCAATCCTACCC	43	SOT-108-G3
98	sot_d_lr_065	GGTGAGGCAGTTCAGTAAGTCCGGAAGGTAACCAATCCTACCC	43	SOT-108-H4
99	sot_d_lr_066	GGTGAGGCATACAAATAAGTCCGGAAGGTAACCAATCCTACCC	43	SOT-108-E6
100	sot_d_lr_067	GGTGAGGCACACAAATAAGTCCGGAAGGTAACCAATCCTACCC	43	SOT-108-C6

Fig. 33



Inhibición de la actividad de ghrelina por los Spigelmers

Titulación de la dosis-respuesta de los clones de reselección

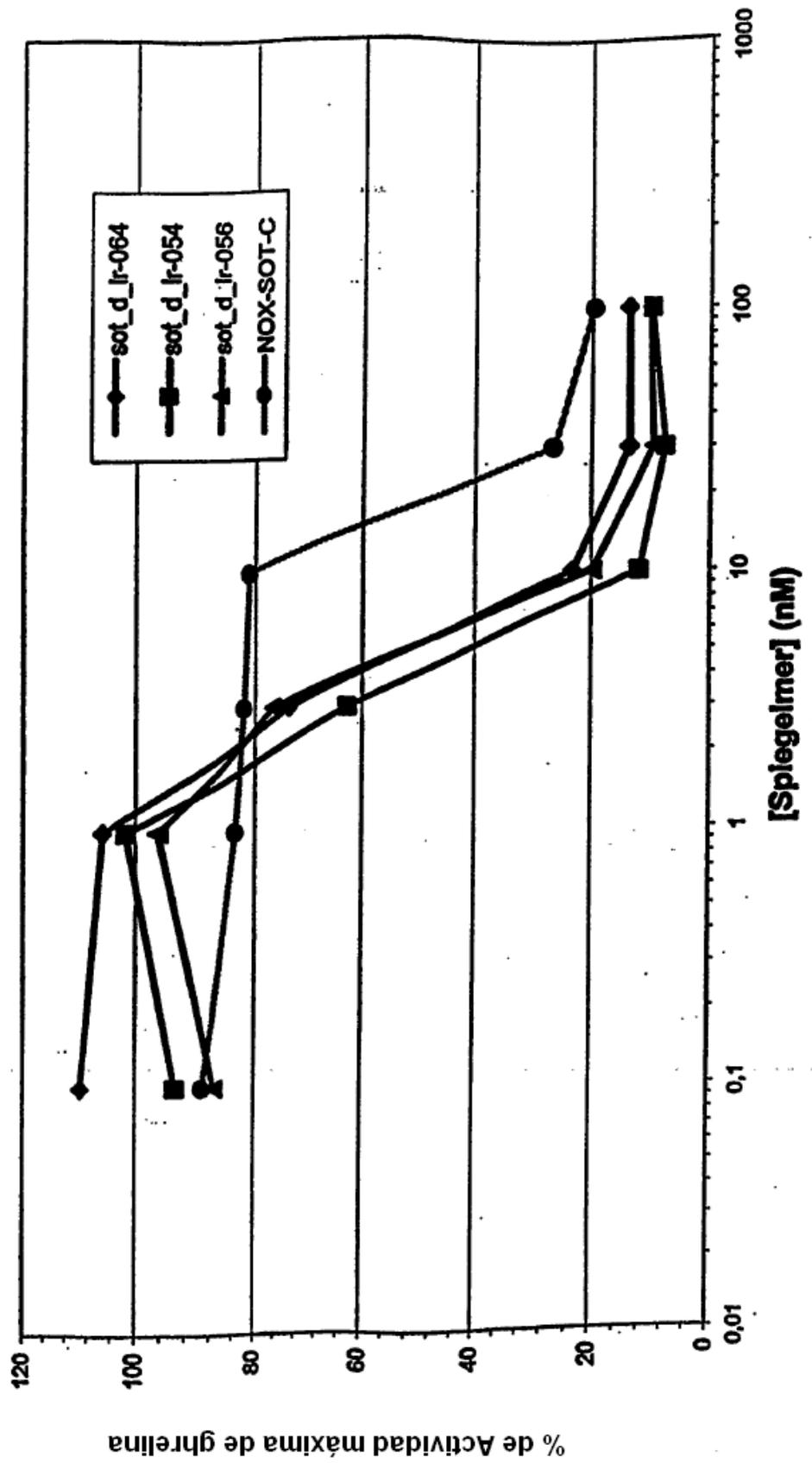


Fig 35

PRIMER EXPERIMENTO

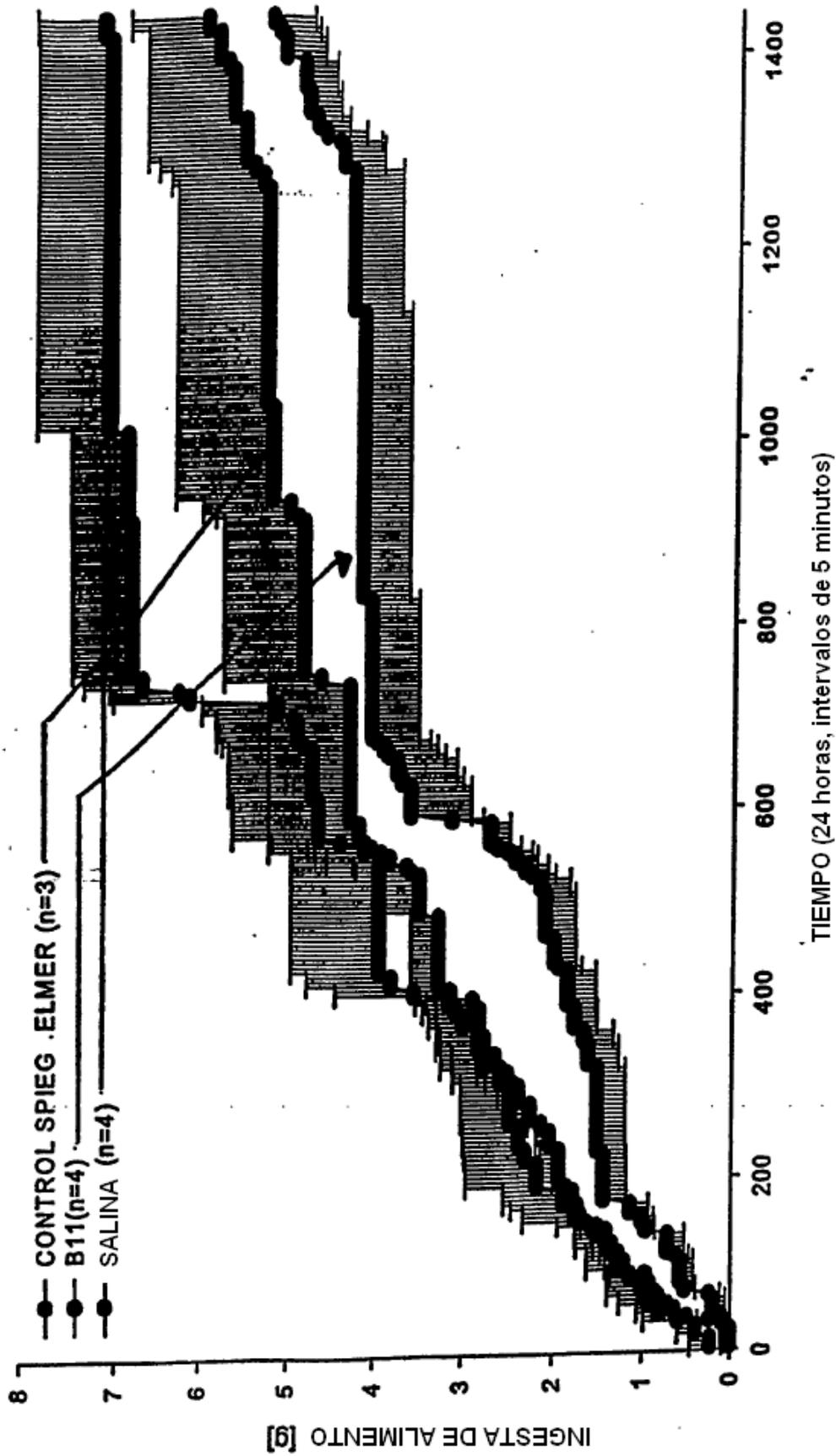
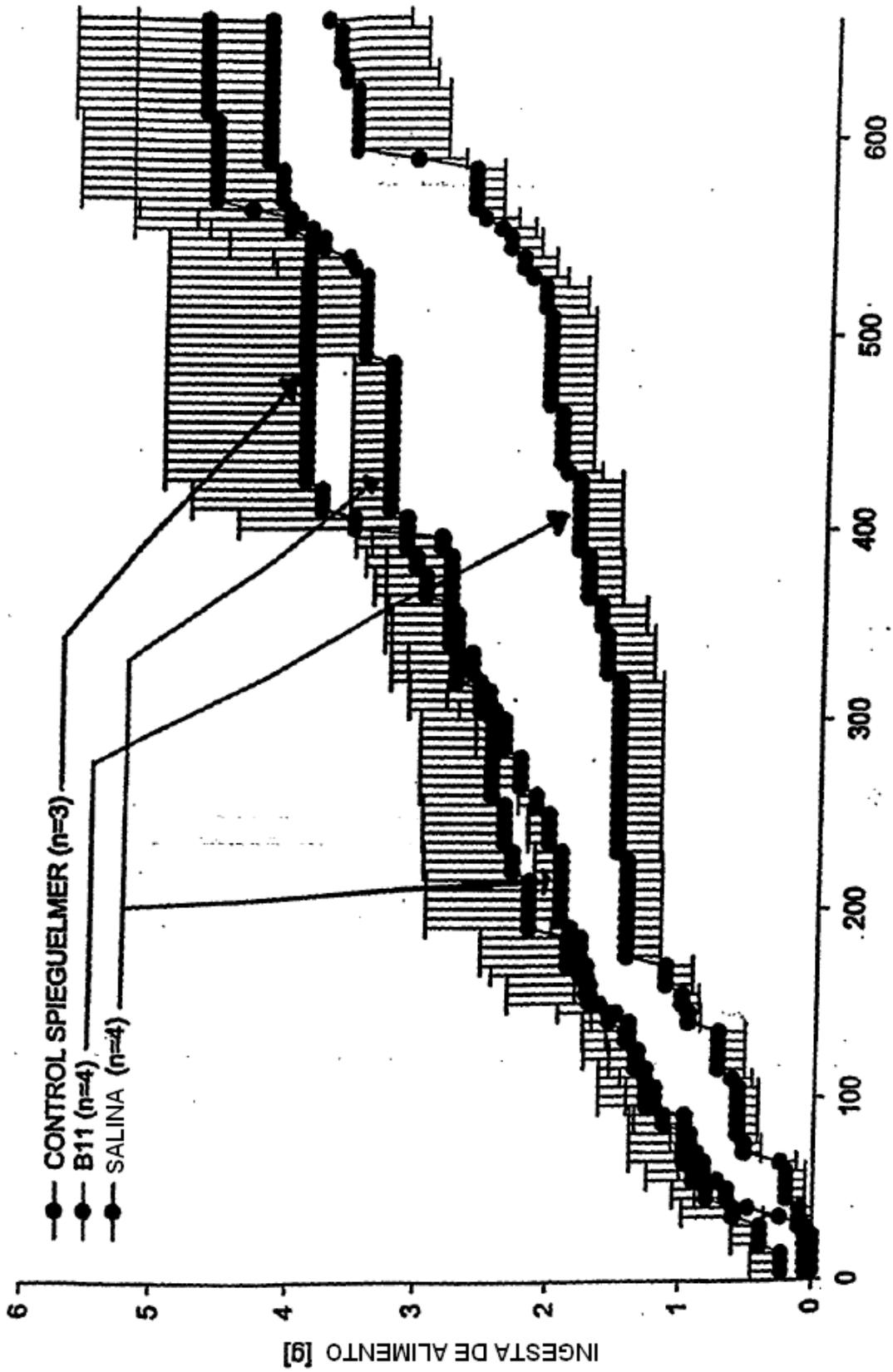


Fig. 36 A



TIEMPO (11 horas, intervalos de 5 minutos)

Fig. 36 B

SEGUNDO EXPERIMENTO

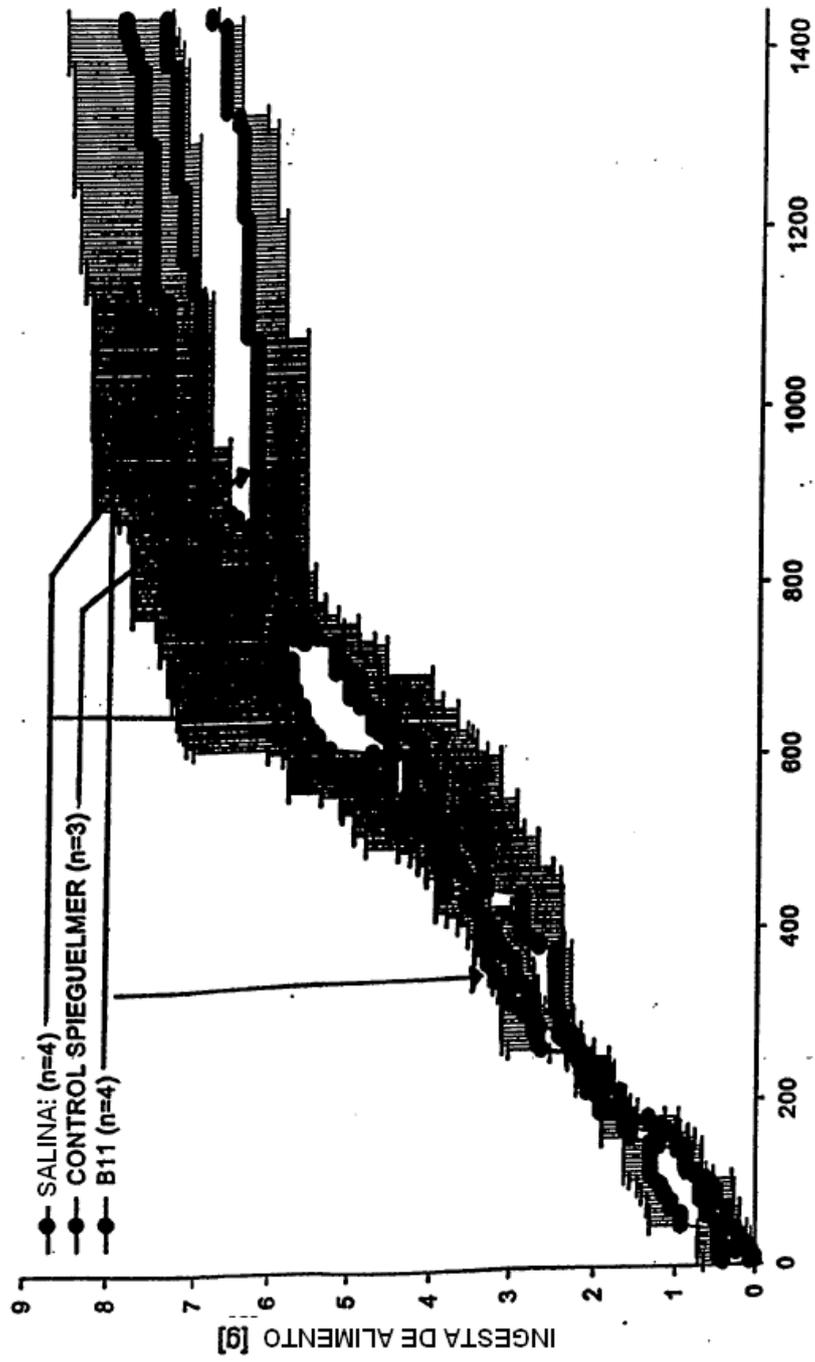


Fig. 37 A  
TIEMPO (24 horas, intervalos de 5 minutos)

# TOTAL

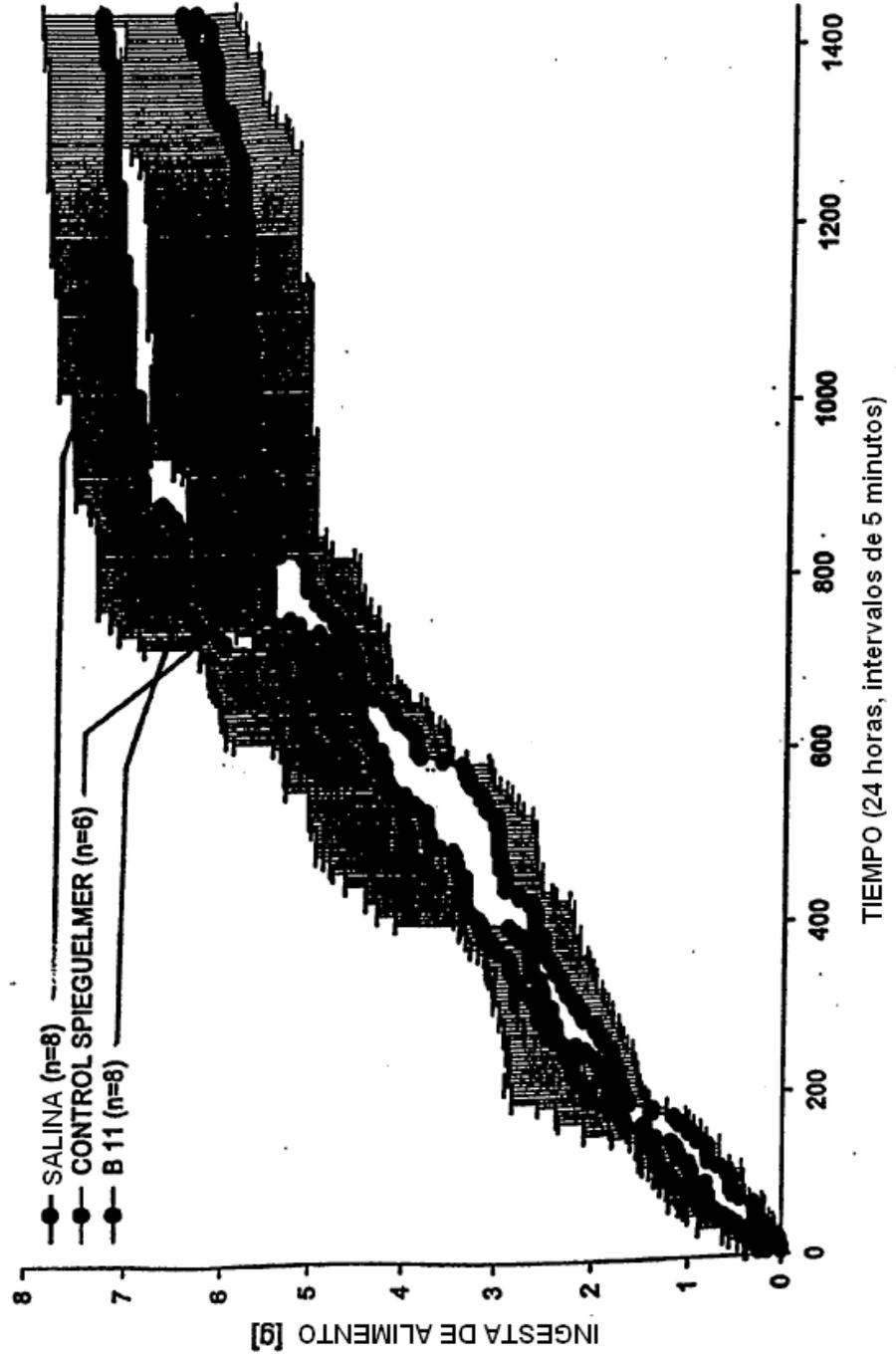
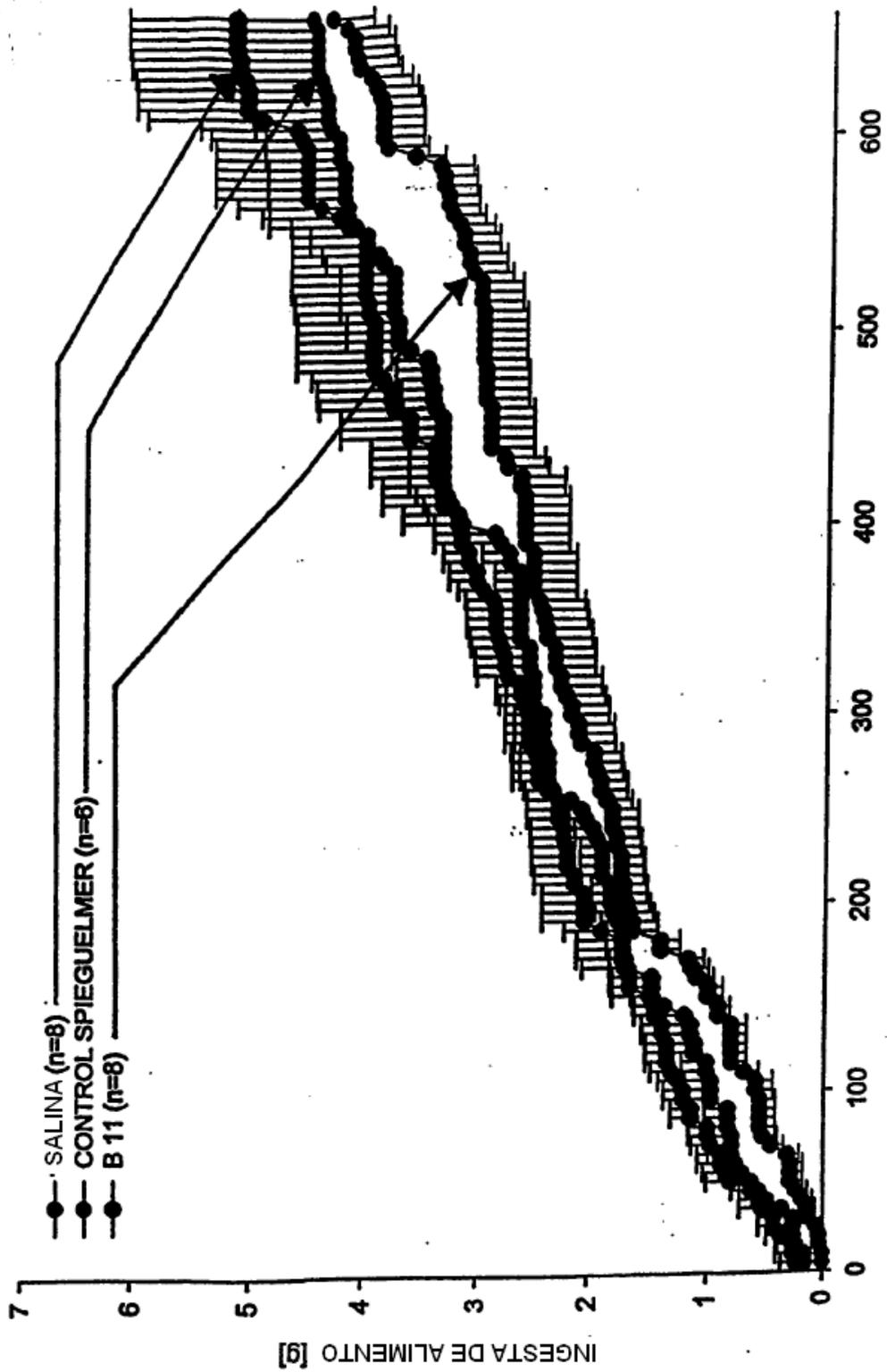


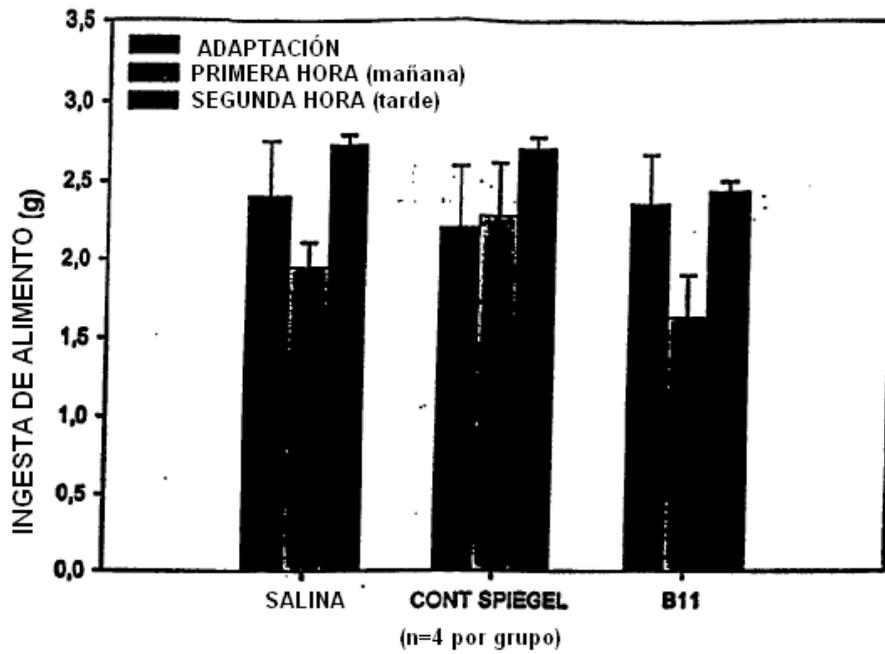
Fig. 38 A



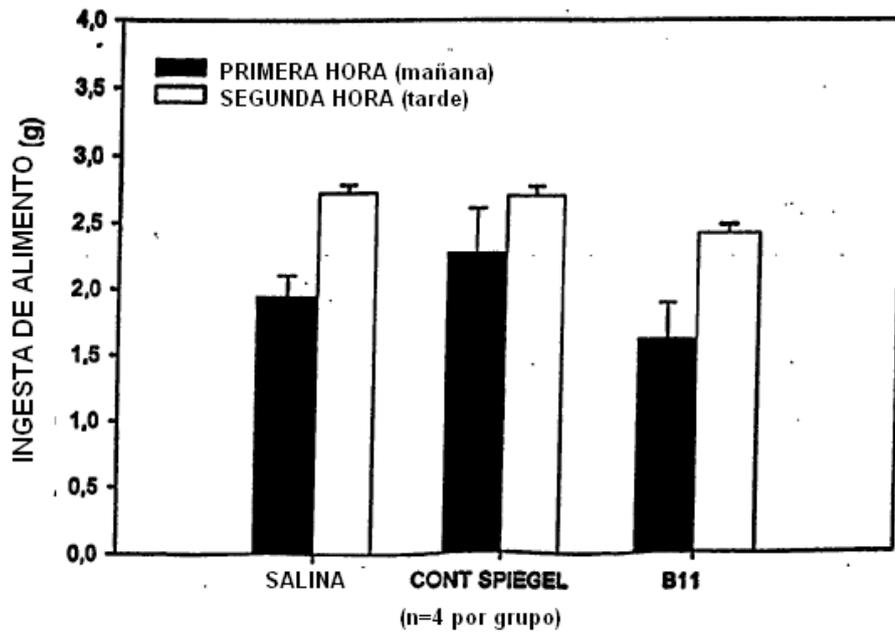
TIEMPO (11 horas, intervalos de 5 minutos)

Fig. 38 B

ENTRENAMIENTO DE COMIDA  
PRIMER EXPERIMENTO

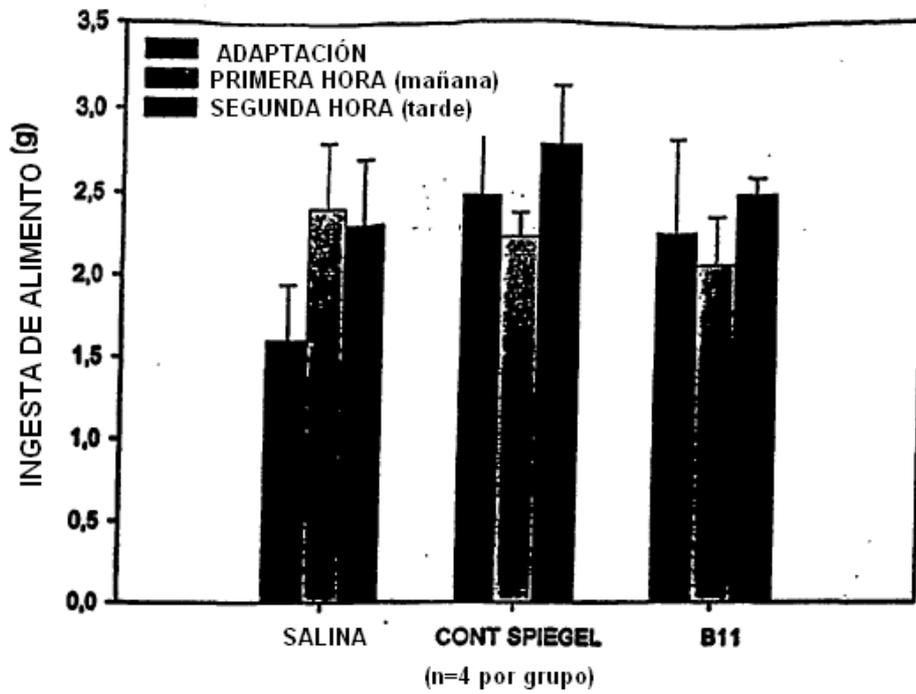


ENTRENAMIENTO DE COMIDA  
PRIMER EXPERIMENTO

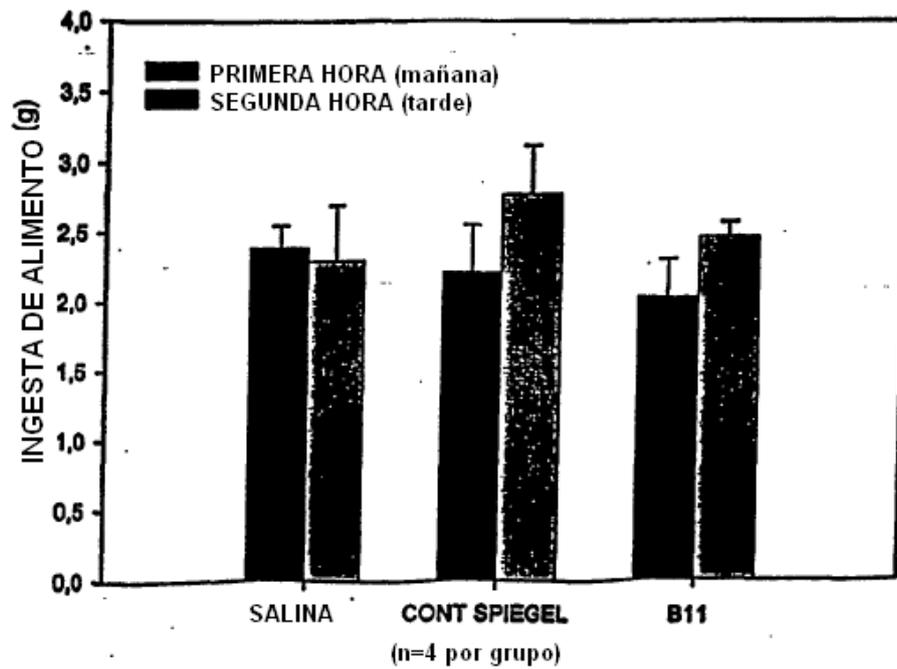


Figuras 39A (superior) y 39B (inferior)

ENTRENAMIENTO DE COMIDA  
SEGUNDO EXPERIMENTO

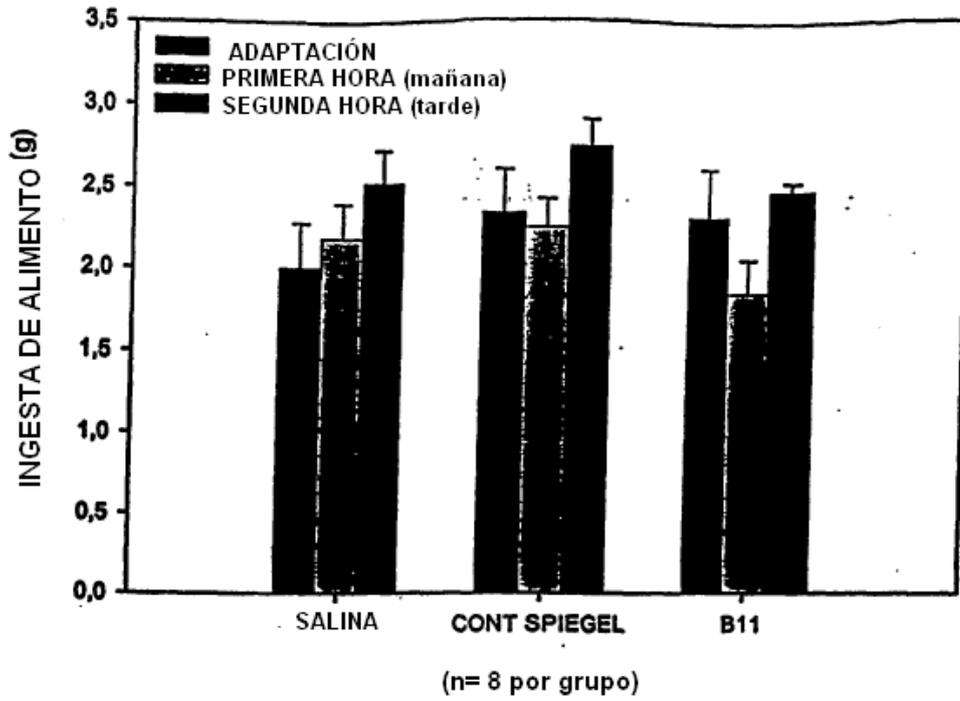


ENTRENAMIENTO DE COMIDA  
SEGUNDO EXPERIMENTO

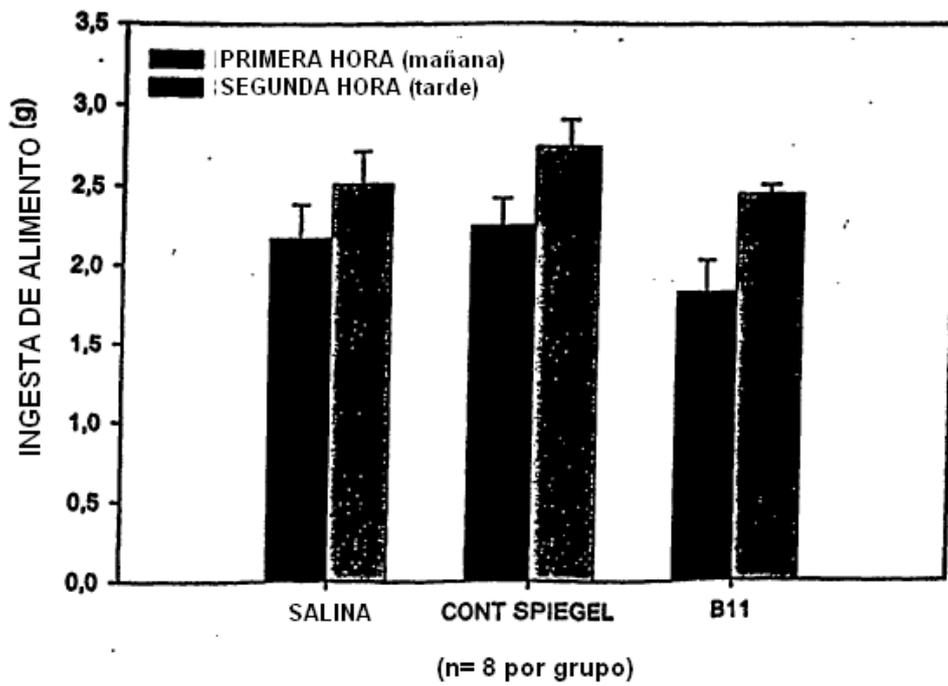


Figuras 40A (superior) y 40B (inferior)

ENTRENAMIENTO DE COMIDA  
TOTAL



ENTRENAMIENTO DE COMIDA  
TOTAL



Figuras 41 (superior) y 40B (inferior)

EXPERIMENTO I.C.V (24 horas)  
(Ratas macho Wistar)

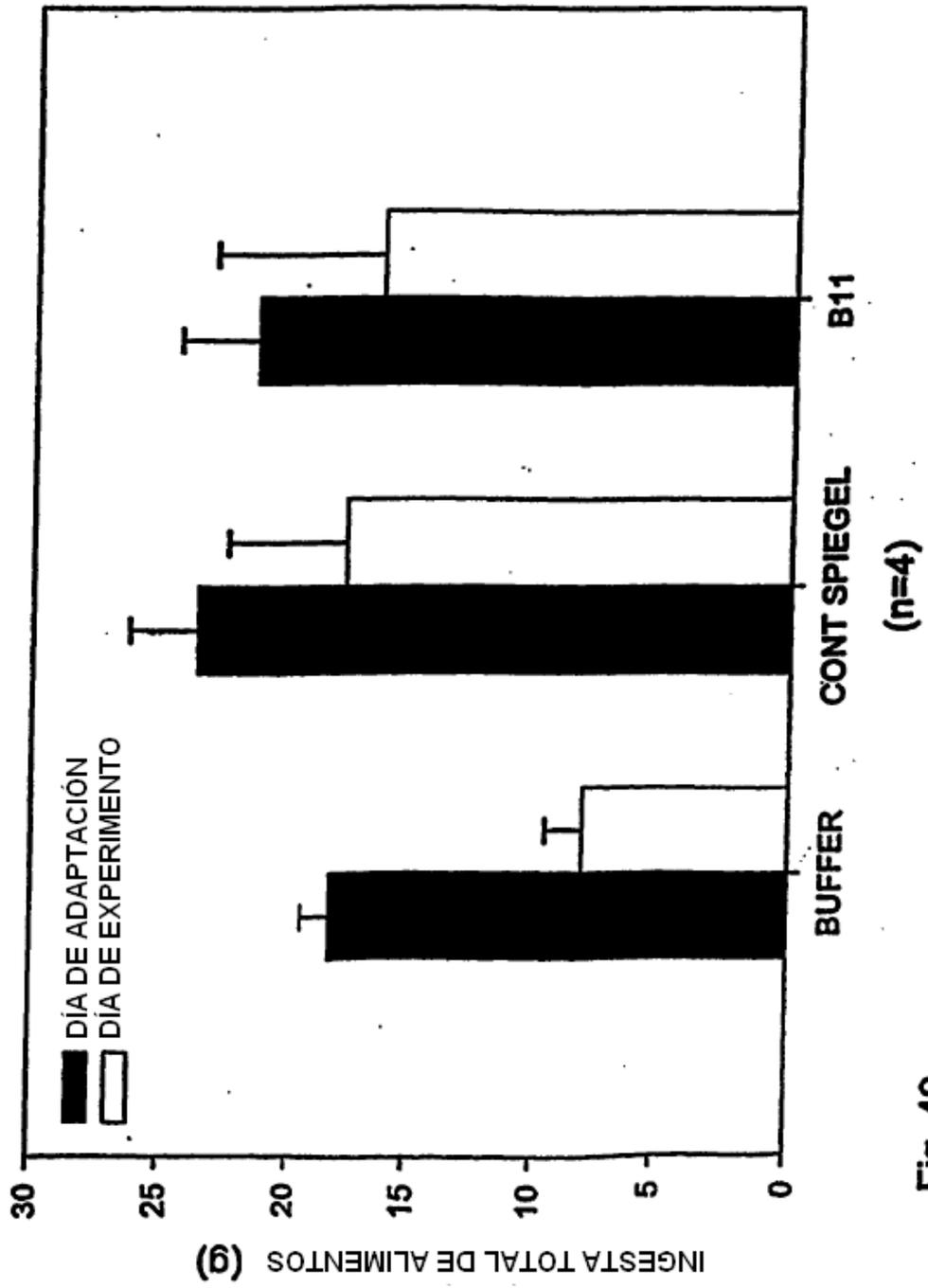


Fig. 42

GH después del estímulo de ghrelina (n=6)

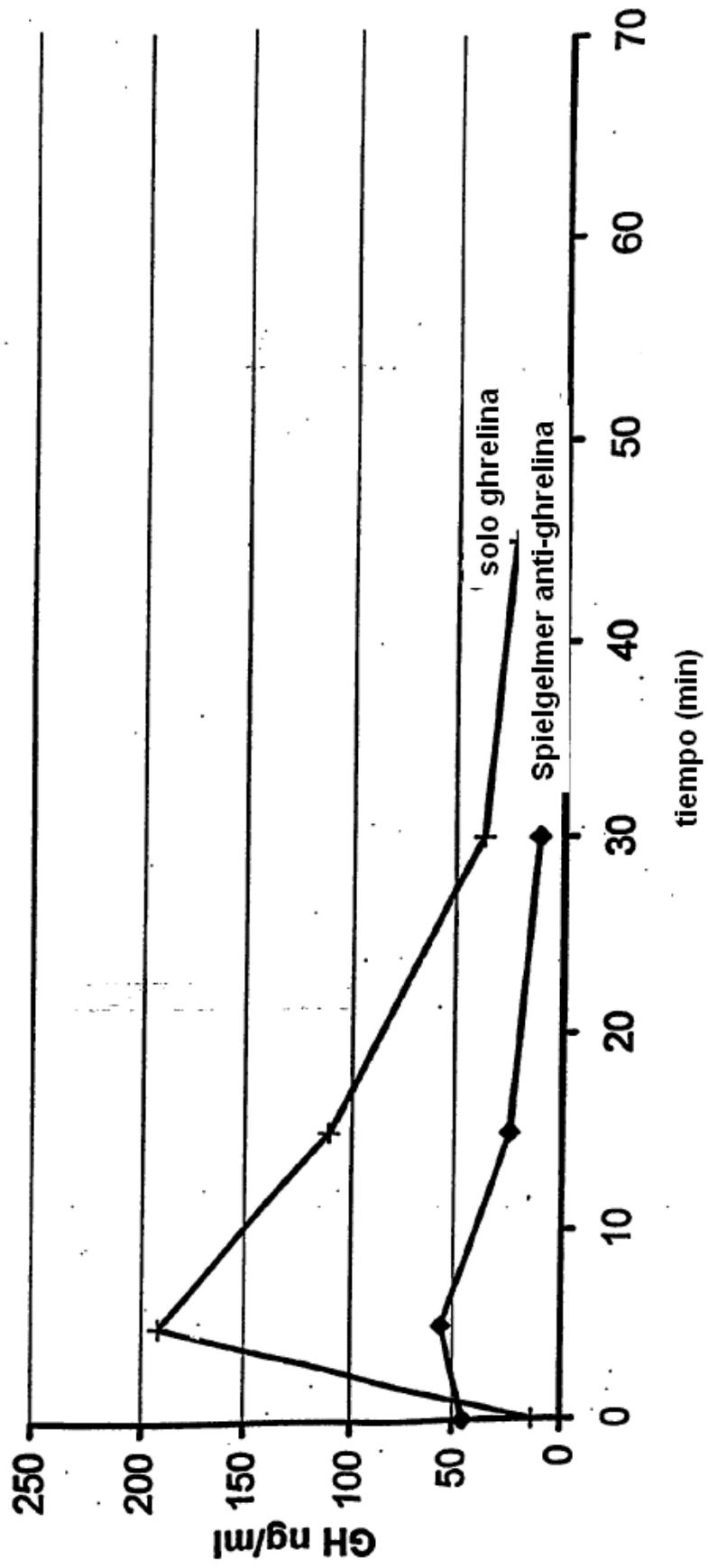
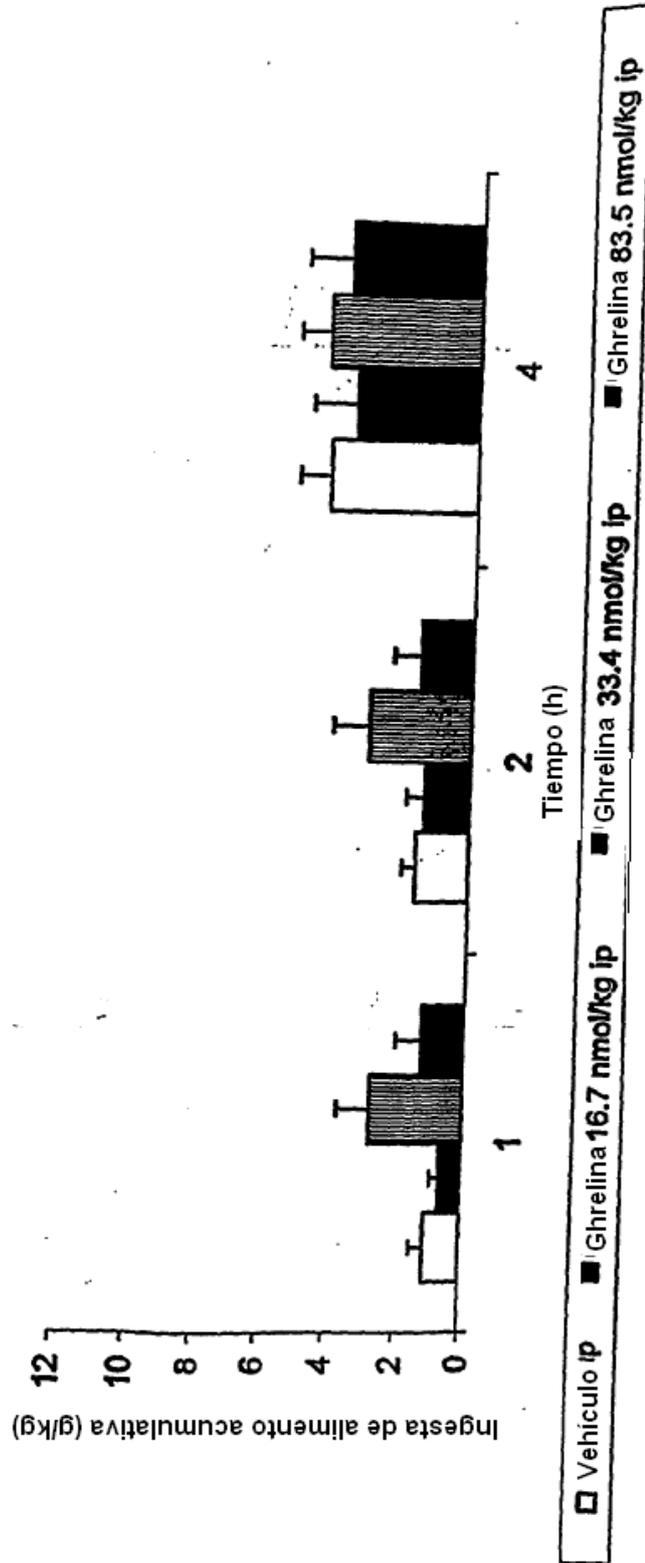


Fig. 43

**Efectos de la administración aguda de ghrelina sobre la ingesta de alimentos en ratas machos Sprague-Dawley**



Los resultados se expresan como media + SEM por grupos de 8 ratas. Las comparaciones estadísticas fueron por análisis de varianza de una vía ( $P > 0,05$  a 1, 2 y 4 horas).

**Fig. 44**

Efecto dependiente de la dosis del spiegelmer anti-ghrelina sobre la secreción de GH estimulada por ghrelina en ratas

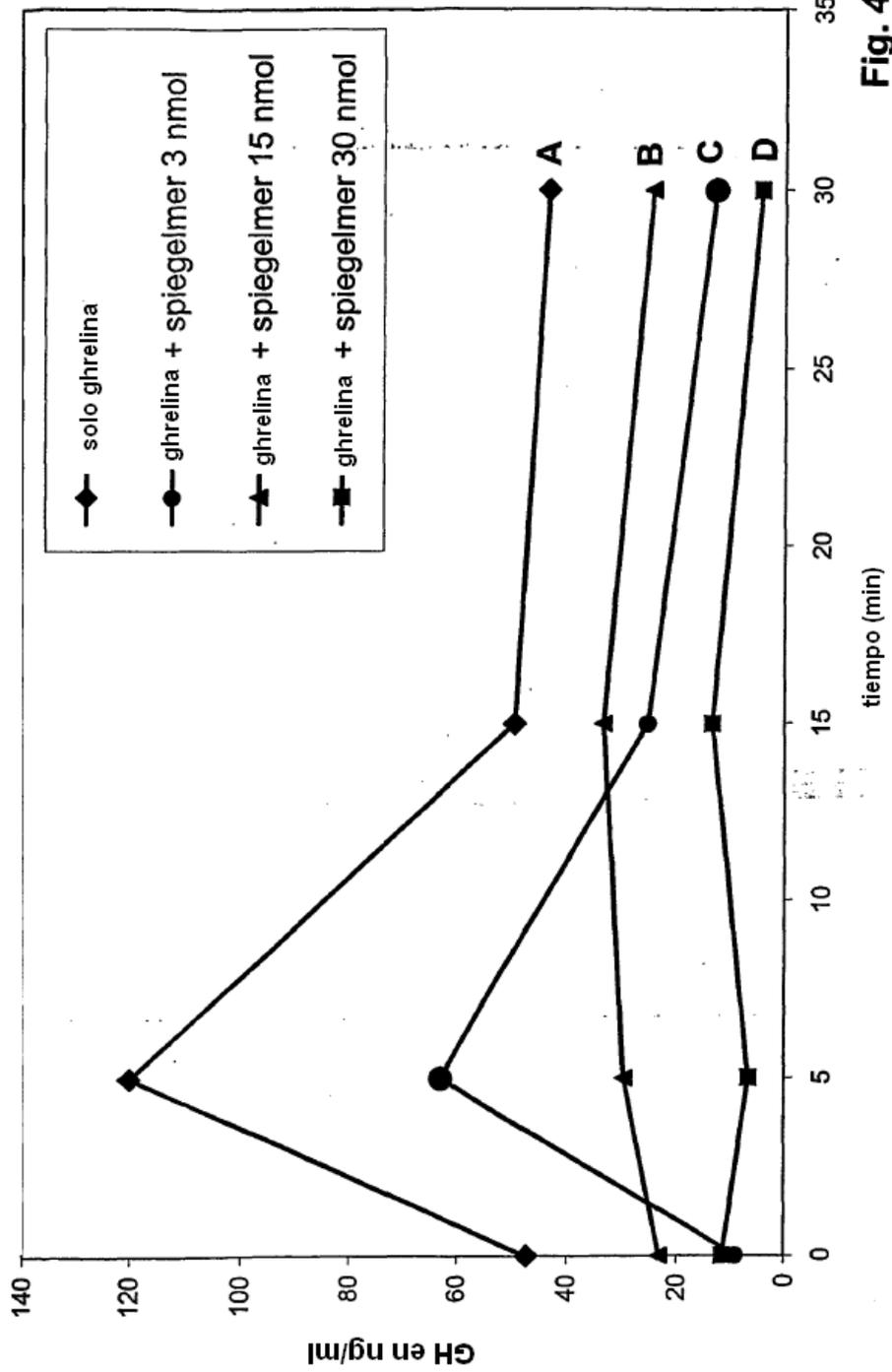


Fig. 45