

PT



Libertad y Orden

REPÚBLICA DE COLOMBIA
DIVISIÓN DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

PCT
PATENTE DE INVENCION



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

06-42741

TITULO: ÁCIDOS NUCLEICOS QUE SE UNEN ESPECÍFICAMENTE A
GHRELIN BIOACTIVO

CIP: C12N15/11, C12Q1/68, A61P3/00, 3/04, 3/08

SOLICITANTE: NOXXON PHARMA AG

DIRECCIÓN: Max-Dohrn-Str. 8-10, 10589, Berlin, Alemania

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ, Mayo 5 de 2006

OLARTE RAISBECK


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Raz: 05-042741-00000-0000 Fec: 2005-05-05 17:59:15
361 2020 NUSCREACIONES
Tiz: 11 PATENTEYII EVO 378 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folio 127

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

10-06-06

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

S LICITANTE
(71)

Nombre: NOXXON PHARMA AG

Dirección: Max-Dohrn-Str. 8-10, 10589
Berlin, Alemania

Nacionalidad o Domicilio: ALEMÁN

Lugar de Constitución: ALEMANIA

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747 Bta
TP 74.295

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PÁGINA ADJUNTA

Dirección: VER PÁGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/012739 Fecha Noviembre 10, 2004

Publicación Internacional No. WO 2005/049828 Fecha Junio 2, 2005

6

Título (54) ÁCIDOS NUCLEICOS QUE SE UNEN ESPECÍFICAMENTE A GHRELIN
BIOACTIVO

7

Clasificación Internacional (51) C12N 15/11, C12Q 1/68, A61P 3/00, 3/04, 3/07

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

Noviembre 10, 2003

(31) Número de Solicitud

03025743.0

9

Comprobante de pago No. 06 - 33.219

Fecha MAYO 4, 2006

11

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. *12*

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Exámenes Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 B.O. T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES PCT/EP2004/012739

SVEN KLUSMANN
Paulsborner Straße 83,
D-10709 Berlin
Alemania
Nacionalidad: Alemán

STEFFEN HELMLING
Rosenheimer Straße 35,
D-10781 Berlin
Alemania
Nacionalidad: Alemán

DIRK EULBERG
Schlommansstraße 17,
D-10437 Berlin
Alemania
Nacionalidad: Alemán

CHRISTIAN MAASCH
Ernststraße 27,
D-13509 Berlin
Alemania
Nacionalidad: Alemán

KLAUS BUCHNER
Abmannshäuser Straße 3,
D-14197, Berlin
Alemania
Nacionalidad: Alemán

A

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
RES:05-042741-00000-0000 REC. 2005-05-05 17:55:16
OEP. 2020 NUECREACIONES
VIZ. 11 PATENTENY BIZ 378 FASENACIONALI
ACI 411 PRESENTACION F6004: 127

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 830176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 33,219
FECHA : MAYO 4 DE 2006

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGU	FECHA PGO	Gr. PAGU
BLARTE RAISDEBS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	45832340	04/05/2006	4,643,000.00

C E M C E P Y O

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATEN'E DE IN	463,000.00
	TOTAL :	463,000.

SUM: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



NOTES ON THE PCT SYSTEM

(43) International Publication Date
2 June 2005 (02.06.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/049828 A1

(51) International Patent Classification: C12N 15/11, C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/EP2004/012739

(22) International Filing Date: 10 November 2004 (10.11.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date: 05025743.0 10 November 2003 (10.11.2003) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): NOXON PHARMA AG [DE/DE]; Max-Dahm-Str. 6-10, 10589 Berlin (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventor/Applicants (for US only): KLUSSMANN, Sven [DE/DE]; Paulshorn Strasse 83, 10709 Berlin (DE); HPIAHLING, Steffen [DE/DE]; Rasthofstr. 35, 10781 Berlin (DE); KILBERG, Dirk [DE/DE]; Schliemannstrasse 17, 10437 Berlin (DE); MAASCH, Christian [DE/DE]; Ernststrasse 27, 13509 Berlin (DE).

(74) Agent: ROHMANN, Armin, K.; Bohmann & Lauen, Sonnenstrasse 8, 80331 München (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AI, AM, AN, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GI, GL, GR, HU, IL, IN, IS, JP, KG, KI, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, CH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LI, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CI, CO, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: **MITOTIC ACIDS SPECIFICALLY BINDING BIOACTIVE GHRELIN**

(57) Abstract: The present invention is related to a nucleic acid specifically binding bioactive ghrelin, more preferably a octanoyl ghrelin, and its use for the diagnosis of ghrelin mediated diseases and disorders.

WO 2005/049828 A1

NUCLEIC ACIDS SPECIFICALLY BINDING BIOACTIVE GHRELIN

The present invention is related to nucleic acids which bind to a bioactive ghrelin, and the use of such nucleic acid for the binding and detection of bioactive ghrelin.

Ghrelin was identified as the natural ligand of the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHSR1a). The receptor is most abundant in the pituitary gland and in hypothalamic parts of the brain, but can also be detected in other tissues at low concentrations. Since the late 70ies synthetic peptides and other compounds, named secretagogues had been shown to stimulate the release of growth hormone. However, the natural ligand responsible for the release of growth hormone remained unknown until the discovery of ghrelin in 1999. Ghrelin is a highly basic 28 amino acid peptide hormone with an octanoyl acid side chain at the third amino acid of its N-terminus (serine 3). This unusual modification is required for the interaction at the GHS-receptor and its activity. However, in biological samples a mixture of both, the octanoyl ghrelin which is a form of a bioactive ghrelin and the unmodified or des-octanoyl ghrelin which is present. The amino-acid sequence of the purified rat ghrelin was determined by a protein sequencer to be GSSFLSPFHQKAQQRKESKKTPAKLQPR (SEQ. ID. No. 19). The corresponding human sequence deviates in two positions only, carrying the same n-octanoyl-side chain at the amino acid position serine 3 (GSSFLSPFHQRVQQRKESKKTPAKLQPR (SEQ. ID. No. 16).

Beside the naturally occurring n-octanoyl residues, unsaturated or branched octanoyl groups, and longer aliphatic chains introduced at position 3 of ghrelin mediate receptor recognition as well. The receptor interaction domain is located at the very N-terminus of ghrelin; deletion studies indicate, that ghrelin (1-10) [GSSFLSPFHQ, SEQ. ID No. 17] and even the minimal motif of amino acids 1-5 (ghrelin (1-5) [GSSFL, SEQ. ID. No.18]) are sufficient for stimulation of GHSR1a, but in both cases, a strong requirement for peptide modification with the n-octanoyl residue is observed.

Ghrelin has been shown to mediate physiological functions pertinent to an anabolic state. While it directly stimulates the release of growth hormone (GH) from the pituitary gland, experiments in rodents also showed ghrelin to induce feeding in a GH-independent fashion by acting upon hypothalamic neurons. Interestingly, the primary site of ghrelin production is in gastric glands

in the stomach, suggesting that it serves as a hormonal link between stomach, pituitary gland and hypothalamus. The observation that ghrelin administration in rats resulted in weight gain as a consequence of changes in energy intake and/or fuel utilization is in support of such a role. Moreover, systemic ghrelin administration in humans cause sensations of hunger in the test subjects and induce overeating. Based on these findings ghrelin is thought to have a crucial role in the regulation of appetite and body weight, serving as an acute as well as a chronic signal of an underfed state. Additional support for this hypothesis comes from observations that ghrelin levels as well as appetite are reduced in individuals following gastric bypass, contributing at least in part to the efficiency of the procedure in effecting weight loss. Clinical data from patients with Prader-Willi syndrome also suggest that the hyperphagia and obesity associated with the disease are a consequence of tremendous hyperghrelinemia. Moreover, ghrelin was found to induce hyperglycemia and inhibition of insulin release, indicating an involvement in glucose metabolism. Beside these functions in energy metabolism, ghrelin has also been implicated in a number of other processes. It was found to be expressed in a number of neuroendocrine tumors and to stimulate, besides GH release from the pituitary, the release of ACTH, PRL, and cortisol. Single injections of ghrelin into healthy individuals were found to increase cardiac output and decrease blood pressure. Thus, ghrelin action appears to be involved in a variety of different tasks. For background information may be taken from M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsui, K. Kangawa, "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach", *Nature* 402:656-60, 1999; M. Tachibana, 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* 86:5972-6, 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 and 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; Bednarek MA, et al., *J Med Chem.* 2000 Oct.; 43:4370-6 Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide,

ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a.

The problem underlying the present invention is to provide means for the binding of bioactive ghrelin and more particularly to provide a method for the treatment of diseases and disorders mediated by bioactive ghrelin as well as methods for the specific detection of bioactive ghrelin.

According to the present invention the problem is solved by the subject matter of the independent claims which are attached hereto. Preferred embodiments result from the dependent claims.

Human ghrelin is a basic peptide having the amino acid sequence according to SEQ. ID. No. 16, and is modified with a fatty acid side chain. In consideration of the high degree of peptide sequence homology between different species, the term ghrelin used herein refers to any ghrelin including, but not limited to, mammalian ghrelin. Preferably, the mammalian ghrelin is selected from the group comprising mice, rat, rabbit, hamster and human ghrelin. Most preferably the ghrelin is human ghrelin.

The calculated pI of ghrelin is 11.09. Despite of this very basic over-all pI of ghrelin, the receptor binding motif GSSFL [ghrelin (1-5)] is a rather acidic domain, with a calculated pI of 5.5. The present invention is based on the surprising finding, that a nucleic acid can be selected with full-length ghrelin, that specifically recognizes the acidic receptor binding domain, but not the basic central and carboxy-terminal domain of the peptide. This is surprising in regard of electrostatic effects of both the charges of target molecule, i. e. ghrelin, and the charges of the nucleic acid. The binding of negatively charged nucleic acids to a basic domain of a target molecule should be much more advantageous compared to the binding of a nucleic acid to an acidic domain of a target molecule. Thus it has to be pointed out that the one skilled in the art had no reasonable expectation of success to select a nucleic acid ligand that is not binding to the basic part of ghrelin but is binding to the acidic domain of the target molecule.

Beside the amino-terminal receptor binding motif, biologically active ghrelin which is also referred to herein as bioactive ghrelin, is characterized by its acylation with a n-octanoly group at amino acid serine 3. The nucleic acid ligand of the amino-terminal motif GSSFL disclosed herein allows the discrimination of the biologically active from the bio-inactive or non-bioactive

form of ghrelin. This is surprising, since binding is strictly dependent on the presence of two moieties, the octanoyl group and the peptide: binding of the nucleic acid to octanoyl-ghrelin is specific in the presence of a 1000-fold excess of desoctanoyl-ghrelin, more preferable in the presence of a 100-fold excess of desoctanoyl-ghrelin, and most preferable in the presence of a 10-fold excess of desoctanoyl-ghrelin. Furthermore, the binding characteristics are also specific for the peptide moiety, given the fact, that the enantiomeric octanoyl-ghrelin is not recognized by the nucleic acid; the octanoyl-group is not sufficient for binding.

As used in preferred embodiments herein, a bioactive ghrelin is a ghrelin which exhibits in a preferred embodiment essentially all of the characteristics of the naturally occurring ghrelin. Particularly, a bioactive ghrelin as used herein in preferred embodiments is any ghrelin and ghrelin derivative which is responsible for or can trigger the release of growth hormone, more preferably via an interaction with the GHS receptor. In contrast to this in preferred embodiments a non-bioactive ghrelin is a ghrelin which is different from bioactive ghrelin, more preferably does not trigger the release of growth hormone, more preferably via an interaction with the GHS receptor.

The features of the nucleic acid according to the present invention as described herein can be realized in any aspect of the present invention where the nucleic acid is used, either alone or in any combination.

The nucleic acid according to the present invention also comprises nucleic acids which are essentially homologous to the particular sequences disclosed herein. The term substantially homologous shall be understood such as the homology is at least 75%, preferably 85%, more preferably 90% and most preferably more than 95 %, 96 %, 97 %, 98 % or 99%.

The nucleic acid according to the present invention also comprises in an embodiment a nucleic acid which is derived from the particular sequences disclosed herein. The term 'derived' shall be understood such as on the basis of SEQ. ID No.1 the insertion loci Ins1 to Ins4 shown in Fig. 1A can be represented by any sequence of a length of a maximum of 30 nucleotides, preferable by any sequence of a maximum of 20 nucleotides, more preferable by any sequence of a maximum of 10 nucleotides, and most preferable by any sequence of 0-3 nucleotides for Ins1, 0-14 nucleotides for Ins2, 1-3 nucleotides for Ins 3, and 0-2 nucleotides for Ins4. The internal loop IL_{1a}, represented by Ins2, is considered to be the most important site of modification.

The nucleic acid according to the present invention can also be represented in a preferred embodiment by the following generic formula

CGN₁₋₃GYGN₀₋₃AGGYAN₀₋₄AAAACN₁₋₃UAAKWCCTAAGGTAACCAWUCCUACN₀₋₃ACG
(SEQ. ID. No. 1)

whereby Y stands for U or C, R stands for A or G, W stands for U or A. In connection therewith it is to be noted that any of the indices represent any integer starting from the first figure specified to the last figure specified and any integer therebetween. Accordingly, e.g. 0 - 3 represent 0, 1, 2 and 3.

Thus, the consensus sequence SEQ. ID. No. 1 contains four regions, where insertions of variable length are observed in various embodiments. These regions are called insertion loci, and are labelled Ins1 to Ins4. According to J-NOX-B11, listed as SEQ. ID. No. 2 in Fig. 1A, Ins1 is located at between nucleotides 6 and 7, Ins2 is located between nucleotides 13 and 14, Ins3 is located between nucleotides 18 and 20, and Ins4 is located between nucleotides 44 and 45. The length of the respective insertion loci, observed in the depicted clones, is given in SEQ. ID. No. 1, and the above specified generic formula.

The nucleic acid according to the present invention also comprises in an embodiment a nucleic acid which is structurally homologous to the particular sequences disclosed herein, preferably to the extent that said parts are involved in binding to octanoyl-ghrelin and discriminating des-octanoyl ghrelin. Structural homology as used in connection with preferred embodiments of the present invention shall be understood such as the sequences fold into a characteristic secondary structure model comprising a basal stem, and internal loop, and a terminal stem-loop as depicted in Fig. 1B, preferably folding into said structure, where in stem regions compensatory base exchanges occur, and preferably folding into said structure, where in single-stranded stretches substitutions, deletions and/or insertions occur, and most preferably folding into said structure corresponding to Fig. 1B in size and to SEQ. ID. 1 in sequence.

The term inventive nucleic acid or nucleic acid according to the present invention shall also comprise those nucleic acids comprising part of the nucleic acids sequences disclosed herein, preferably to the extent that said parts are involved in the binding to ghrelin, and discriminating

bioactive ghrelin from non-bioactive ghrelin, i. e. in particular octanoyl-ghrelin from des-octanoyl-ghrelin. Such a nucleic acid may be derived from the ones disclosed herein, e.g., by truncation. Truncation may be related to either or both of the ends of the nucleic acids as disclosed herein. Also, truncation may be related to the inner sequence of nucleotides, i.e. it may be related to the nucleotide(s) between the 5' and the 3' terminal nucleotide, respectively. Moreover, truncation shall comprise the deletion of as little as a single nucleotide from the sequence of the nucleic acids disclosed herein. Truncation may also be related to more than one stretch of the inventive nucleic acid(s), whereby the stretch can be as little as one nucleotide long.

The nucleic acids according to the present invention may be either D-nucleic acids or L-nucleic acids. Preferably, the inventive nucleic acids are L-nucleic acids. In addition it is possible that one or several parts of the nucleic acid are present as D-nucleic acids or at least one or several parts of the nucleic acids are L-nucleic acids. The term "part" of the nucleic acids shall mean as little as one nucleotide. Such nucleic acids are generally referred to herein as D- and L-nucleic acids, respectively.

The term inventive nucleic acid or nucleic acid according to the present invention shall also comprise those nucleic acids that comprise the nucleic acids sequences disclosed herein and other sequences attached thereto, preferably to the extent that said parts or nucleic acids are involved in the binding to octanoyl-ghrelin and discriminating desoctanoyl-ghrelin. The extension i. e. additional sequences attached to the specific nucleic acid sequences disclosed herein may be such, that the sequence is elongated either at the 5'-terminus or the 3'-terminus or both, and it may comprise as much as 100 nucleotides for either side, preferably as much as 50 nucleotides for either side, more preferably as much as 20 nucleotides on either side, and most preferably the complete or partial 5'-flank sequence which is disclosed herein as SEQ. ID. No. 20, and/or the complete or partial 3'-flank sequence which is disclosed herein as SEQ. ID. No. 21. As used herein, the term partially means in a preferred embodiment of the present invention a single nucleotide of the respective sequence or a sequence of two or more nucleotides of each sequence which are adjacent to each other in the sequence to which it is referred to, more particularly to the flank sequences according to any of SEQ. ID. No. 20 and 21.

It is also within the present invention that the nucleic acids according to the present invention are part of a longer nucleic acid whereby this longer nucleic acid comprises several parts whereby at

least one part is a nucleic acid, or a part thereof, according to the present invention. The other part of these longer nucleic acids can be either a D-nucleic acid or L-nucleic acid. Any combination may be used in connection with the present invention. These other part(s) of the longer nucleic acid can exhibit a function which is different from binding. One possible function is to allow interaction with other molecules such as, e.g., for immobilization, cross-linking, detection or amplification.

L-nucleic acids as used herein are nucleic acids consisting of L-nucleotides, preferably consisting completely of L-nucleotides.

D-nucleic acids as used herein are nucleic acids consisting of D-nucleotides, preferably consisting completely of D-nucleotides.

Irrespective of whether the inventive nucleic acid consists of D-nucleotides, L-nucleotides or a combination of both with the combination being e.g. a random combination or a defined sequence of stretches consisting of at least one L-nucleotide and at least one D-nucleic acid, the nucleic acid may consist of deoxyribonucleotide(s), ribonucleotide(s) or combinations thereof.

Designing the inventive nucleic acids as L-nucleic acid is advantageous for several reasons. L-nucleic acids are enantiomers of naturally occurring nucleic acids. D-nucleic acids, however, are not very stable in aqueous solutions and particularly in biological systems or biological samples due to the widespread presence of nucleases. Naturally occurring nucleases, particularly nucleases from animal cells are not capable of degrading L-nucleic acids. Because of this the biological half-life of the L-nucleic acid is significantly increased in such a system, including the animal and human body. Due to the lacking degradability of L-nucleic acid no nuclease degradation products are generated and thus no side effects arising therefrom observed. This aspect delimits the L-nucleic acid of factually all other compound which are used in the therapy of diseases and/or disorders involving the presence of ghrelin.

It is also within the present invention that the inventive nucleic acids, regardless whether they are present as D-nucleic acids, L-nucleic acids or D,L-nucleic acids or whether they are DNA or RNA, may be present single stranded or double stranded nucleic acids. Typically, the inventive nucleic acids are single stranded nucleic acids which exhibit defined secondary structures due to the primary sequence and may thus also form tertiary structures. The inventive nucleic acids,

however, may also be double stranded in the meaning that two strands which are complementary to each other are hybridised to each other. This confers stability to the nucleic acid which will be advantageous if the nucleic acid is present in the naturally occurring D-form rather than the L-form.

The inventive nucleic acids may be modified. Such modifications may be related to the single nucleotide of the nucleic acid and are well known in the art. Examples for such modification are described in, among others, Kusser, W. (2000) *J Biotechnol*, 74: 27-38; Aurup, H. et al. (1994) *Nucleic Acids Res*, 22, 20-4; Cummins, L.L. et al. (1995) *Nucleic Acids Res*, 23, 2019-24; Euton, 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.R. et al. (1993) *J Physiol*, 469, 213-43.

The nucleic acids according to the present invention may be a multipartite nucleic acid. A multipartite nucleic acid as used herein, is a nucleic acid which consists of at least two nucleic acid strands. These at least two nucleic acid strands form a functional unit whereby the functional unit is a ligand to a target molecule. The at least two nucleic acid strands may be derived from any of the inventive nucleic acids by either cleaving the nucleic acid to generate two strands or by synthesising one nucleic acid corresponding to a first part of the inventive, i.e. overall nucleic acid and another nucleic acid corresponding to the second part of the overall nucleic acid. It is to be acknowledged that both the cleavage and the synthesis may be applied to generate a multipartite nucleic acid where there are more than two strands as exemplified above. In other words, the at least two nucleic acid strands are typically different from two strands being complementary and hybridising to each other although a certain extent of complementarity between the various nucleic acid parts may exist.

A possibility to determine the binding constant is the use of the so called bioassay device, which is also known to the one skilled in the art. Affinity as used herein was also measured by the use of "head assays" as described in example 5. An appropriate measure in order to express the intensity of the binding between the nucleic acid according to the target which is in the present case ghrelin, is the so-called K_d value which as such as well the method for its determination are known to the one skilled in the art.

The nucleic acids according to the present invention are characterized by a certain K_d value. Preferably, the K_d value shown by the nucleic acids according to the present invention is below 1 μ M. A K_d value of about 1 μ M is said to be characteristic for a non-specific binding of a nucleic acid to a target. As will be acknowledged by the ones in the art, the K_d value of a group of compounds such as the nucleic acids according to the present invention are within a certain range. The above-mentioned K_d of about 1 μ M is a preferred upper limit for the K_d value. The preferred lower limit for the K_d of target binding nucleic acids can be about 10 picomolar or higher. It is within the present invention that the K_d values of individual nucleic acids discriminating bioactive ghrelin from non-bioactive ghrelin, i. e. preferably octanoyl-ghrelin from desoctanoyl-ghrelin are within this range of 10 pM to 1 μ M, more preferred within a range of 100 pM to 500 nM, and most preferred within a range of 1 nM to 100 nM.

The nucleic acid molecules according to the present invention may have any length provided that they are still able to bind to the target molecule, and discriminate bioactive ghrelin from non-bioactive ghrelin, i. e. preferably octanoyl-ghrelin from desoctanoyl-ghrelin. It will be acknowledged in the art that there are preferred lengths of the nucleic acids according to the present inventions. Typically, the length is between 15 and 120 nucleotides. It will be acknowledged by the ones skilled in the art that any integer between 15 and 120 is a possible length for the nucleic acids according to the present invention. More preferred ranges for the length of the nucleic acids according to the present invention are lengths of about 20 to 100 nucleotides, about 20 to 80 nucleotides, about 20 to 60 nucleotides, about 20 to 50 nucleotides and about 30 to 50 nucleotides.

The assays for discrimination of bioactive and bio-inactive ghrelin according to the present invention may be performed using standard techniques as known by persons skilled in the art. In a preferred aspect, the assays may be performed in 96-well plates, where components are immobilized in the reaction vessels as disclosed according to the claims. Optionally, the complexes can be removed from the reaction vessels after complex formation.

In one aspect, the nucleic acid molecule according to the invention is analysed by a second detection means, wherein the said detection means is a molecular beacon. The methodology of molecular beacon is known to persons skilled in the art. In brief, nucleic acids probes which are also referred to as molecular beacons, are a reverse complement to the nucleic acids sample to be detected and hybridize because of this to a part of the nucleic acid sample to be detected. Upon

binding to the nucleic acid sample the fluorophoric groups of the molecular beacon are separated which results in a change of the fluorescence signal, preferably a change in intensity. This change correlates with the amount of nucleic acids sample present.

The inventive nucleic acids, which are also referred to herein as the nucleic acids according to the present invention, and/or the antagonists according to the present invention may be used for the generation or manufacture of a medicament. Such medicament contains at least one of the inventive nucleic acids, optionally together with further pharmaceutically active compounds, whereby the inventive nucleic acid preferably acts as pharmaceutically active compound itself. Such medicaments comprise in preferred embodiments at least a pharmaceutically acceptable carrier. Such carrier may be, e. g., water, buffer, starch, sugar, gelatine or any other acceptable carrier substance. Such carriers are generally known to one skilled in the art. Disease and/or disorders and/or diseased conditions for the treatment and/or prevention of which such medicament may be used include, but are not limited to obesity, the regulation of energy balance, appetite and body weight, eating disorders, diabetes, glucose metabolism, tumour, blood pressure and cardiovascular diseases. As will be acknowledged by the ones of the art the inventive nucleic acids may factually be used in any disease where an antagonist to ghrelin can be administered to a patient in need of such antagonist and such antagonist is suitable to eliminate the cause of the disease or the disorder or at least to reduce the effects from the disease or the disorder. Such effect includes, but is not limited to obesity, the regulation of energy balance, appetite and body weight, eating disorders, diabetes, glucose metabolism, tumour treatment, blood pressure and cardiovascular diseases. For the purpose of the present invention regulation of energy balance is regarded as a disease. More particularly, the use is for the treatment of any disease where the regulation of the energy balance is influenced by ghrelin, either directly or indirectly, and whereby reduction of the bioavailability of ghrelin is desired. The same applies to sugar metabolism, blood pressure and appetite and body weight. Further disease which may be treated using the nucleic acids according to the present invention, possibly upon systemic or local application are those which can be selected from the group comprising pituitary tumors, acromegaly, central Cushing's syndrome, adrenal Cushing's syndrome, paraneoplastic Cushing's syndrome, ectopic Cushing's syndrome, adrenal tumor, stress, hypercortisolism, cardiac insufficiency, cardiac infarction, stroke, adrenocortical insufficiency, hypotonia, aortic stenosis, pulmonary hypertension, constrictive pericarditis, infectious diseases, infectious toxic hypotonia, hypovolemia, and hyponatremia.

It is to be understood that the nucleic acid as well as the antagonists according to the present invention can be used not only as a medicament or for the manufacture of a medicament, but also for cosmetic purposes, particularly with regard to the involvement of ghrelin in obesity. For the same purpose the nucleic acid as well as the antagonists according to the present invention can be used as a food additive, a means for weight control and/or a means for appetite control. A composition comprising the nucleic acid as well as the antagonists according to the present invention can be used for any of the aforementioned purposes.

The inventive nucleic acid may further be used as starting material for drug design. Basically there are two possible approaches. One approach is the screening of compound libraries whereas such compound libraries are preferably low molecular weight compound libraries. Such libraries are known to the one skilled in the art. Alternatively, the nucleic acid according to the present invention may be used for rational design of drugs.

The rational design of drugs may start from any of the nucleic acid according to the present invention and involves a structure, preferably a three dimensional structure, which is similar to the structure of the inventive nucleic acids or identical to the binding mediating parts of the structure of the inventive nucleic acids. In any case such structure still shows the same or a similar binding characteristic as the inventive nucleic acids. In either a further step or as an alternative step in the rational design of drugs the preferably three dimensional structure of those parts of the nucleic acids binding to the neurotransmitter are mimicked by chemical groups which are different from nucleotides and nucleic acids. By this mimicry a compound different from the nucleic acids can be designed. Such compound is preferably a small molecule or a peptide.

In case of screening of compound libraries, such as by using a competitive assay which are known to the one skilled in the arts, appropriate ghrelin analogues, ghrelin agonists or ghrelin antagonists may be found. Such competitive assays may be set up as follows. The inventive nucleic acid, preferably a Spiegelmer which is a target binding L-nucleic acid, is coupled to a solid phase. In order to identify ghrelin analogues labelled ghrelin may be added to the assay. A potential analogue would compete with the ghrelin molecules binding to the Spiegelmer which would go along with a decrease in the signal obtained by the respective label. Screening for agonists or antagonists may involve the use of a cell culture assay as known to the ones skilled in the art.

The kit according to the present invention may comprise at least one or several of the inventive nucleic acids. Additionally, the kit may comprise at least one or several positive or negative controls. A positive control may, for example, be ghrelin, particularly the one against which the inventive nucleic acid is selected or to which it binds, preferably, in liquid form. A negative control may, e.g., be a peptide which is defined in terms of biophysical properties similar to ghrelin, but which is not recognized by the inventive nucleic acids. Furthermore, said kit may comprise one or several buffers. The various ingredients may be contained in the kit in dried or lyophilised form or solved in a liquid. The kit may comprise one or several containers which in turn may contain one or several ingredients of the kit.

It is to be understood that any of the sequences disclosed in the examples and the figures, respectively, is disclosed as such and any such sequence can be used in any aspect and embodiment of the present invention.

The present invention is further illustrated by the figures, examples and the sequence listing from which further features, embodiments and advantages may be taken, wherein

- Fig. 1A shows the members of the L-NOX-B11 group, their name, the frequency by which they were selected, and their truncated sequence, which may alternatively be extended by the 5'-flank 5'-GGAGCUCAGACUUCACU-3' (SEQ. ID. No. 20) and the 3'-flank 5'-UACCACUGUCGGUCCAC-3' (SEQ. ID. No. 21), and indicates the insertion loci Ins1 to Ins4;
- Fig. 1B shows the secondary structure model of the truncated clone L-NOX-B11 and indicates the regions of the basal stem, the 5'- and the 3'-part of the internal loop (IL Ia, IL Ib), and the terminal stem-loop;
- Fig. 2 shows the dose-dependent calcium release mediated by octanoyl- or desoctanoyl-ghrelin in the full-length or the truncated form in a cellular assay using CHO cells expressing human ghrelin receptor (dose-response titration);
- Fig. 3 shows the inhibition of calcium release mediated by full-length and truncated octanoyl-ghrelin by the Spiegelmer L-NOX-B11 (inhibition curve);

- Fig. 4 shows the results of a cellular competition assay with octanoyl-ghrelin, desoctanoyl-ghrelin, and L-NOX-B11, with combinations and concentrations of the components summarized below the bars;
- Fig. 5 shows the results of a cellular competition assay with octanoyl-ghrelin (1-5), desoctanoyl-ghrelin (1-5), and L-NOX-B11, with combinations and concentrations of the components summarized below the bars;
- Fig. 6 shows results of an *in vitro* binding assay, analysing the binding of radio-labelled D-NOX-B11 and L-NOX-B11 to biotinylated D-octanoyl-ghrelin.

The following table links the SEQ. ID. Numbers to the various clones and identifiers, respectively, described herein. Nucleic acids sequences, if not indicated in a contrary way, are represented as the (+) strands and built by 2'OH-ribonucleotides.

Table:

Sequence	Sequence type	SEQ. ID. No
consensus sequence L-NOX-B11 group	nucleic acid	1
L-NOX-B11	nucleic acid	2
L-NOX-G2	nucleic acid	3
L-NOX-B12	nucleic acid	4
L-NOX-B7	nucleic acid	5
L-NOX-A8	nucleic acid	6
L-NOX-B12	nucleic acid	7
L-NOX-E3	nucleic acid	8
L-NOX-C12	nucleic acid	9
L-NOX-C11	nucleic acid	10
L-NOX-A3	nucleic acid	11
L-NOX-F5	nucleic acid	12
L-NOX-A12	nucleic acid	13
L-NOX-F12	nucleic acid	14
L-NOX-G5	nucleic acid	15
ghrelin (human)	peptide	16
human ghrelin (1-10)	peptide	17
human ghrelin (1-5)	peptide	18
ghrelin (rat)	peptide	19
5'-flank sequence	nucleic acid	20
3'-flank sequence	nucleic acid	21

Example 1: Ghrelin-binding nucleic acid ligands

In the European Patent Application BP 020 23 627.8 and the International Patent Application PCT/EP03/08542 the generation of ghrelin-binding nucleic acid ligands is described. One group of such nucleic acid ligands, obtained in the selection process is shown in Fig 1A. The clone L-NOX-B11 is the most abundant sequence in this group, and – like all the other members of the group – is functional in a long and a truncated version (L-NOX-B11 [86] and L-NOX-B11 [47]). For elongation of the truncated clones, the 5'-flank and the 3'-flank sequences may be added to the core sequence shown.

5'-flank 5'-GGAGCUCAGACUUCACU-3' SEQ. ID. No. 20

3'-flank 5'-UACCACUGUCGGUCCAC-3' SEQ. ID. No. 21

In Fig. 1A the truncated versions only are summarized, and in this patent application, results concerning these truncated clone are presented only. However, characteristics of L-NOX-B11 [47] disclosed herein do also concern all elongated versions of all truncated sequences.

The individual clones in the L-NOX-B11-group are highly conserved and show long stretches of sequence identity. The following consensus sequence can be gained from the clones shown in Figure 1A:

CGUGYGN₍₈₋₂₇₎AGGYAN₍₁₂₋₁₄₎AAAACN₍₇₋₂₃₎UAARWCCGAAGGUAACCAWUCCTACN₍₁₂₋₂₇₎ACG
(SEQ. ID. No. 1)

where Y stands for U or C, R stands for A or G, W stands for U or A.

As can be seen, nucleotide substitution are found only in a few positions. Furthermore, there are 4 defined regions, where sequence insertion occurs; these insertion loci are labelled Ins1 to Ins4 and correspond to the letters 'N_(x-y)' in SEQ. ID. No.1.. At these positions any nucleotide in any number, preferable in a number given in the brackets in SEQ. ID. No.1, may be inserted. In the insertion locus 2, the preferred nucleotide inserted is an adenosin residue.

The sequence of L-NOX-B11 folds into a characteristic secondary structure shown in Fig. 1B, comprising a basal stem, an internal loop, and a terminal stem-loop structure. A detailed analysis of all sequences within the group shows, that the insertion loci of the sequence mainly fall into the region of the internal loop (Ins2). The terminal stem-loop as well as the basal stem are always identical and seem to be highly characteristic for this family of ghrelin-binding molecules

and their specific features. It need be mentioned, that several sequence substitutions, obvious for a person skilled in the art, that do not or only slightly disrupt the secondary structure given in Fig. 1B, can be done, without loss of the specific function of the nucleic acid, namely in discriminating bioactive ghrelin from the bio-inactive one. In several selections disclosed in the European Patent Application EP 020 23 627.8 and the International Patent Application PCT/EP03/08542, these kind of modified sequences were found. Features described for L-NOX-B11 can be transferred to those sequences, that are sufficiently conserved regarding sequence and structure.

Example 2: Method to analyze the ghrelin-induced calcium-release

Functional characterization of ghrelin-binding Spiegelmers is performed in a cellular assay system monitoring the interaction of ghrelin and the human growth hormone secretagogue receptor (GHS-R). The intracellular calcium release resulting from receptor-ligand interaction is visualized by means of a fluorescent calcium indicator.

Stable transfected CHO-cells expressing the human ghrelin receptor (GHS-R1a) (obtained from Euroscreen, Gosselies, Belgium) are seeded with $5 - 7 \times 10^4$ cells per well in a black 96 well-plate with clear bottom (Greiner) and cultivated overnight at 37°C and 5% CO₂ in UltraCHO medium (Cambrex) which contained in addition 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 400 µg/ml geneticin and 2.5 µg/ml fungizone.

Before loading with the calcium indicator dye fluo-4, cells are washed once with 200 µl CHO-U+ (5 mM probenecid, 20 mM HEPES in UltraCHO medium). Then 50 µl of the indicator dye solution (10 µM fluo-4 (Molecular Probes), 0.08 % pluronic 127 (Molecular Probes) in CHO-U+) are added and the cells are incubated for 60 min at 37°C. Thereafter cells are washed three times with 180 µl CHO-U+. Finally 90 µl CHO-U+ are added per well.

In the stimulation assay, full-length or truncated versions of human or rat L-ghrelin, either in the octanoyl- or desoctanoyl-form, are used as indicated [L-ghrelin and desoctanoyl-L-ghrelin were obtained from Bachem (Basel, Switzerland), and L-ghrelin (1-5), L-ghrelin (1-10), and desoctanoyl-L-ghrelin (1-5) were from Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA)].

The respective peptides are incubated in CHO-U+ for 15 to 60 min at room temperature in a 0.2 ml low profile 96-tube plate. In these stimulation solutions, the peptide is 10-fold concentrated compared to the assay. For detection of calcium release, the stimulation solution is added to the cells (10 μ l/well), and the change of the fluorescence signal is monitored. Measurement of fluorescence signals is done at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm in a Fluostar Optima multidetection plate reader (BMG).

For parallel measurement of several samples, wells of one (perpendicular) row of a 96 well plate are recorded together. First three readings with a time lag of 4 sec are done for determination of the base line. Then the recording is interrupted and the plate is moved out of the instrument. Using a multi-channel pipette, 10 μ l of the stimulation solution is added to the wells, then the plate is moved into the instrument again and the measurement is continued. In total 20 recordings with time intervals of 4 sec are performed.

For each well the difference between maximal fluorescence and base line value ($F_{max}-F_{min}$) is determined and plotted against ghrelin concentrations. In Figure 2, the dose response curves of human octanoyl- and desoctanoyl-ghrelin (full-length and truncated peptide) are shown. It turns out, that both, the full-length and the truncated octanoyl-ghrelin induce calcium release, however, to different extents: full length octanoyl-ghrelin shows maximal activity at a concentration of 30 nM, while octanoyl-ghrelin 1-5 only stimulates at higher peptide concentrations and does not reach maximal signal intensity in the concentration range observed. The desoctanoyl-forms of both peptides do not stimulate the human ghrelin receptor at any concentration analysed in the assay. This experiments confirms, that the five N-terminal amino acids of ghrelin are sufficient for stimulation of the human ghrelin receptor, and that the octanoyl-group is essential for the biologic activity of ghrelin.

Example 3: Inhibition of ghrelin-induced calcium-release by ghrelin-binding Spiegelmers

Inhibition of ghrelin-induced calcium release was measured using the cellular assay described in Example 2. As a modification of the method, the stimulation solutions in the inhibition assay were supplemented with variable amounts of the Spiegelmer L-NOX-B11. As a control, samples with peptide only (maximal calcium release) and samples without peptide (minimal calcium release) were analysed. After incubation for 15-60 minutes at room temperature, 10 μ l of the

stimulation solutions were added to the cells, resulting in a peptide final concentration of 5 nM. Usually Spiegelmer final concentrations of 0.1 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, and 100 nM were chosen.

For each well the difference between maximal fluorescence and base line value ($F_{\max} - F_{\min}$) is determined. The values for 100 % activity (no inhibition) and 0 % activity (complete inhibition) can be obtained from control samples (samples 'peptide only' and 'no peptide'). For all other samples the corresponding activity is calculated in 'per cent' and plotted against the Spiegelmer concentration (inhibition curve), allowing the determination of the half-maximal inhibition constant (IC₅₀).

Figure 3 shows the inhibition curves resulting from an experiment, that analyses the inhibitory activity of L-NOX-B11 with full-length and truncated forms of octanoyl-ghrelin. It turns out, that the Spiegelmer inhibits the activity of all forms of octanoyl-ghrelin tested: the full-length peptide, ghrelin 1-10, and ghrelin 1-5. The IC₅₀ values show no significant deviation for all three peptides (full-length ghrelin: 7 nM, ghrelin 1-10: 9 nM, ghrelin 1-5: 5 nM). It can be concluded, that the binding region of the Spiegelmer is located at the N-terminus of ghrelin, comprising the amino acids 1-5. Binding of L-NOX-B11 to this minimal motive results in efficient inhibition of ghrelin biological activity in the cellular assay.

Example 4: Discrimination of octanoyl-ghrelin and desoctanoyl-ghrelin by ghrelin-binding Spiegelmers

The characteristics of the binding of Spiegelmer L-NOX-B11 to ghrelin were further analysed in a competition assay, based on the method described in Example 3. In these assays, the Spiegelmer was incubated with different combinations of ghrelin peptides in the stimulation solutions prior to stimulation of cells.

The scheme of peptide combinations and the results of the experiment with full-length ghrelin are summarized in Fig. 4 (bars numbered from left to right): without any ghrelin, or with desoctanoyl-ghrelin in a final concentration of 300 nM, no stimulation of cells can be detected (bars 1 and 2), while already octanoyl-ghrelin in a concentration of 10 nM is sufficient for mediating calcium release (bar 3); further addition of 300 nM desoctanoyl-ghrelin (bar 4) does

increased calcium release (bar 7), giving evidence that under assay conditions a stimulation enhancement with octanoyl-ghrelin can be achieved. This experiment demonstrates, that L-NOX-B11 specifically discriminates between ghrelin in the octanoyl-form and the desoctanoyl-form.

The experiment was repeated with ghrelin 1-5 instead of the full-length peptide, showing identical results (Fig. 5). However, depending on the weaker stimulatory activity of ghrelin 1-5, the signals are comparatively lower.

Example 5: Requirements for binding of L-NOX-B11 to octanoyl-ghrelin

The binding site for L-NOX-B11 on octanoyl-ghrelin is located at the N-terminus of the peptide (compare Example 3) and involves the octanoyl-group (compare Example 4). The importance and involvement of both components for the binding event, peptide and fatty acid group, is shown in the following experiment.

The rationale of this experiment is, that Spiegelmers bind their target peptides in an enantio-specific manner, and the octanoyl-group itself is an achiral group. If the fatty acid portion of ghrelin alone was sufficient for binding the Spiegelmer, the binding event would not be enantio-selective concerning the peptide portion; then D-NOX-B11 and L-NOX-B11 should bind D-octanoyl-ghrelin in a similar manner.

NOX-B11 was chemically synthesized as L- and D-RNA and radio-labelled using T4-Polynucleotidekinase (Invitrogen, Karlsruhe) with γ - 32 [P]-ATP (Hartmann Analytic, Braunschweig). RNA was purified on a 10% denaturing polyacrylamide gel and 0,5-5 pmol RNA were incubated with 5 μ M of biotinylated D-ghrelin in binding buffer [20mM Tris/HCl, pH 7,4; 150mM NaCl; 5mM KCl; 1mM MgCl₂; 1mM CaCl₂; 0,1 % Tween-20] for 2h at 37°C. The comparably high peptide concentration was chosen to allow monitoring of even weak

It turned out, that the D-NOX-B11 specifically binds to D-octanoyl-ghrelin (bars 1 and 2), whereas the corresponding L-enantiomer fails (bars 3 and 4). This result indicates that the octanoyl residue mainly serves as a hydrophobic group, presenting the N-terminal GSSEFL motive of the L-octanoyl-ghrelin in a conformation where the spiegelmer L-NOX-B11 efficiently binds. Both, the peptide and the octanoyl-part of L-octanoyl-ghrelin are necessary for binding L-NOX-B11.

The features of the present invention disclosed in the specification, the claims and/or the drawings may both separately and in any combination thereof be material for realizing the invention in various forms thereof.

2. The nucleic acid which specifically binds to a bioactive ghrelin.
3. The nucleic acid according to claim 1, whereby the nucleic acid does not specifically bind to a bioactive ghrelin.
4. The nucleic acid according to claim 2 or claim 3, whereby the specific binding is expressed as the K_d value, whereby the K_d of the nucleic acid is from 10 μM to 1 μM , more preferable from 100 μM to 500 nM, and most preferable from 1 nM to 100 nM.
5. The nucleic acid according to any of claims 1 to 4, whereby the bioactive ghrelin is n-octanoyl ghrelin.
6. The nucleic acid according to claim 5, wherein the n-octanoyl moiety of the n-octanoyl ghrelin is attached through an ester bond to Ser at position 3 of ghrelin.
7. The nucleic acid according to any of claims 1 to 6, whereby the nucleic acid is a L-nucleic acid, preferably a Spiegelmer.
8. The nucleic acid according to any of claims 1 to 7, whereby the nucleic acid is selected from the group comprising deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and mixtures thereof.
9. The nucleic acid according to any of claims 1 to 8, whereby the nucleic acid has a secondary structure shown in Fig. 1B.
10. The nucleic acid according to any of claims 1 to 9, whereby the nucleic acid is variable in the internal loop structure of the secondary structure shown in Fig. 1B.
11. The nucleic acid according to any of claims 1 to 10, whereby the nucleic acid comprises, preferably consists of, a sequence according to SEQ. ID. No 1.

12. The nucleic acid according to any of claims 1 to 11, whereby the nucleic acid comprises, preferably consists of, the sequence according to SEQ. ID. No. 2 to SEQ. ID. No. 15.
13. Use of a nucleic acid according to any of the preceding claims for the binding of bioactive ghrelin.
14. Use according to claim 13, whereby the binding is selective for bioactive ghrelin with a K_d of the nucleic acid from 10 pM to 1 μ M, more preferable from 100 pM to 500 nM, and most preferable in the range of 1 nM to 100 nM.
15. Use according to claim 13 or 14, whereby the binding excludes the binding of ghrelin different from bioactive ghrelin in the presence of a 1000-fold excess of bio-inactive ghrelin over bioactive ghrelin, more preferable in the presence of 100-fold excess of bio-inactive ghrelin over bioactive ghrelin, and most preferable in the presence of 10-fold excess of bio-inactive ghrelin over bioactive ghrelin.
16. Use according to any of claims 13 to 15, whereby the bioactive ghrelin is n-octanoyl ghrelin.
17. Use according to any of claims 13 to 16, whereby the binding is an *in vivo* or an *in vitro* binding.
18. Use of a nucleic acid according to any of claims 1 to 12 for the detection of bioactive ghrelin.
19. Use according to claim 18, whereby the bioactive ghrelin is specifically detected.
20. Use according to claims 18 or 19, whereby the non-bioactive ghrelin is not detected by the nucleic acid, preferably not specifically detected by the nucleic acid.
21. Use according to any of claims 18 to 20, whereby the bioactive ghrelin and/or the non-bioactive ghrelin is detected *in vivo* and/or *in vitro*.

22. Use of a nucleic acid according to any of claims 1 to 12 for the inhibition of bioactive ghrelin.
23. Use according to claim 22, whereby the bioactive ghrelin is specifically inhibited.
24. Use according to claim 23, whereby the non-bioactive ghrelin is not inhibited by the nucleic acid, preferably not specifically inhibited by the nucleic acid.
25. Use according to any of claims 22 to 24, whereby the bioactive ghrelin is n-octanoyl ghrelin.
26. Use according to any of claims 22 to 25, whereby the inhibition is an *in vitro* and/or an *in vivo* inhibition.
27. Use of a nucleic acid according to any of claims 1 to 12 for the manufacture of a medicament.
28. Use according to claim 27, whereby the medicament is for the treatment and/or prevention of a disease and/or a disorder.
29. Use according to claim 28, whereby the disease and/or disorder is selected from the group comprising obesity, regulation of energy balance, appetite, body weight, eating disorders, diabetes, glucose metabolism, tumor, blood pressure, and cardiovascular disease.
30. Use according to claim 28 or 29, whereby the disease and/or disorder is mediated by a bioactive ghrelin.
31. A method for the detection of bioactive ghrelin, comprising the following steps:
- (a) providing a sample which is to be tested for the presence of bioactive ghrelin,
 - (b) providing a nucleic acid according to any of the claims 1 to 12,
 - (c) reacting the sample with the nucleic acid,

28.

whereby step (a) can be performed prior to step (b), or step (b) can be performed prior to step (a).

32. The method according to claim 31, wherein a further step (d) is provided:

(d) detecting the reaction of the sample with the nucleic acid.

33. The method according to claim 32, wherein the nucleic acid of step (b) is immobilized to a surface.

34. The method according to claim 33, wherein the nucleic acid is immobilized to a surface via a covalent chemical bond between the surface and the nucleic acid.

35. The method according to claim 34, wherein the nucleic acid is immobilized to a surface by an interaction partner of the nucleic acid.

36. The method according to claim 35, wherein the interaction partner is selected from the group comprising nucleic acids, polypeptides, proteins and antibodies.

37. The method according to claim 36, wherein the interaction partner is an antibody, preferably a monoclonal antibody, whereby the antibody is binding to the nucleic acid according to any of claims 1 to 12.

38. The method according to claim 36, wherein the interaction partner is a nucleic acid, preferably a functional nucleic acid.

39. The method according to claim 38, wherein the functional nucleic acid is selected from the group comprising aptamers, spiegelmers, and nucleic acids which are at least partially complementary to the nucleic acid.

40. The method according to claim 33, wherein the nucleic acid comprises a first member of a pair of interaction partners and the surface comprises a second member of the pair of interaction partners.

41. The method according to claim 40, wherein the pair of interaction partners are selected from the group of interaction partners comprising biotin and avidin, biotin and streptavidin, and biotin and neutravidin.
42. The method according to claim 41, wherein the first member of the pair of interaction partners is biotin.
43. The method according to any of claims 33 to 42, wherein an immobilized complex of bioactive ghrelin and the nucleic acid is formed.
44. The method according to claim 43, wherein the complex is detected.
45. The method according to claim 44, wherein the bioactive ghrelin is detected.
46. The method according to claim 45, wherein the bioactive ghrelin is detected by a detection means which is specific for bioactive ghrelin.
47. The method according to claim 46, wherein the bioactive ghrelin is detected by a detection means which detects both bioactive ghrelin and non-bioactive ghrelin.
48. The method according to any of claims 44 to 47, wherein the detection means is selected from the group comprising nucleic acids, polypeptides, proteins and antibodies.
49. The method according to any of claims 44 to 48, wherein after the complex formation the sample is removed from the reaction vessel.
50. The method according to claim 32, wherein an interaction partner of bioactive and/or non-bioactive ghrelin is immobilized on a surface.
51. The method according to claim 50, wherein the interaction partner is selected from the group comprising nucleic acids, polypeptides, proteins and antibodies.
52. The method according to claim 51, wherein the interaction partner is capable of binding bioactive ghrelin and/or non-bioactive ghrelin.

53. The method according to claim 51 or 52, wherein the interaction partner is an antibody, preferably a monoclonal antibody.
54. The method according to claim 51 or 52, wherein the interaction partner is a functional nucleic acid.
55. The method according to claim 54, wherein the functional nucleic acid is selected from the group comprising aptamers and spiegelmers.
56. The method according to any of claims 50 to 55, wherein the interaction partner forms a complex with the bioactive and/or the non-bioactive ghrelin.
57. The method according to any of claims 50 to 56, wherein the bioactive ghrelin is detected by a detection means.
58. The method according to claim 57, wherein the detection means is a nucleic acid according to any of claims 1 to 12.
59. The method according to claim 58, wherein the nucleic acid is detected using a second detection means.
60. The method according to claim 59, wherein the second detection means is selected from the group comprising nucleic acids, polypeptides, proteins and antibodies.
61. The method according to claim 60, wherein the second detection means is an antibody, whereby preferably the antibody is specific for the nucleic acid.
62. The method according to claim 60, whereby the second detection means is a nucleic acid, preferably a molecular beacon.
63. The method according to claim 60, wherein the nucleic acid comprises a detection label.

64. The method according to claim 63, wherein the detection label is selected from the group comprising biotin, a bromo-deoxyuridine label, a digoxigenin label, a fluorescence label, a UV-label, a radio-label, and a chelator molecule.

65. The method according to claim 63, wherein the second detection means interacts with the detection label.

66. The method according to claim 65, wherein

the detection label is biotin and the second detection means is an antibody directed against biotin, or wherein

the detection label is biotin and the second detection means is an avidin or an avidin carrying molecule, or wherein

the detection label is biotin and the second detection means is a streptavidin or a streptavidin carrying molecule, or wherein

the detection label is biotin and the second detection means is a neutravidin or a neutravidin carrying molecule, or

wherein the detection label is a bromo-deoxyuridine and the second detection means is an antibody directed against bromo-deoxyuridine, or wherein

the detection label is a digoxigenin and the second detection means is an antibody directed against digoxigenin, or

wherein the detection label is a chelator and the second detection means is a radio-nuklide.

67. The method according to any of claims 50 to 66, wherein the second detection means is detected using a third detection means, preferably the third detection means is an enzyme, more preferably showing an enzymatic reaction upon detection of the second detection means, or the third detection means is a means for detecting radiation, more preferably radiation emitted by a radio-nuklide.

68. The method according to any of claims 56 to 67, wherein after complex formation the sample is removed from the reaction, more preferably from the reaction vessel where step (c) and/or step (d) are performed.

69. The method according to claim 32, wherein the nucleic acid according to any of claims 1 to 12 comprises a fluorescence moiety and whereby the fluorescence of the fluorescence moiety is different upon complex formation between the nucleic acid and bioactive ghrelin and free bioactive ghrelin.

70. The method according to claim 32 and 69, wherein the nucleic acid is a derivative of the nucleic acid according to any of claims 1 to 12, whereby the derivative of the nucleic acid comprises at least one fluorescent derivative of adenosine replacing adenosine.

71. The method according to claim 70, wherein the fluorescent derivative of adenosine is ethenoadenosine.

72. The method according to any of claims 69 to 71, wherein the complex consisting of the derivative of the nucleic acid according to any of claims 1 to 12 and the bioactive ghrelin is detected using fluorescence.

73. The method according to any of claims 31 to 72, wherein the bioactive ghrelin is n-octanoyl ghrelin.

74. The method according to any of claims 31 to 73, wherein the non-bioactive ghrelin is ghrelin which is different from n-octanoyl ghrelin.

75. The method according to any of claims 31 to 74, wherein a signal is created in step (c) or step (d) and preferably the signal is correlated with the concentration of bioactive ghrelin in the sample.

76. The method according to any of claims 31 to 75, wherein the sample is selected from the group comprising blood, plasma, serum, liquor, and tissues.

77. The method according to any of claims 31 to 76, wherein the method is a diagnostic method or prognostic method.

78. The method according to claim 77, wherein the method is for diagnosing, staging, and/or prognosing a disease and/or a disorder, whereby preferably said disease and/or disorder is selected from the group comprising obesity, regulation of energy balance, appetite, body weight, eating disorders, diabetes, glucose metabolism, tumor, blood pressure, and cardiovascular disease.

name	sequence	frequency	Seq. ID
B11	CGUGUG---AGGCAAU-----AAAACU--UAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC--ACG	65	2
G2	CGUGUG---AGGCAAGU-----AAAACU--UAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC--ACG		1
B12	CGUGUG---AGGCAAU-----AAAACU--UAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC--ACG	1	4
B7	CGUGUG---AGGCAAU-----AAAACG--UAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC--ACG	2	5
A8	CGUGUG---AGGCAAU-----AAAACG--UAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC--ACG	2	6
B12	CGUGUG---AGGCAAU-----AAAACUUGUAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC--ACG	1	7
E3	CGUGUG---AGGCAAU-----AAAACU--UAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC--ACG	5	8
C12	CGUGCGUGAGGCA-----AAAAC--GUAAGACCGAAGGUAACCAAUCCUACCCACG	1	9
C11	CGUGUG---AGGUAGUAAA-----AAAAC--GUAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC--ACG	2	10
A3	CGUGUG---AGGUAGUAAAAA-----AAAAC--GUAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC--ACG	2	11
P5	CGUGUG---AGGUAGUAAAAA-----AAAAC--GUAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC--ACG	1	12
A12	CGUGUG---AGGUAGUAAAAA-----AAAAC--GUAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC--ACG	1	13
F12	CGUGUG---AGGUAGUAAAAA-----AAAAC--GUAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC--ACG	2	14
G5	CGUGUG---AGGUAGUAAAAAAAAAAAAAAC--AUAAUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC--ACG	1	15
Ins1 ----Ins2---- Ins3			

Figure 1A

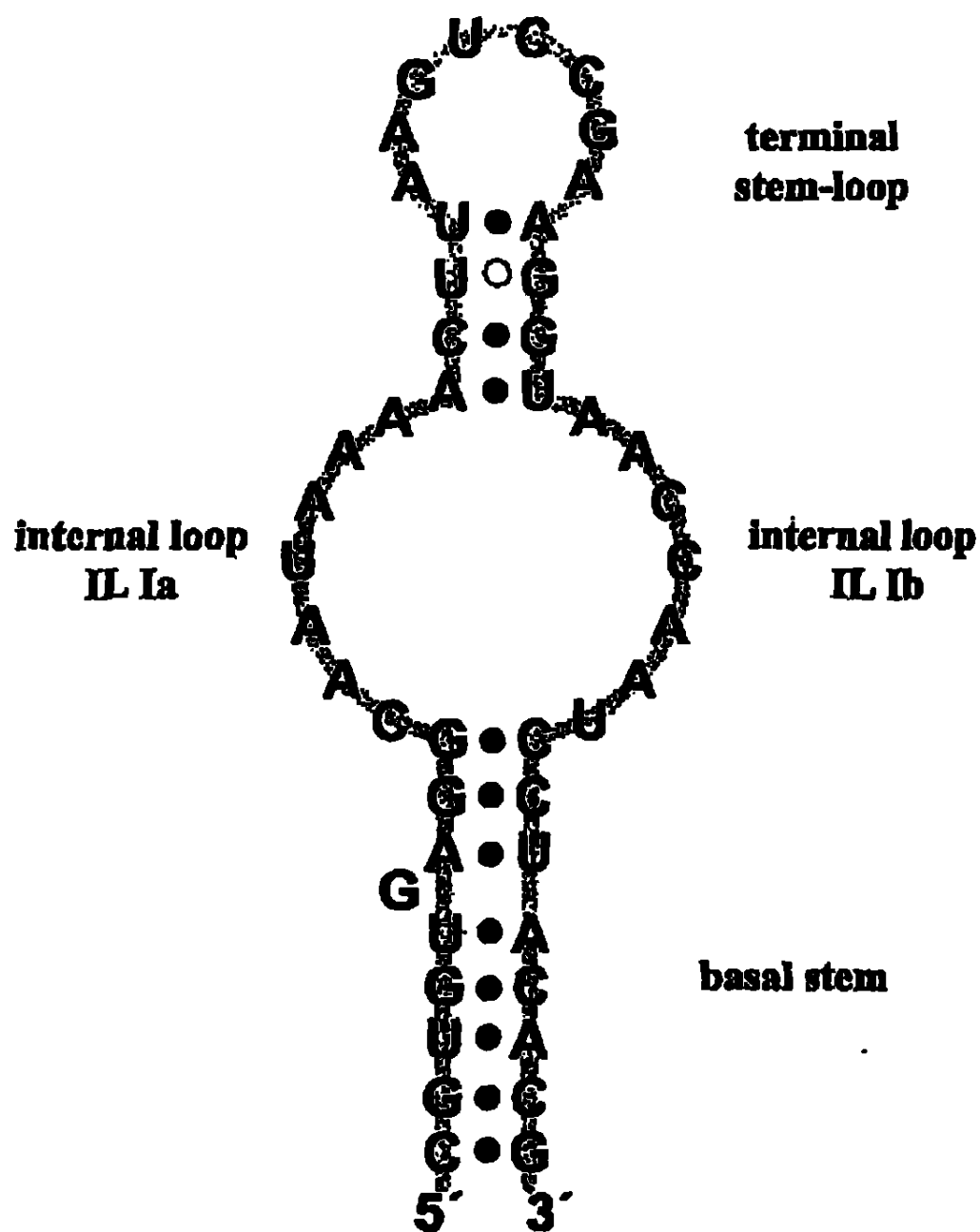


Figure 1B

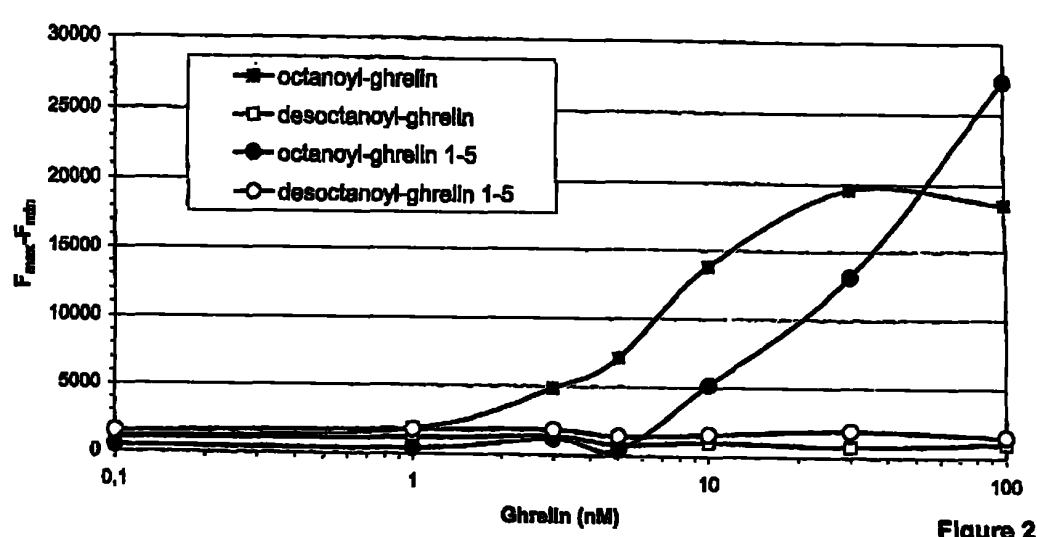


Figure 2

[Handwritten signature]

32

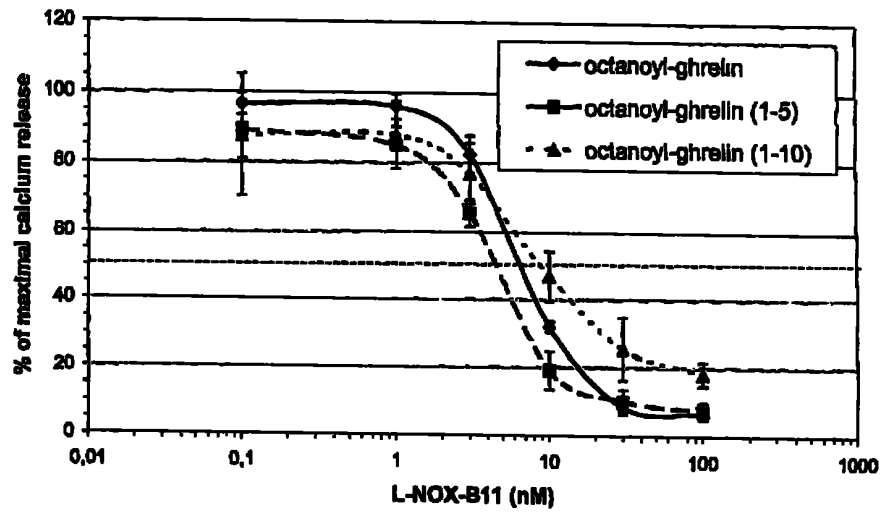


Figure 3

32

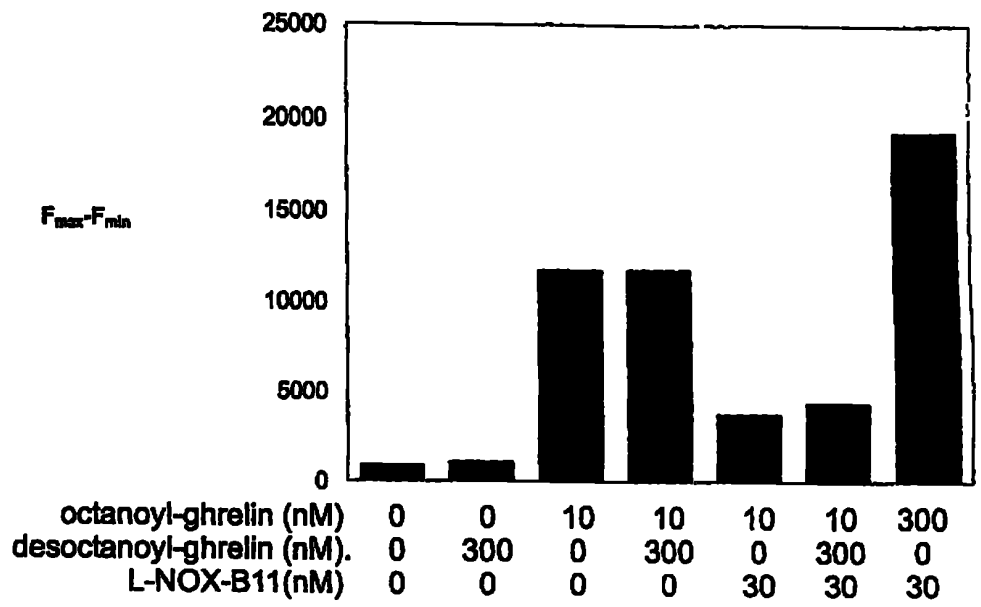


Figure 4

39

W 21050409128

67

PCT/JP2004/012139

39

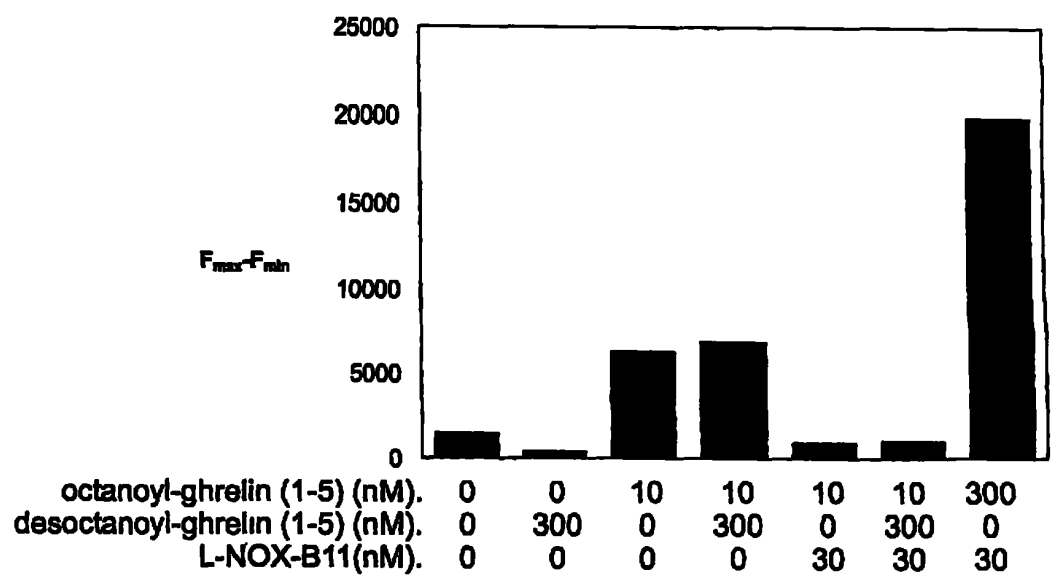


Figure 5

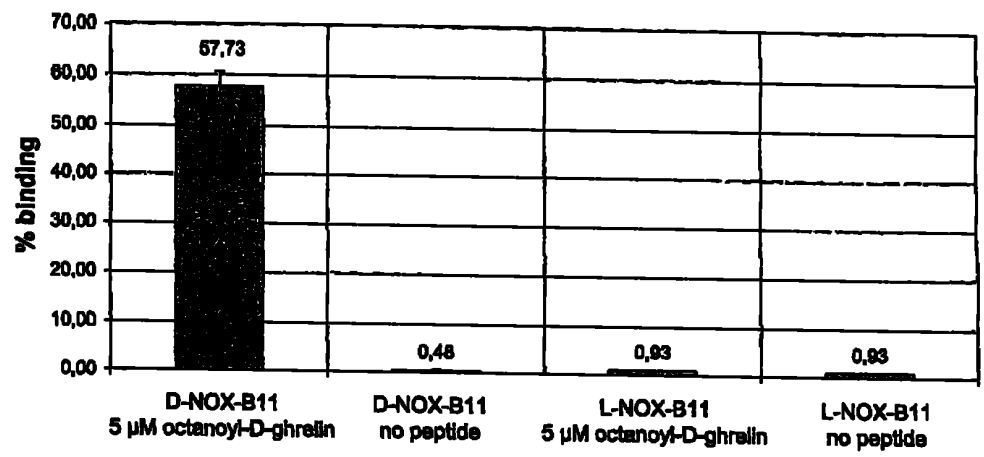


Figure 6

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/11 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

D. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEVA S ET AL: "GnRH binding RNA and DNA Spiegelmers: A novel approach toward GnRH antagonism" CHEMISTRY AND BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 9, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 351-359, XP002221140 ISSN: 1074-5521 the whole document -/-	1-12

☒ Further documents are listed in the classification of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claims of which is cited to establish the publication date of another claim or other special search (as specified)
- "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conformity with the provisions laid down in the international search report
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the initial completion of the international search

17 March 2005

Date of mailing of the international search report

01/04/2005

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.O. Box 5010 Patentstr. 2
NL - 8200 AA Almere
Tel. (+31-70) 840-8040, Te. 31 851 8041
Fax: (+31-70) 840-8016

Authorized officer

Bilong, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/012739

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAGHAVAN M ET AL: "BIAcore: a microchip-based system for analyzing the formation of macromolecular complexes" STRUCTURE, CURRENT BIOLOGY LTD., PHILADELPHIA, PA, US, vol. 3, no. 4, April 1995 (1995-04), pages 331-333, XP004587855 ISSN: 0969-2126 the whole document	18-21, 31-78
A	WOOD S J: "DNA-DNA HYBRIDIZATION IN REAL TIME USING BIACORE" MICROCHEMICAL JOURNAL, NEW YORK, NY, US, vol. 47, no. 3, June 1993 (1993-06), pages 330-337, XP009004259 ISSN: 0026-265X the whole document	18-21, 31-78
P,X	WO 2004/013274 A (NOXXON PHARMA AG; HELMLING, STEFFEN; EULBERG, DIRK; MAASCH, CHRISTIAN;) 12 February 2004 (2004-02-12) the whole document	1-32
P,X	HELMING STEFFEN ET AL: "Inhibition of ghrelin action in vitro and in vivo by an RNA-Spiegelmer" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 101, no. 36, 7 September 2004 (2004-09-07), pages 13174-13179, XP002321448 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP2004/012739

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004013274 A	12-02-2004	EP 1386972 A1	04-02-2004
		WO 2004013274 A2	12-02-2004

name	sequence	frequency	Seq ID
B.1	CUGUG---AGGCAAL-----AAAACU--UAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	65	2
G2	CGUGUG---AGGCAAU-----AAAACU--UAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	.	3
E12	CUGUGUG---AGGCAAU-----AAAACU--UAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	.	4
B7	CUGUGUG---AGGCAAU-----AAAACA--UAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	2	5
A8	CGUGUG---AGGCAAU-----AAAACG--UAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	2	6
B12	CUGUGUG---AGGCAAU-----AAAACUUGLAAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	1	7
E3	CUGUGUG---AGGCAAU-----AAAACU--UAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	5	8
C12	CUGUGUGUGAGGCA-----AAAAC--GUAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	1	9
C11	CGUGUG---AGGUAGUAAA-----AAAAC--GUAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	2	10
A3	CGUGUG---AGGUAGUAAAAA-----AAAAC--GUAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	2	11
F5	CGUGUG---AGGUAGUAAAAA-----AAAAC--GUAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	1	12
A12	CGUGUG---AGGUAGUAAAAA-----AAAAC--GUAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	1	13
F12	CGUGUG---AGGUAGUAAAAA-----AAAAC--GUAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	2	14
G3	CGUGUG---AGGUAGUAAAAA-----AAAAC--GUAGUCCGAAGGUAACCAUCCUAC--ACG	1	15
Ins1-----Ins2-----Ins3-----Ins4			

Figure 1A

44

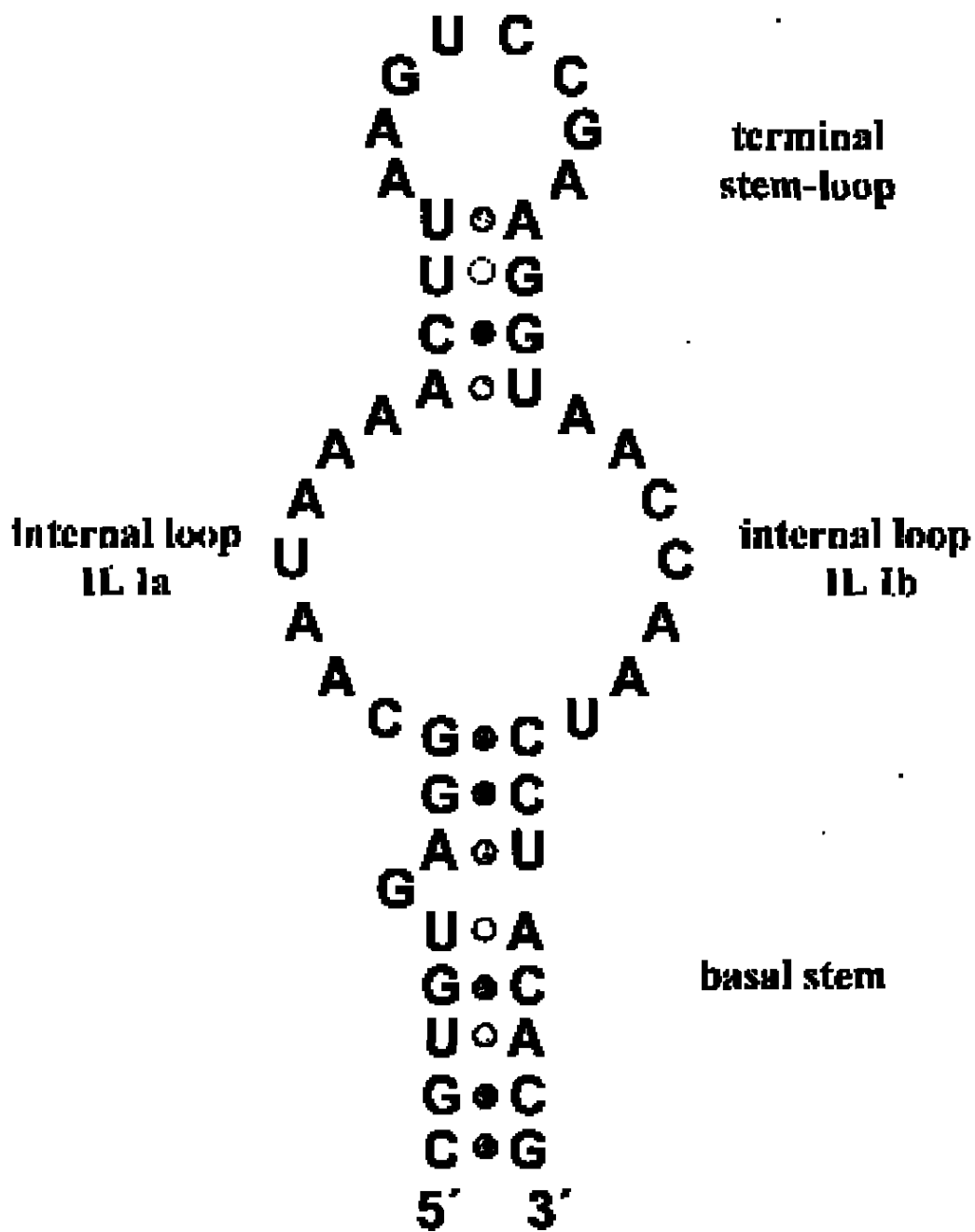


Figure 1B

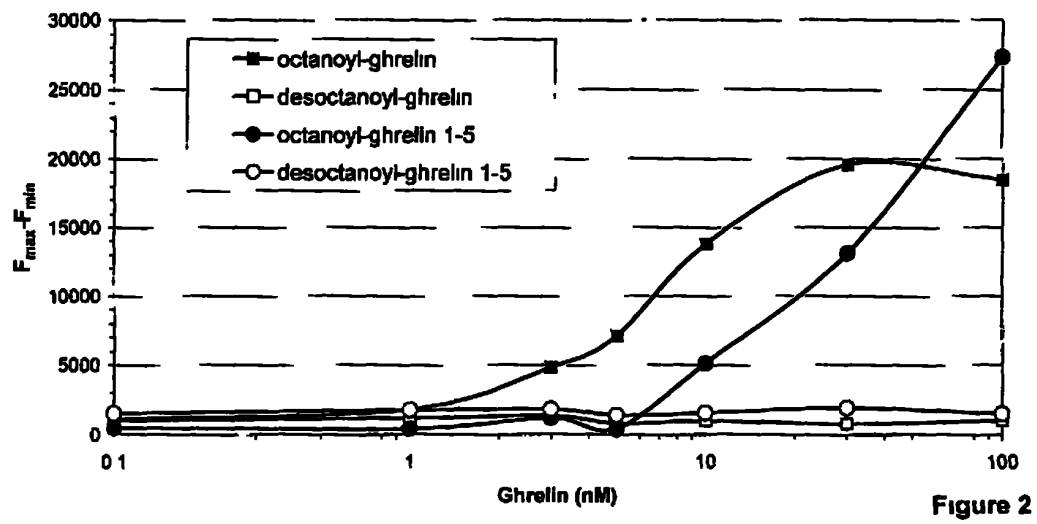


Figure 2

49

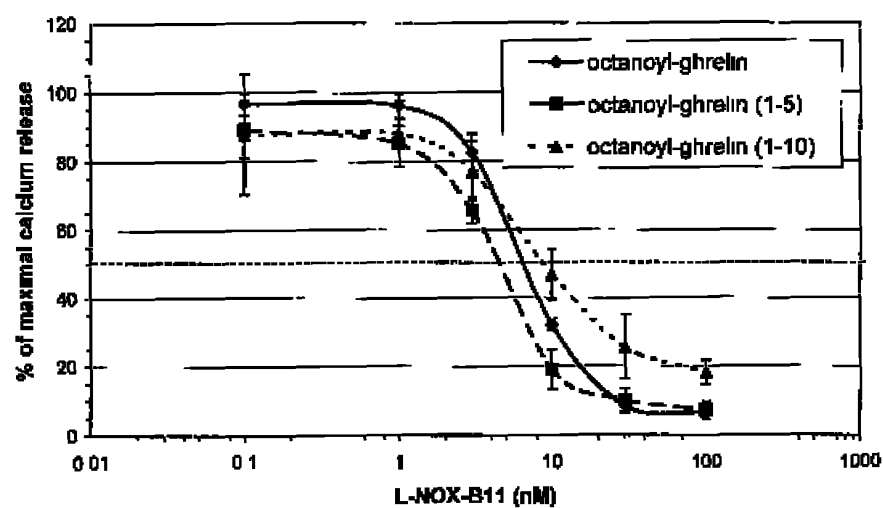


Figure 3

49

48

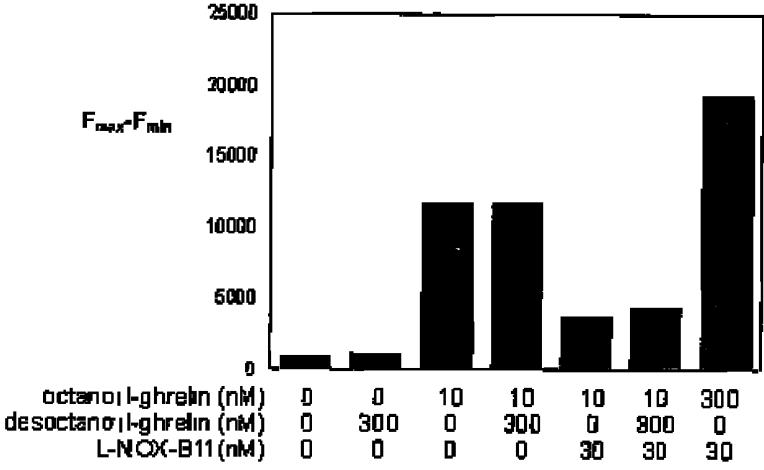


Figura 4

48

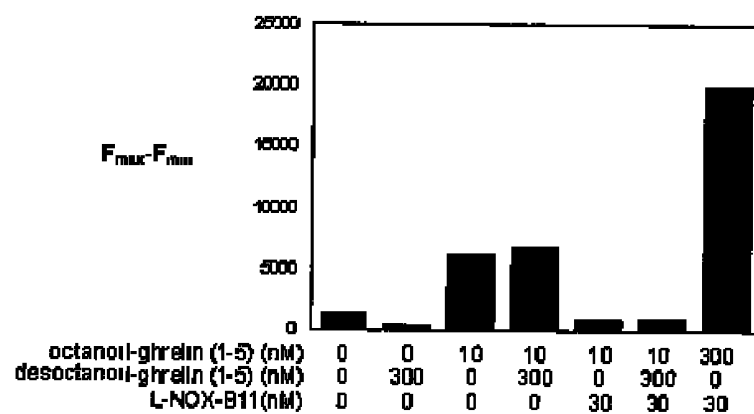


Figura 5

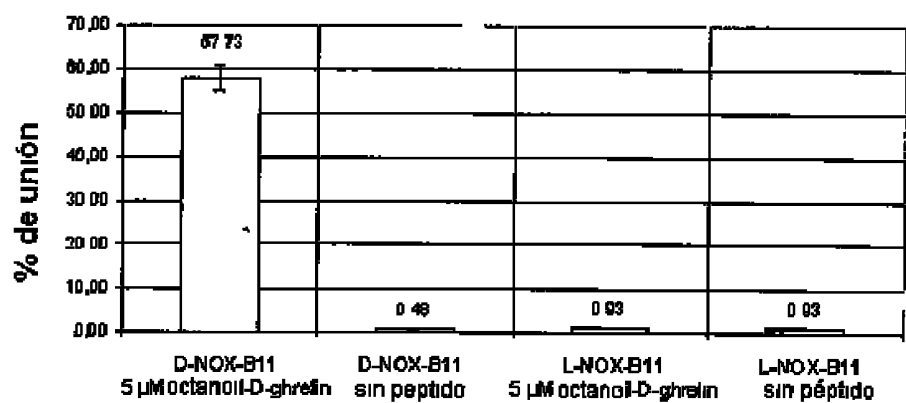


Figura 6

PCT_EP2004_012739_sequence listing
SEQUENCE LISTING

<110> NOXXON Pharma AG
 <120> Nucleic acids specifically binding bioactive
 ghrelin
 <130> N 10044 PCT
 <140> PCT/EP04/012739
 <141> 2004-11-10
 <160> 21
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> consensus sequence L-NOX-B11
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> ghrelin binder consensus sequence L-NOX-B11
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n is any of a, g, c and u
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n is any of a, g, c and u

PCT_EP2004_012739_sequence listing

<210>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n is any of a, g, c and u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> n is any of a, g, c and u

<400> 1
 cgugygnnny ynaaaagcu jarnccgaag guaaccauuc cuxcnacg
 48

<210> 2
 <211> 47
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <223> ghrelin binder L-NOX-B1,1

<400> 2
 cgugugaggc aaagaacur aaguccgaag guaaccauuc cuxcnacg
 47

<210> 3
 <211> 47
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_feature

PCT_EP2004_012739_sequence listing
 <223> ghrelin binder L-MOX-62

<400> 3
 cguugugaggc aguaaaacuu aguccgaag guaaccaauc cuacacg
 47

<210> 4
 <211> 47
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <223> ghrelin binder L-MOX-E12

<400> 4
 cguugugaggc aauaaaacuu aguccgaag guaaccaauc cuacacg
 47

<210> 5
 <211> 47
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <223> ghrelin binder L-MOX-B7

<400> 5
 cguugugaggc aauaaaacuu aguccgaag guaaccaauc cuacacg
 47

<210> 6
 <211> 47
 <212> RNA

PCT_EP2004_012739_sequence listing
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <223> ghrelin binder L-NOX-A8

<400> 6
 cgugugagggc aaauaaacgu aaguccgaag guaaaccauc cuacacg
 47

<210> 7
 <211> 49
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <223> ghrelin binder L-NOX-B12

<400> 7
 cgugugagggc aaauaaacuu guaaaguccga agguaaccaa uccuacacg
 49

<210> 8
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <223> ghrelin binder L-NOX-E3

<400> 8
 cgugugagggc aaauaaacuu aaaguccga agguaaccau ccuacacg
 48

PCT_EP2004_012739_sequence listing

<210> 9
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <223> ghrelin binder L-NOX-C12

<400> 9
 cgugcgguga ggcaaaacg uaagaccga gguaaccauu ccuaccacg
 50

<210> 10
 <211> 50
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <223> ghrelin binder L-NOX-C11

<400> 10
 cgugugaggu aguaaaaaa cguaaacccg aagguaacca auccuacacg
 50

<210> 11
 <211> 53
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <223> ghrelin binder L-NOX-A3

PCT_EP2004_012739_sequence listing

```

<400> 11
cgugugaggu aguaaaaaaa aaacguaaa cgaaggua ccaauccuc
acg 53

<210> 12
<211> 54
<212> RNA
<213> Artificial

<400> 12
cgugugaggu aguaaaaaaa aaacguuuu uccgaaggua accaauccua
cacg 54

<210> 13
<211> 55
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
<223> ghrelin binder L-KOX-A12

<400> 13
cgugugaggu aguaaaaaaa aaacguuuu auccgaaggua accaauccu
acacg 55

<210> 14
<211> 56
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
<223> ghrelin binder L-KOX-F12

<400> 14

```

PCT_EP2004_012739_sequence listing
 cgugugaggu aguaaaaaaa aaaaaacgua aauccgaagg uaaacaaacc
 uacacg 56

<210> 15
 <211> 59
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <223> ghrelin binder L-MUX-G5

<400> 15
 cgugugaggu aguaaaaaaa aaaaaacgua aauccgaagg uaaacaaacc
 uacacg 59

<210> 16
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> human ghrelin

<400> 16
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln
 Gln Arg Lys 5 10
 15

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

PCT_EP2004_012739_sequence listing
 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> amino acids 1 to 10 of human ghrelin

<400> 17
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln
 1 5 10

<210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> amino acids 1 to 5 of human ghrelin

<400> 18
 Gly Ser Ser Phe Leu
 1 5

<210> 19
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> rat

<220>
 <221> misc_feature
 <223> rat ghrelin

PCT_EP2004_012739_sequence listing

<400> 19

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> 20

<211> 17

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<223> 5' Flank sequence

<400> 20

ggagcucaga cuucacu
 17

<210> 21

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<223> 3' Flank sequence

<400> 21

uaccacuguc gguccac
 18

PCT_EP2004_012739_sequence listing

(13) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

**(18) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual:
Oficina Internacional**

**(43) Fecha de Publicación Internacional:
2 de junio de 2004 (02.06.2004)**

**(Código de Barras)
INFP
OIMF**

**(10) Número de Publicación Internacional:
WO 03/49828 A1**

PCT

(61) Clasificación Internacional de Patentes : C12 1/611

(21) Número de Solicitud Internacional PCT : EP2004/012791

**(52) Fecha de Presentación Internacional: 10 DE NOVIEMBRE DE 2003
10.11.2003**

(26) Lengua de presentación: Inglés

(27) Idioma de publicación: Inglés

(30) Datos de anterioridad:

US2003/012791 10 DE NOVIEMBRE DE 2003 (10.11.2003) EP

**(71) Solicitante (designada para todos los países excepto Estados Unidos):
NOVON PHARMA AG (DE); Novartis AG, 40520 Basilea (DE)
Basilea, CH 40520 (EEAJ)**

**(72) Inventores (a):
(73) Inventores (designados para todos los países excepto Estados Unidos):
PLISSVANN, Jean (DE); Plissvann Romain SA, 10000 Berna (DE)
HELVETICA, Sion (DE); Roche Holding AG, 4000 Basilea (DE); BILBERG,
Dirk (DE); Sion (DE); Roche Holding AG, 4000 Basilea (DE); BILBERG,
Dirk (DE); Sion (DE); Roche Holding AG, 4000 Basilea (DE)**

**(74) Agencias: SCHMIDT, Armin R; Buhner & Co., 8000 Zurich (DE)
8000 Zurich (DE)**

(81) Países Designados (por solicitud): AE, AG, AL, AM, AN, AT, AU, BE, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CO, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IL, IN, IS, JP, KR, KZ, LG, LI, LU, LV, MA, MD, ME, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PI, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, SL, SM, SR, ST, SV, TH, TR, TT, TZ, UA, UG, US, VE, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (por solicitud): AFIP, AL, AM, AN, AT, AU, BE, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CO, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IL, IN, IS, JP, KR, KZ, LG, LI, LU, LV, MA, MD, ME, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PI, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, SL, SM, SR, ST, SV, TH, TR, TT, TZ, UA, UG, US, VE, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**Publicación:
-Con informe de búsqueda internacional
-Antes de que expire el plazo de tiempo para oponer las solicitudes y ser
republicada en el momento de recibir las solicitudes**

**Para los efectos de los libros y otros documentos, consultar con la Guía de
Oposición y Alteraciones que aparecen al comienzo de cada libro publicado en
la Oficina de PCT.**

(84) Título: Ácidos nucleicos que se unen específicamente a ghrelin bioactivo

(87) Resumen: La presente invención se refiere a un ácido nucleico que específicamente se une a ghrelin bioactivo, más preferentemente n-octanil ghrelin, y su uso para la diagnosis de enfermedades y trastornos mediados por ghrelin.

ÁCIDOS NUCLEICOS QUE SE UNEN ESPECÍFICAMENTE A GHRELIN BIOACTIVO

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos que se unen a
5 ghrelín bioactivo, y el uso de tal ácido nucleico para la unión y detección de
ghrelín bioactivo.

El ghrelín se identificó como el ligando natural del receptor 1a de
secretagogo de la hormona de crecimiento (GHSR1a). El receptor abunda
10 sobre todo en la glándula pituitaria y en las partes del hipotálamo del cerebro,
pero también se puede detectar en otros tejidos a bajas concentraciones.
Desde los últimos años 70 péptidos sintéticos y otros compuestos, llamados
secretagogos se ha mostrado que estimulan la liberación de la hormona de
crecimiento. Sin embargo, el ligando natural responsable de la liberación de la
15 hormona de crecimiento permanece desconocido hasta el descubrimiento de
ghrelín en 1999. Ghrelín es una hormona peptídica de 28 aminoácidos
altamente básica con una cadena lateral de ácido octanólico en el tercer
aminoácido de su extremo N (serina 3). Esta modificación inusual se requiere
para la interacción en el receptor GHS y su actividad. Sin embargo, en
20 muestras biológicas está presente una mezcla de tanto el octanol ghrelín que
es una forma de un ghrelín bioactivo, como el ghrelín no modificado o des-
octanol. La secuencia de aminoácidos del ghrelín de rata purificado se
determinó mediante un secuenciador proteico que era
GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR (SEQ. ID. No. 19). La secuencia
25 humana correspondiente se desvía en dos posiciones solamente, portando la
misma cadena lateral de n-octanol en la posición de aminoácido serina 3 y

63

WC2005/049828

2

PCT/T3P2004/012739

se determinó que era (GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLOPR (SEQ. ID. No. 16).

Además del resto n-octanollo de origen natural, grupos octanollo no saturados o ramificados, y cadenas alifáticas más largas introducidas en la posición 3 de ghrelin median el reconocimiento del receptor también. El dominio de interacción con el receptor se localiza en el mismo extremo N de ghrelin; los estudios de supresión indican, que ghrelin (1 – 10) [GSSFLSPEHQ, SEQ. ID. N° 17] e incluso el mínimo motivo de los aminoácidos 1 - 5 (ghrelin (1 - 5) [GSSFL, SEQ. ID. N° 18]) son suficientes para la estimulación de GHSR1a, pero en ambos casos se observa un fuerte requerimiento de la modificación de péptidos con el resto n - octanollo.

Ghrelin se ha mostrado que media las funciones fisiológicas pertinentes a un estado anabólico. Aunque estimula directamente la liberación de la hormona de crecimiento (GH) a partir de la glándula pituitaria, los experimentos en roedores también mostraron que ghrelin induce la alimentación de una manera independiente de la GH actuando sobre las neuronas del hipotálamo. De manera interesante, el sitio primario de la producción de ghrelin está en las glándulas oxínticas en el estómago, lo que sugiere que sirve como un enlace hormonal entre estómago, glándula pituitaria e hipotálamo. La observación de que la administración de ghrelin en ratas dio como resultado ganancia de peso como consecuencia de cambios en la ingestión de energía y/o utilización de combustible sustenta dicho papel. Además, la administración sistémica de ghrelin en seres humanos provoca sensaciones de hambre en los sujetos de

6A

ensayo e induce un exceso de alimentación. Basándose en estos hallazgos ghrelin se cree que tiene un papel crucial en la regulación de apetito y peso corporal, sirviendo tanto como una señal aguda como crónica de un estado infraalimentado. El soporte adicional para esta hipótesis viene de
5 observaciones de que los niveles de ghrelin así como el apetito se reducen en individuos después de una derivación gástrica, que contribuye al menos en parte a la eficacia del procedimiento en efectuar pérdida de peso. Los datos clínicos de pacientes con síndrome de Prader - Willi también sugieren que la hiperfagia y obesidad asociadas a la enfermedad son una consecuencia de una
10 imponente hiperghrelinemia. Además, ghrelin se encontró que induce hiperglucemia e inhibición de la liberación de insulina, que indica una implicación en el metabolismo de glucosa. Además de estas funciones en el metabolismo de energía, ghrelin ha estado también implicado en numerosos procesos diferentes. Se ha encontrado que ghrelin se expresa en numerosos
15 tumores neuroendocrinos y estimula, además de la liberación de la GH a partir de la pituitaria, la liberación de ACTH, PRL, y cortisol. Las inyecciones individuales de ghrelin en individuos sanos se encontró que incrementaban el rendimiento cardíaco y disminuían la presión sanguínea. De este modo, la acción de ghrelin parece que está implicada en una diversidad de tareas
20 diferentes. Para la información sobre los antecedentes se puede 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
25 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
- 5 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.,
- 10 Eur J Endocrinol. 2002 Feb; 146(2):241-4 Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion; Broglio F, et al., J Clin Endocrinol Metab. 2001 Oct; 86(10):5083-8, Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans; Bednarek MA, et al., J Med Chem. 2000 Oct.; 43:4370-6 Structure-
- 15 function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a.

El problema que subyace en la presente invención es proporcionar

20 medios para la unión de ghrelin bioactivo y más particularmente proporcionar un procedimiento para el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por ghrelin bioactivo así como procedimientos para la detección específica de ghrelin bioactivo.

De acuerdo con la presente invención el problema se soluciona mediante la materia sujeto de las reivindicaciones independientes que están anexas al presente documento. Las realizaciones preferidas resultan de las reivindicaciones dependientes.

5

El Ghrelín humano es un péptido básico que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ. ID. No. 16, y está modificado con una cadena lateral de ácido graso. En consideración del alto grado de homología de secuencias peptídicas entre las diferentes especies, el término ghrelín usado en esta memoria descriptiva se refiere a cualquier ghrelín que incluye, pero no se limita a, ghrelín de mamíferos. Preferiblemente, el ghrelín de mamíferos se selecciona entre el grupo comprendido por ghrelín de ratones, de rata, de conejo, de hámster y humano. Más preferiblemente el ghrelín es ghrelín humano.

15

El pI calculado de ghrelín es 11,09. A pesar de este pI de ghrelín global muy básico, el motivo de unión al receptor GSSFL [ghrelín (1 - 5)] es un dominio bastante ácido, con un pI calculado de 5,5. La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que un ácido nucleico se puede seleccionar con ghrelín de longitud completa, que específicamente reconoce el dominio de unión de receptor ácido, pero no el dominio central básico y carboxi-terminal del péptido. Esto es sorprendente con relación a los efectos electrostáticos de tanto las cargas de la molécula diana, es decir ghrelín, como las cargas del ácido nucleico. La unión de ácidos nucleicos cargados negativamente a un dominio básico de una molécula diana debe ser mucho

25

más ventajosa comparada con la unión de un ácido nucleico a un dominio ácido de una molécula diana. Hay que señalar que los expertos en la técnica no tuvieron expectativas razonables de éxito para seleccionar un ligando de ácido nucleico que no se une a la parte básica de ghrelin pero se une al
5 dominio ácido de la molécula diana.

Además del motivo de unión al receptor amino terminal, ghrelin biológicamente activo que también se denomina en esta memoria descriptiva como ghrelin bioactivo, se caracteriza por su aclación con un grupo n-octanoilo en el aminoácido serina 3. El ligando del ácido nucleico del motivo amino
10 terminal GSSFL descrito en esta memoria descriptiva permite la discriminación entre la forma biológicamente activa y la forma bio inactiva o no bioactiva de ghrelin. Esto es sorprendente, ya que la unión depende estrictamente de la presencia de dos restos, el grupo octanoilo y el péptido: la unión del ácido
15 nucleico a octanoil - ghrelin es específica en la presencia de un exceso de 1000 veces de desoctanoil - ghrelin, más preferiblemente en presencia de un exceso de 100 veces de desoctanoil - ghrelin, y lo más preferiblemente en presencia de un exceso de 10 veces de desoctanoil - ghrelin. Además, las características de unión son también específicas del resto peptídico, dado el hecho, de que el
20 octanoil - ghrelin enantiomérico no es reconocido por el ácido nucleico; el grupo octanoilo no es suficiente para la unión.

Como se usa en las realizaciones preferidas en esta memoria descriptiva, un ghrelin bioactivo es un ghrelin que muestra en una realización
25 preferida esencialmente todas las características del ghrelin de origen natural.

Particularmente, un ghrelín bioactivo como se usa en esta memoria descriptiva en las realizaciones preferidas es cualquier ghrelín y derivado de ghrelín que es responsable de o puede activar la liberación de la hormona de crecimiento, más preferiblemente mediante una interacción con el receptor GHS. En
5 contraste con esto en las realizaciones preferidas un ghrelín no bioactivo es un ghrelín que es diferente del ghrelín bioactivo, más preferiblemente no activa la liberación de la hormona de crecimiento, más preferiblemente mediante una interacción con el receptor GHS.

10 Las características del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención como se describe en esta memoria descriptiva se pueden hacer realidad en cualquier aspecto de la presente invención donde el ácido nucleico se usa, o bien solo o en cualquier combinación.

15 El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también comprende ácidos nucleicos que son esencialmente homólogos a las secuencias particulares descritas en esta memoria descriptiva. El término sustancialmente homólogo se debe entender de manera que la homología sea al menos 75%, preferiblemente 85%, más preferiblemente 90% y lo más
20 preferiblemente más de 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ó 99%.

El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también comprende en una realización un ácido nucleico que se deriva de las secuencias particulares descritas en esta memoria descriptiva. El término
25 'derivado' se debe entender tal como en la base de la SEQ ID N° 1. Los loci de

inserción Ins 1 a Ins 4 mostrados en la figura 1 A se pueden representar por cualquier secuencia de una longitud de un máximo de 30 nucleótidos, preferiblemente por cualquier secuencia de un máximo de 20 nucleótidos, más preferiblemente por cualquier secuencia de un máximo de 10 nucleótidos, y lo
 5 más preferiblemente por cualquier secuencia de 0 - 3 nucleótidos para Ins 1, 0 - 14 nucleótidos para Ins 2, 1 - 3 nucleótidos para Ins 3, y 0 - 2 nucleótidos para Ins 4. El bucle interno IL la, representado por Ins 2, se considera que es el sitio de modificación más importante.

El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también puede
 10 estar representado en una realización preferida mediante la siguiente fórmula genérica

CGTTCYGN₀₋₃AGGYAN₀₋₁₄AAAACN₁₋₃UAARWCCGAAGCUAACCAWUCCUACN₀₋₂ACG
 (SEQ. ID. No. 1)

15 mediante la que Y significa U o C, R significa A o G, W significa U o A. En relación con esto se debe hacer notar que cualesquiera índices representan cualquier número entero que comienza desde la primera cifra especificada hasta la última cifra especificada y cualquier número entero entre ellos. De acuerdo con lo anterior, por ejemplo, 0 - 3 representa 0, 1, 2, y 3.

20

De este modo la secuencia consenso SEQ ID N° 1 contiene cuatro regiones, en las que las inserciones de longitud variable se observan en diversas realizaciones. Estas regiones se llaman loci de inserción, y se designan como Ins 1 a Ins 4. De acuerdo con L-NOX-B11, enumerado como la

SEQ ID. N° 2 en la Figura 1 A, Ins 1 se localiza entre los nucleótidos 6 y 7, Ins 2 se localiza entre los nucleótidos 13 y 14, Ins 3 se localiza entre los nucleótidos 18 y 20, e Ins 4 se localiza entre los nucleótidos 44 y 45. La longitud de los loci de inserción respectivos, observada en los clones mostrados, se proporciona en la SEQ ID N° 1, y la fórmula genérica especificada anteriormente.

El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también comprende en una realización un ácido nucleico que es estructuralmente homólogo a las secuencias particulares descritas en esta memoria descriptiva, preferiblemente hasta el grado de que dichas partes están implicadas en la unión a octanoil - ghrelin y discriminan frente a desoctanoil - ghrelin . La homología estructural como se usa en relación con las realizaciones preferidas de la presente invención se entenderá como que las secuencias plegadas en un modelo de estructura secundaria característico que comprende un tallo basal, y un bucle interno, y un tallo-bucle terminal como se muestra en la Figura 1 B, el plegamiento preferible en dicha estructura, en el que se dan intercambios de bases compensatorios en las regiones del tallo, y el plegamiento preferible en dicha estructura, en el que se dan sustituciones, eliminaciones y/o inserciones en tramos de una sola cadena, y más preferiblemente el plegamiento en dicha estructura correspondiente a la Figura 1 B en tamaño y a la SEQ ID 1 en secuencia.

El término ácido nucleico de la invención o ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también deberá comprender aquellos ácidos

nucleicos que comprenden parte de las secuencias de los ácidos nucleicos descritas en esta memoria descriptiva, preferiblemente hasta el grado de que dichas partes están implicadas en la unión a ghrelin, y distinguen ghrelin bioactivo de ghrelin no bioactivo, es decir en particular octanoll - ghrelin de desoctanoll - ghrelin. Tal ácido nucleico se puede derivar de los descritos en esta memoria descriptiva, por ejemplo, mediante truncamiento. El truncamiento puede estar relacionado con cualquiera o ambos de los extremos de los ácidos nucleicos como se describe en esta memoria descriptiva. También, los truncamientos pueden estar relacionados con la secuencia interna de los nucleótidos, es decir, pueden estar relacionados con el (los) nucleótido (s) entre los nucleótidos terminales 5' y 3', respectivamente. Además, el truncamiento deberá comprender la eliminación de, como poco un sólo nucleótido de la secuencia de ácidos nucleicos descritos en esta memoria descriptiva. El truncamiento puede también estar relacionado con más de un tramo del (de los) ácido (s) nucleico (s) de la invención, mediante el que el tramo puede ser tan pequeño como de un nucleótido de longitud.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden ser o bien ácidos nucleicos D o ácidos nucleicos L. Preferiblemente, los ácidos nucleicos de la invención son ácidos nucleicos L. Además es posible que una o varias partes del ácido nucleico están presentes 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 poco un nucleótido. Tales ácidos nucleicos se denominan generalmente en esta memoria descriptiva ácidos nucleicos D y L, respectivamente.

El término ácido nucleico de la invención o ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también deberá comprender aquellos ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de los ácidos nucleicos descritas en esta memoria descriptiva y otras secuencias unidas a ellas, preferiblemente hasta el grado de que dichas partes o ácidos nucleicos están implicados en la unión a octanoil - ghrelin y discriminan frente a desoctanoil - ghrelin. La extensión, es decir, las secuencias adicionales unidas a las secuencias de ácidos nucleicos específicas descritas en esta memoria descriptiva pueden ser tales, que la secuencia se alarga o bien en el extremo 5' o en el extremo 3' o en ambos, y puede comprender como mucho 100 nucleótidos para cualquier lado, preferiblemente como mucho 50 nucleótidos para cualquier lado, más preferiblemente como mucho 20 nucleótidos en cualquier lado, y lo más preferiblemente la secuencia del flanco 5' completa o parcial que se describe en esta memoria descriptiva como la SEQ ID N° 20, y/o la secuencia del flanco 3' completa o parcial que se describe en esta memoria descriptiva como la SEQ ID N° 21. Como se usa en esta memoria descriptiva, el término parcialmente significa en una realización preferida de la presente invención un solo nucleótido de la secuencia respectiva o una secuencia de dos o más nucleótidos de tal secuencia que son adyacentes entre sí en la secuencia a la que se refiere, más particularmente a las secuencias de los flancos de acuerdo con cualquiera de la SEQ ID N° 20 y 21.

Está también dentro de la presente invención que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención son parte de un ácido nucleico más largo

por el que este ácido nucleico más largo comprenda varias partes por el que al menos una parte es un ácido nucleico, o una parte del mismo, de acuerdo con la presente invención. Las otras partes de estos ácidos nucleicos más largos pueden ser o bien un ácido nucleico D o ácido nucleico L. Cualquier
5 combinación se puede usar en relación con la presente invención. Esta (s) otra (s) parte (s) del ácido nucleico más largo puede(n) mostrar una función que es diferente de la unión. Una posible función es permitir la interacción con otras moléculas, tales como por ejemplo, para inmovilización, reticulación, detección o amplificación.

10

Los ácidos nucleicos L como se usan en esta memoria descriptiva constan de nucleótidos L, preferiblemente constando completamente de nucleótidos L.

15

Los ácidos nucleicos D como se usan en esta memoria descriptiva constan de nucleótidos D, preferiblemente constando completamente de nucleótidos D.

20

Independientemente de si el ácido nucleico de la invención consta de nucleótidos D, nucleótidos L o una combinación de ambos, siendo la combinación por ejemplo una combinación aleatoria o una secuencia definida de tramos que constan de al menos un nucleótido L y al menos un ácido nucleico D, el ácido nucleico puede constar de desoxirribonucleótido (s), ribonucleótido (s), o combinaciones de los mismos.

25

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 de origen natural. Sin embargo, los ácidos nucleicos D, no son muy estables en soluciones acuosas y particularmente en sistemas biológicos o muestras biológicas debido a la amplia presencia de nucleasas. Las nucleasas de origen natural, particularmente las nucleasas de células animales no son capaces de degradar los ácidos nucleicos L. Debido a esto la semivida biológica del ácido nucleico L se aumenta significativamente en tal sistema, incluyendo el cuerpo animal y humano. Debido a la falta de degradabilidad del ácido nucleico L no se genera ningún producto de degradación por nucleasas y de este modo no se observa ninguno de los efectos secundarios que surgen de los mismos. Este aspecto delimita el ácido nucleico L de realmente todos los otros compuestos que se usan en la terapia de enfermedades y/o trastornos que implican la presencia de ghrelín.

15

Está también 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 de si son ADN o ARN, pueden estar presentes como ácidos nucleicos de cadena sencilla o doble cadena. Típicamente, los ácidos nucleicos de la invención son ácidos nucleicos de cadena sencilla que muestran estructuras secundarias definidas debido a la secuencia primaria y de este modo también pueden formar estructuras terciarias. Sin embargo, los ácidos nucleicos de la invención, también pueden ser de doble cadena con el significado de dos cadenas que son complementarias entre si están hibridadas entre si. Esto condere

25

estabilidad al ácido nucleico que será ventajosa si el ácido nucleico está presente en la forma D de origen natural en lugar de la forma L.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden estar modificados. Tales modificaciones pueden estar relacionadas con el nucleótido individual del ácido nucleico y se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de tal modificación se describen en, entre otros, Kussar, W.(2000) *J Biotechnol*, 74: 27 - 38; Aurup, H. et al. (1994) *Nucleic Acids Res*, 22, 20 - 4; Cummins, L.L. et al. (1995) *Nucleic Acids 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, 7632-8; Miller, L.E. et al., (1993) *J Physiol*, 468, 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 esta memoria descriptiva, es un ácido nucleico que consta de al menos dos cadenas de ácido nucleico. Estas al menos dos cadenas de ácido nucleico forman una unidad funcional mediante la que la unidad funcional es un ligando a una molécula diana. Las al menos dos cadenas de ácido nucleico se pueden derivar de cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención mediante o bien la escisión del ácido nucleico para generar dos cadenas o mediante la síntesis de un ácido nucleico correspondiente a una primera parte de la invención, es decir, el ácido nucleico global y otro ácido nucleico que corresponde a la segunda parte del ácido nucleico global. Se ha de reconocer que tanto la escisión como la síntesis se puedan aplicar para generar un ácido nucleico

múltipartito donde existen más de dos cadenas como se ha ejemplificado anteriormente. En otras palabras, las al menos dos cadenas de ácido nucleico son típicamente diferentes de dos cadenas que son complementarias y se hibridan entre sí aunque puede existir un cierto grado de complementariedad
5 entre las diversas partes del ácido nucleico.

Una posibilidad de determinar la constante de unión es el uso del dispositivo llamado biacore, que también conocen los expertos en la técnica. Afinidad como se usa en esta memoria descriptiva también se mide por el uso
10 de "ensayos con perlas" como se describe en el ejemplo 5. Una medida apropiada con el fin de expresar la intensidad de la unión entre el ácido nucleico de acuerdo con la diana que en el caso presente se trata de ghrelin, es el llamado valor K_d que así como el procedimiento para su determinación son bien conocidos por los expertos en la técnica.

15

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención se caracterizan por un cierto valor de K_d . Preferiblemente, el valor de K_d mostrado por los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención esté por debajo de 1 μM . Un valor de K_d de aproximadamente 1 μM se dice que es
20 característico de una unión no específica de un ácido nucleico a una diana. Como reconocerán los expertos en la técnica, un valor de K_d de un grupo de compuestos tales como los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención está dentro de un cierto intervalo. El valor de K_d anteriormente mencionado de aproximadamente 1 μM es un límite superior preferido para el
25 valor de K_d . El límite inferior preferido para el valor de K_d de los ácidos

nucleicos de unión a dianas puede ser de aproximadamente 10 pico molar o superior. Está dentro de la presente invención que los valores de K_d de los ácidos nucleicos individuales que distinguen ghrelín bioactivo de ghrelín no bioactivo, es decir preferiblemente octanol - ghrelín de desoctanol - ghrelín
5 estén en este intervalo de 10 pM a 1 μ M, más preferido dentro de un intervalo de 100 pM a 500 nM, y lo más preferido dentro de un intervalo de 1 nM a 100 nM.

Las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención
10 pueden tener cualquier longitud con tal que sean todavía capaces de unirse a la molécula diana, y diferenciar el ghrelín bioactivo del ghrelín no bioactivo, es decir, preferiblemente octanol - ghrelín de desoctanol - ghrelín. Se reconocerá en la técnica que existen longitudes preferidas de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Típicamente, la longitud está entre 15 y 120
15 nucleótidos. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquier número entero entre 15 y 120 es una posible longitud para los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Los intervalos más preferidos para la longitud de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención son longitudes de aproximadamente 20 a 100 nucleótidos, aproximadamente 20 a
20 80 nucleótidos, aproximadamente 20 a 60 nucleótidos, aproximadamente 20 a 50 nucleótidos y aproximadamente 30 a 50 nucleótidos.

Los ensayos para el discernimiento de ghrelín bioactivo y bioinactivo de acuerdo con la presente invención se pueden realizar usando técnicas
25 convencionales como conocen los expertos en la técnica. En un aspecto

preferido, los ensayos se pueden realizar en placas de 96 pocillos, donde los componentes se inmovilizan en los recipientes de reacción como se describe de acuerdo con las reivindicaciones. Opcionalmente, los complejos se pueden retirar de los recipientes de reacción después de la formación de complejos.

5

En un aspecto, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención se analiza mediante un segundo medio de detección, en el que dicho medio de detección es una guía molecular. La metodología de la guía molecular la conocen los expertos en la técnica. En resumen, las sondas de ácidos nucleicos que también se denominan guías moleculares, son un
10 complemento inverso a la muestra de los ácidos nucleicos a detectar y se hibridan debido a esto a una parte de la muestra de ácido nucleico a detectar. Tras la unión a la muestra de ácido nucleico los grupos fluorofóricos de la guía molecular se separan lo que da como resultado un cambio de la señal de
15 fluorescencia, preferiblemente un cambio de intensidad. Este cambio se correlaciona con la cantidad de muestra de los ácidos nucleicos presente.

Los ácidos nucleicos de la invención, que también se denominan en esta memoria descriptiva los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención,
20 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 a compuestos adicionales farmacéuticamente activos, mediante el que el ácido nucleico de la invención actúa preferiblemente como compuesto
25 farmacéuticamente activo él mismo. Tales medicamentos comprenden en

realizaciones preferidas al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal vehículo puede ser, por ejemplo, agua, tampón, almidón, azúcar, gelatina o cualquier otra sustancia vehículo aceptable. Tales vehículos generalmente son conocidos por los expertos en la técnica. La enfermedad y/o trastornos y/o

5 afecciones patológicas para cuyo tratamiento y/o prevención se puede usar tal medicamento incluyen, pero no se limitan a obesidad, la regulación de balance de energía, apetito y peso corporal, trastornos de alimentación, diabetes, metabolismo de glucosa, tumor, presión sanguínea, y enfermedad cardiovascular. Como reconocerán los expertos en la técnica los ácidos

10 nucleicos de la invención se pueden usar realmente en cualquier enfermedad donde un antagonista a ghrelín se puede administrar a un paciente en necesidad de tal antagonista y dicho antagonista es adecuado para eliminar la causa de la enfermedad o el trastorno o al menos para reducir los efectos de la enfermedad o el trastorno. Tal efecto incluye, pero no se limita a, obesidad, la

15 regulación del balance de energía, apetito y peso corporal, trastornos de alimentación, diabetes, metabolismo de glucosa, tratamiento de tumores, presión sanguínea, y enfermedad cardiovascular. Para el propósito de la presente invención la regulación del balance de energía se considera como una enfermedad. Más particularmente, el uso es para el tratamiento de cualquier

20 enfermedad en la que la regulación del balance de energía está influenciada por ghrelín, o bien directamente o indirectamente, y por lo que se desea la reducción de la biodisponibilidad de ghrelín. Lo mismo se aplica al metabolismo de azúcar, presión sanguínea y apetito y peso corporal. Enfermedades adicionales que se pueden tratar usando los ácidos nucleicos de acuerdo con

25 la presente invención, posiblemente tras la aplicación sistémica o local son

aquellas que se pueden seleccionar entre el grupo comprendido por tumores de la pituitaria, acromegalia, síndrome de Cushing central, síndrome de Cushing adrenal, síndrome de Cushing paraneoplásico, síndrome de Cushing ectópico, tumor adrenal, estrés, hipercortisolismo, insuficiencia cardíaca, infarto
5 cardíaco, accidente cerebrovascular, insuficiencia adrenocortical, hipotonía, estenosis aórtica, hipertensión pulmonar, pericarditis constrictiva, enfermedades infecciosas, hipotonía tóxica infecciosa, hipovolemia, e hiponatremia.

Se ha de entender que el ácido nucleico así como los antagonistas de
10 acuerdo con la presente invención se pueden usar no solamente como un medicamento o para la fabricación de un medicamento, sino también para propósitos cosméticos, particularmente con relación a la implicación de ghrelín en obesidad. Para el mismo propósito el ácido nucleico así como los antagonistas de acuerdo con la presente invención se pueden usar como un
15 aditivo de alimentos, un medio para el control de peso y/o un medio para el control del apetito. Una composición que comprende el ácido nucleico así como los antagonistas de acuerdo con la presente invención se puede usar para cualquiera de los propósitos mencionados anteriormente.

20 El ácido nucleico de la invención se puede además usar como material de partida para el diseño del fármaco. Básicamente existen dos posibles planteamientos. Un planteamiento es la selección de bibliotecas de compuestos mientras que tales bibliotecas de compuestos son preferiblemente bibliotecas de compuestos de bajo peso molecular. Tales bibliotecas son
25 conocidas por los expertos en la técnica. Como alternativa, el ácido nucleico de

acuerdo con la presente invención se puede usar para el diseño racional de fármacos.

El diseño racional de fármacos se puede comenzar a partir de cualquiera
5 de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención e implica una estructura, preferiblemente una estructura tridimensional, que es similar a la estructura de los ácidos nucleicos de la invención o idéntica a las partes mediadoras de la unión de la estructura de los ácidos nucleicos de la invención. En cualquier caso tal estructura todavía muestra las mismas características o
10 unas características similares de unión que los ácidos nucleicos de la invención. En o bien una etapa adicional o como una etapa alternativa en el diseño racional de fármacos la estructura preferiblemente tridimensional de aquellas partes de los ácidos nucleicos que se unen al neurotransmisor se imitan mediante grupos químicos que son diferentes de nucleótidos y ácidos
15 nucleicos. Mediante esta imitación se puede diseñar un compuesto diferente de los ácidos nucleicos. Tal compuesto es preferiblemente una molécula o péptido pequeño.

En el caso de seleccionar bibliotecas de compuestos, tales como
20 mediante el uso de un ensayo competitivo que conocen los expertos en la técnica, se pueden encontrar análogos de ghrelin, agonistas de ghrelin o antagonistas de ghrelin apropiados. Tales ensayos de competición se pueden establecer como sigue. El ácido nucleico de la invención, preferiblemente un splegimer que es un ácido nucleico L de unión a diana, se acopla a una fase
25 sólida. Con el fin de identificar análogos de ghrelin se puede añadir un ghrelin

5 marcado al ensayo. Un análogo potencial competiría con las moléculas de ghrelin que se unen al splegimer que iría junto con un descenso en la señal obtenida por la marca respectiva. La selección de agonistas o antagonistas puede implicar el uso de un ensayo de cultivo de células como conocen los expertos en la técnica.

10 El kit de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos uno o varios de los ácidos nucleicos de la invención. Adicionalmente, el kit puede comprender al menos uno o varios controles positivos o negativos. Un control positivo puede, por ejemplo, ser ghrelin, particularmente uno contra el que se selecciona el ácido nucleico de la invención o al que se une, preferiblemente, en forma líquida. Un control negativo, puede, por ejemplo, ser un péptido que se define en términos de propiedades biofísicas similares a ghrelin, pero que no es reconocido por los ácidos nucleicos de la invención.

15 Además, dicho kit puede comprender uno o varios tampones. Los diversos ingredientes pueden estar contenidos en el kit en forma seca o liofilizada o disueltos en un líquido. El kit puede comprender uno o varios recipientes que a su vez pueden contener uno o varios ingredientes del kit.

20 Se ha de entender que cualquiera de las secuencias descritas en los ejemplos y las figuras, respectivamente, se describe como tal y cualquiera de dichas secuencias se puede usar en cualquier aspecto y realización de la presente invención.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las figuras, ejemplos y listado de secuencias a partir de los cuales se pueden tomar características, realizaciones y ventajas adicionales, en las que

5 Fig. 1 A muestra los miembros del grupo L-NOX-B11, sus nombres, la frecuencia por la que se seleccionaron, y sus secuencias truncadas, que alternativamente se pueden extender por el flanco 5' 5'-GGAGCUCAGACUUCACU-3' (SEQ ID N° 20) y el flanco 3' 5'-UACGACUGUCGGUUCAC-3' (SEQ ID N° 10 21), e indica los loci de inserción Ins 1 a Ins 4;

 Fig. 1 B muestra el modelo de estructura secundaria del clon truncado L-NOX-B11 e indica las regiones del tallo basal, la parte 5' y 3' del bucle interno (IL 1a, IL 1b) y el tallo-bucle 15 terminal;

 Fig. 2 muestra la liberación de calcio dependiente de la dosis mediada por octanoil- o desoctanoil - ghrelin en la forma de longitud completa o la truncada en un ensayo celular que 20 usa células CHO que expresan el receptor de ghrelin humano (valoración dosis - respuesta);

 Fig. 3 muestra la inhibición de liberación de calcio mediada por octanoil - ghrelin de longitud completa y truncado por el Spiegelmer L-NOX-B11 (curva de inhibición); 25

- Fig. 4 muestra los resultados de un ensayo de competición celular con octanoil - ghrelin, desoctanoil-ghrelin, y L-NOX-B11, con combinaciones y concentraciones de los componentes resumidos debajo de las barras;
- Fig. 5 muestra los resultados de un ensayo de competición celular con octanoil - ghrelin (1 - 5), desoctanoil-ghrelin (1 - 5), y L-NOX-B11, con combinaciones y concentraciones de los componentes resumidos debajo de las barras;
- Fig. 6 muestra los resultados de un ensayo de unión *in vitro*, que analiza la unión de L-NOX-B11 y D-NOX-B11 marcados radiactivamente a D-octanoil - ghrelin biotinilado.

La siguiente tabla asocia los números de las SEQ ID a los diversos clones e identificadores, respectivamente, descritos en esta memoria descriptiva. Las secuencias de ácidos nucleicos, si no se indica lo contrario, se representan como las hebras (+) y se construyen por los 2' OH - ribonucleótidos.

Tabla:

Secuencia	Tipo de secuencia	SEQ ID N°
secuencia de consenso del grupo L-NOX-B11	ácido nucleico	1
L-NOX-B11	ácido nucleico	2

L-NOX-G2	ácido nucleico	3
L-NOX-E12	ácido nucleico	4
L-NOX-B7	ácido nucleico	5
L-NOX-A8	ácido nucleico	6
L-NOX-B12	ácido nucleico	7
L-NOX-E3	ácido nucleico	8
L-NOX-C12	ácido nucleico	9
L-NOX-C11	ácido nucleico	10
L-NOX-A3	ácido nucleico	11
L-NOX-F5	ácido nucleico	12
L-NOX-A12	ácido nucleico	13
L-NOX-F12	ácido nucleico	14
L-NOX-G5	ácido nucleico	15
ghrelin (humano)	péptido	16
ghrelin humano (1 - 10)	péptido	17
ghrelin humano (1 - 5)	péptido	18
ghrelin (rata)	péptido	19
secuencia del flanco 5'	ácido nucleico	20
secuencia del flanco 3'	ácido nucleico	21

Ejemplo 1: Ligandos de ácidos nucleicos de unión a ghrelin

En la solicitud de patente europea EP 020 23 627.8 y la solicitud de patente internacional PCT/EP03/08542 se describe la generación de los ligandos de ácidos nucleicos de unión a ghrelin. Un grupo de tales ligandos de ácidos nucleicos, obtenido en el proceso de selección se muestra en la Fig 1 A. El clon L-NOX-B11 es la secuencia más abundante en este grupo, y - como todos los otros miembros del grupo - es funcional en una versión larga y una trunca-
 5 da (L-NOX-B11 [95] y L-NOX-B11 [47]). Para la elongación de los clones truncados, se pueden añadir las secuencias del flanco 5' y del flanco 3' a las
 10 secuencias centrales mostradas.

flanco 5' 5' - GGAGGUCAGACUUGACU - 3' SEQ ID nº 20.

flanco 3' 5' -UACCACUGUCGGUCCAC - 3' SEQ ID Nº 21

En la figura 1 A solamente se resumen las versiones truncadas, y en esta solicitud de patente, se presentan solamente los resultados concernientes a estos clones truncados. Sin embargo, las características de L-NOX-B11 [47] descritas en esta memoria descriptiva también conciernen a todas las versiones alargadas de todas las secuencias truncadas.
 15

Los clones individuales en el grupo L-NOX-B11 están conservados en gran medida y muestran tramos largos de identidad de secuencia. La siguiente secuencia de consenso se puede ganar a partir de los clones mostrados en la figura 1 A:
 20

CGUGYGN₍₀₋₂₎ACGYAN₍₀₋₁₄₎AAAACN₍₀₋₃₎UAARWCCGAAGGTAATCAWTCUACN₍₀₋₂₎ACG
 (SEQ. ID. No. 1)

en la que Y significa U o C, R significa A o G, W significa U o A.

Como se puede observar, la sustitución de nucleótidos sólo se encuentra en unas pocas posiciones. Además, existen cuatro regiones definidas, donde se da inserción de secuencias; estos loci de inserción se designan como Ins 1 a Ins 4 y corresponden a las letras 'N_(x-y)' en la SEQ ID N° 1. En estas 5 posiciones puede insertarse cualquier nucleótido en cualquier número, preferiblemente en un número dado en los paréntesis en la SEQ ID N° 1. En el locus de inserción 2, el nucleótido preferido insertado es un resto adenosina.

La secuencia de L-NOX-B11 se pliega en una estructura secundaria 10 característica mostrada en la figura 1 B, que comprende un tallo basal, un bucle interno, y una estructura tallo-bucle terminal. Un análisis detallado de todas las secuencias dentro del grupo muestra que los loci de inserción de la secuencia principalmente caen en la región del bucle interno (Ins 2). El tallo-bucle terminal así como el tallo basal son siempre idénticos y parece que son altamente 15 característicos para esta familia de moléculas de unión a ghrelin y sus características específicas. Es necesario mencionar, que se pueden realizar varias sustituciones de secuencia, obvias para los expertos en la técnica, que no interrumpen o sólo interrumpen ligeramente la estructura secundaria proporcionada en la Fig. 1B, sin pérdida de la función específica del ácido 20 nucleico, es decir la discriminación del ghrelin bioactivo frente al bio inactivo. En varias selecciones descritas en la solicitud de patente europea EP 020 23 627.8 y la solicitud de patente internacional PCT/EP03/08542, se encontraron estos tipos de secuencias modificadas. Las características descritas para L-NOX-B11 se pueden transferir a aquellas secuencias, que están 25 suficientemente conservadas con respecto a la secuencia y estructura.

Ejemplo 2: Procedimiento para analizar la liberación de calcio inducida por ghrelin

5 La caracterización funcional de Spiegelmers de unión a ghrelin se realiza en un sistema de ensayo celular que controla la interacción de ghrelin y el receptor de secretagogo de la hormona de crecimiento humano (GHS-R). La liberación de calcio intracelular que se produce por la interacción receptor - ligando se visualiza por medio de un indicador de calcio fluorescente.

10

 Células CHO transfectadas estables que expresan el receptor de ghrelin humano (GHS-R1a) (obtenido de Euroscreen, Gosselies, Bélgica) se siembran con $5 - 7 \times 10^4$ células por pocillo en una placa de 96 pocillos negros con fondo transparente (Greiner) y se cultivaron durante toda una noche a 37°C y CO_2 al 5% en medio UltraCHO (Cambrex) que contenía además 100 unidades/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, 400 $\mu\text{g/ml}$ de geneticina y 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de fungizona.

15

 Antes de cargar con el tinte indicador de calcio fluo - 4, se lavaron las células una vez con 200 μl de CHO-U+ (probenecid 5 mM, HEPES 20 mM en medio Ultra CHO). Después se añaden 50 μl de la solución de tinte indicador (10 μM de fluo-4 (Molecular Probes), 0,08% de pluronic 127 (Molecular Probes) en CHO-U+) y las células se incuban durante 60 minutos a 37°C . Después de esto las células se lavan tres veces con 180 μl de CHO-U+. Finalmente se

20

25 añaden por pocillo 80 μl de CHO-U+.

En el ensayo de estimulación, se usan versiones de longitud completa o truncadas de ghrelin L humano o de rata, o bien en la forma octanolio o desoctanolio, como se ha indicado [ghrelin L y desoctanoli-L-ghrelin se
5 obtuvieron de Bachem (Basilea, Suiza), y ghrelin L (1 - 5), ghrelin L (1 - 10), y desoctanoli-L-ghrelin (1 - 5) eran de Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA)].

Los péptidos respectivos se incuban en CHO-U+ durante 15 a 60 minutos a temperatura ambiente en una placa de 96 tubos de 0,2 ml de bajo
10 perfil. En estas soluciones de estimulación, el péptido está 10 veces concentrado comparado con el ensayo. Para la detección de la liberación de calcio, la solución de estimulación se añade a las células (10 µl/pocillo), y se controla el cambio de la señal de fluorescencia. La medición de las señales de fluorescencia se hace a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una
15 longitud de onda de emisión de 520 nm en un lector de placas multidetección Fluostar Optima (BMG).

Para la medición en paralelo de varias muestras, los pocillos de una fila (perpendicular) de una placa de 96 pocillos se registran juntos. Primero se
20 hacen tres lecturas con un desfase de tiempo de 4 segundos para la determinación de la línea de base. Después se interrumpe el registro y se retira la placa del instrumento. Usando una pipeta multicanal, se añaden 10 µl de la solución de estimulación a los pocillos, después la placa se mete en el instrumento otra vez y se continúa la medición. En total se realizan 20 registros
25 con intervalos de tiempo de 4 segundos.

Para cada pocillo se determina la diferencia entre la fluorescencia máxima y el valor de línea base ($F_{\text{máx}} - F_{\text{mín}}$) y se representa gráficamente frente a concentraciones de ghrelin. En la figura 2, se muestran las curvas dosis respuesta de octanoil- y desoctanoil - ghrelin humano (péptido de longitud completa y truncado). Resulta que tanto el octanoil - ghrelin de longitud completa como el truncado inducen la liberación de calcio, sin embargo, en diferentes grados: el octanoil - ghrelin de longitud completa muestra actividad máxima a una concentración de 30 nM, mientras que el octanoil - ghrelin 1 - 5 solamente estimula a mayores concentraciones de péptido y no alcanza la máxima intensidad de señal en el intervalo de concentración observado. Las formas de desoctanoil de ambos péptidos no estimulan el receptor ghrelin humano a ninguna concentración analizada en el ensayo. Este experimento confirma que los cinco aminoácidos N-terminales de ghrelin son suficientes para la estimulación del receptor de ghrelin humano, y que el grupo octanoil es esencial para la actividad biológica de ghrelin.

Ejemplo 3 Inhibición de liberación de calcio inducida por ghrelin mediante Spiegelmers de unión a ghrelin

La inhibición de la liberación de calcio inducida por ghrelin se midió usando el ensayo celular descrito en el ejemplo 2. Como una modificación del procedimiento, las soluciones de estimulación en el ensayo de inhibición se suplementaron con cantidades variables del Spiegelmer L-NOX-B11. Como

WC2005049828

30

PC1/EP2004/012739

control, se analizaron muestras con péptido solamente (máxima liberación de calcio) y muestras sin péptido (liberación mínima de calcio). Después de incubación durante 15 - 60 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 10 µl de las soluciones de estimulación a las células, dando como resultado una
5 concentración final de péptido de 5 nM. Usualmente se eligieron las concentraciones finales de Spiegelmer de 0,1 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, y 100 nM.

Para cada pocillo se determina la diferencia entre la fluorescencia
10 máxima y el valor de línea base ($F_{max} - F_{min}$). Los valores para el 100% de actividad (sin inhibición) y 0% de actividad (inhibición completa) se pueden obtener a partir de las muestras de control (muestras 'con péptido solamente' y 'sin péptido'). Para todas las otras muestras la actividad correspondiente se calcula en 'tanto por ciento' y se representa gráficamente frente a la
15 concentración de Spiegelmer (curva de inhibición), permitiendo la determinación de la constante de inhibición semi máxima (CI_{50}).

La figura 3 muestra las curvas de inhibición que se producen a partir de un experimento, que analiza la actividad inhibidora de L-NOX-B11 con formas
20 de longitud completa y trunca de octanoll - ghrelín. Resulta que el Spiegelmer inhibe la actividad de todas las formas de octanoll-ghrelín ensayadas: el péptido de longitud completa, ghrelín 1 - 10, y ghrelín 1 - 5. Los valores de CI_{50} no muestran una desviación significativa para los tres péptidos (ghrelín de longitud completa: 7 nM, ghrelín 1 - 10: 8 nM, ghrelín 1 - 5: 8 nM).
25 Se puede concluir, que la región de unión del Spiegelmer está localizada en el

extremo N de ghrelin, que comprende los aminoácidos 1 - 5. La unión de L-NOX-B11 a este motivo mínimo da como resultado la inhibición eficaz de la actividad biológica de ghrelin en el ensayo celular.

5 Ejemplo 4: Discriminación de octanoil-ghrelin y desoctanoil-ghrelin mediante Spiegelmers de unión a ghrelin

Las características de la unión de Spiegelmer L-NOX-B11 a ghrelin se analizaron posteriormente en un ensayo de competición, basándose en el
10 procedimiento descrito en el ejemplo 3. En estos ensayos, el Spiegelmer se incubó con diferentes combinaciones de péptidos ghrelin en las soluciones de estimulación antes de la estimulación de células.

El esquema de combinaciones de péptidos y los resultados del
15 experimento con ghrelin de longitud completa se resumen en la figura 4 (barras numeradas de izquierda a derecha): sin ningún ghrelin, o con desoctanoil - ghrelin en una concentración final de 300 nM, no se puede detectar estimulación de células (barras 1 y 2), aunque ya octanoil - ghrelin en una concentración de 10 nM es suficiente para mediar la liberación de calcio (barra
20 3); la adición adicional de desoctanoil - ghrelin 300 nM (barra 4) no interfiere con la estimulación de células, indicando que el desoctanoil - ghrelin biológicamente inactivo no es un antagonista del receptor. La liberación de calcio mediada por octanoil - ghrelin 10 nM se puede inhibir por un exceso de 3 veces de L-NOX-B11 (barra 5), e incluso la presencia de desoctanoil - ghrelin
25 en un exceso de 30 veces (300 nM) sobre octanoil - ghrelin no compite por la

Inhibición (barra 6). Por el contrario, una concentración de ensayo de octanóil - ghrelin 300 nM y Spiegelmer 30 nM muestra un incremento en la liberación de calcio (barra 7), proporcionando evidencia de que bajo estas condiciones de ensayo se puede lograr una potenciación de la estimulación con octanóil - ghrelin. Este experimento demuestra, que L-NOX-B11 específicamente discrimina entre ghrelin en la forma octanóil y la forma desoctanóil.

El experimento se repitió con ghrelin 1 - 5 en lugar del péptido de longitud completa, mostrando resultados idénticos (Fig. 5). Sin embargo dependiendo de la actividad estimuladora más débil de ghrelin 1 - 5, las señales son comparativamente más bajas.

Ejemplo 5: Requerimientos de unión de L- NOX-B11 a octanóil - ghrelin

El sitio de unión para L-NOX-B11 en octanóil - ghrelin se localiza en el extremo N del péptido (comparar el ejemplo 3) e implica el grupo octanóil (comparar el ejemplo 4). La importancia e implicación de ambos componentes para el caso de unión, péptido y grupo de ácido graso, se muestra en el siguiente experimento.

El fundamento de este experimento es que, los Spiegelmers se unen a sus péptidos de una manera enantio - específica, y el propio grupo octanóil es un grupo aquiral. Si la parte de ácido graso de ghrelin sola fuera suficiente para unir el Spiegelmer, el acto de unión no sería enantio - selectivo

con respecto a la parte péptido; entonces D-NOX-B11 y L-NOX-B11 se deberían unir a D-octanoil - ghrelin de una manera similar.

El NOX-B11 se sintetizó químicamente como L- y D- ARN y se marcó
5 radiativamente usando T4 - Polinucleótidoquinasa (Invitrogen, Karlsruhe) con
γ- ³²[P]-ATP (Hartmann, Analytic, Braunschweig). El ARN se purificó sobre un
gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% y se incubaron 0,5 - 5 p moles de
ARN con D-ghrelin biotinilado 5 μM en tampón de unión [Tris/HCl 20 mM, pH
7,4; NaCl 150 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 1 mM; CaCl₂ 1 mM; Tween-20 al 0,1%]
10 durante 2 horas a 37°C. La comparablemente alta concentración de péptido se
eligió para permitir controlar incluso las interacciones débiles de Spiegelmers.
Posteriormente, se añadió una cantidad constante de matriz UltraLink
conjugada a Estreptavidina. Los complejos de ARN - ghrelin unidos a la matriz
se lavaron con tampón de unión, se contaron en un contador de centelleo
15 (Beckman LS6500), y se representaron gráficamente como porcentaje de la
unión total a D-ghrelin. Cada grupo experimental se analizó por triplicado. Los
resultados del experimento se muestran en la figura 6.

Resulta que el D-NOX-B11 se une específicamente a D-octanoil - ghrelin
20 (barras 1 y 2), mientras que el correspondiente enantiómero L no lo hace
(barras 3 y 4). Este resultado indica que el resto octanoil principalmente sirve
como un grupo hidrófobo, que presenta el motivo GSSFL N-terminal del L-
octanoil - ghrelin en una conformación en la que el Spiegelmer L-NOX-B11 se
une de manera eficaz. Tanto el péptido como la parte octanilo de L-octanoil -
25 ghrelin son necesarias para la unión a L-NOX-B11.

Las características de la presente invención descritas en la memoria descriptiva, las reivindicaciones y/o los dibujos pueden ser material tanto separadamente como en cualquier combinación de los mismos para realizar la
 5 invención en diversas formas de la misma.

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

5

1. Un ácido nucleico que se une a un ghrelin bioactivo.

2. El ácido nucleico que se une específicamente a un ghrelin bioactivo.

10

3. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, mediante el que el ácido nucleico no se une específicamente a un ghrelin bioactivo.

15

4. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 3, mediante el que la unión específica se expresa como el valor de K_d , mediante el que el valor de K_d del ácido nucleico está entre 10 pM a 1 μ M, más preferiblemente entre 100 pM y 500 nM, y lo más preferiblemente entre 1 nM y 100 nM.

20

5. El ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, mediante el que ghrelin bioactivo es n-octanoil ghrelin.

25

6. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el resto n-octanoilo del n-octanoil ghrelin se une mediante un enlace éster a la Ser en la posición 3 de ghrelin.

7. El ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, mediante el que el ácido nucleico es un L-ácido nucleico, preferiblemente un Spiegelmer.
- 5 8. El ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, mediante el que el ácido nucleico se selecciona entre el grupo comprendido por ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico y las mezclas de los mismos.
- 10 9. El ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, mediante el que el ácido nucleico tiene una estructura secundaria mostrada en la figura 1 B.
- 15 10. El ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, mediante el que el ácido nucleico es variable en la estructura del bucle interno de la estructura secundaria mostrada en la figura 1 B.
- 20 11. El ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, mediante el que el ácido nucleico comprende, preferiblemente consiste en, una secuencia de acuerdo con la SEQ ID N° 1.
- 25 12. El ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, mediante el que el ácido nucleico comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia de acuerdo con la SEQ ID N° 2 a SEQ ID N° 15.

13. El uso de un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la unión de ghrelin bioactivo.
- 5 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, mediante el que la unión es selectiva para ghrelin bioactivo con un K_d de ácido nucleico entre 10 pM y 1 μ M, más preferiblemente entre 100 pM y 500 nM, y lo más preferiblemente en el intervalo de 1 nM y 100 nM.
- 10 15. Uso de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, mediante el que la unión excluye la unión de ghrelin diferente del ghrelin bioactivo en presencia de un exceso de 1000 veces de ghrelin bioinactivo sobre ghrelin bioactivo, más preferiblemente en presencia de exceso de 100 veces de ghrelin bioinactivo sobre ghrelin bioactivo, y lo más preferiblemente
- 15 en presencia de exceso de 10 veces de ghrelin bioinactivo sobre ghrelin bioactivo.
16. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, mediante el que el ghrelin bioactivo es n-octanoil ghrelin.
- 20 17. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, mediante el que la unión es una unión *in vivo* o *in vitro*.
18. El uso de un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las
- 25 reivindicaciones 1 a 12 para la detección de ghrelin bioactivo.

19. Uso de acuerdo con la reivindicación 18, mediante el que el ghrelín bioactivo se detecta específicamente.

5 20. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 18 ó 19, mediante el que el ghrelín no bioactivo no es detectado por el ácido nucleico, preferiblemente no es detectado específicamente por el ácido nucleico.

10 21. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, mediante el que el ghrelín bioactivo y / o el ghrelín no bioactivo se detecta *in vivo* y/o *in vitro*.

13 22. El uso de un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la inhibición de ghrelín bioactivo.

23. El Uso de acuerdo con la reivindicación 22, mediante el que el ghrelín bioactivo está inhibido específicamente.

20 24. El Uso de acuerdo con la reivindicación 23, mediante el que el ghrelín no bioactivo no está inhibido por el ácido nucleico, preferiblemente no está inhibido específicamente por el ácido nucleico.

25 25. El uso de acuerdo con cualquiera las reivindicaciones 22 a 24, mediante el que el ghrelín bioactivo es n-octanóil ghrelín.

26. El uso de acuerdo con cualquiera las reivindicaciones 22 a 25, mediante el que la inhibición es inhibición *in vitro* y/o inhibición *in vivo*.
- 5 27. El uso de un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la fabricación de un medicamento.
28. El uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad y/o un trastorno.
- 10 29. El uso de acuerdo con la reivindicación 28, en el que la enfermedad y/o trastorno se selecciona entre el grupo comprendido por obesidad, regulación de balance de energía, apetito, peso corporal, trastornos de alimentación, diabetes, metabolismo de glucosa, tumor, presión sanguínea y enfermedad cardiovascular.
- 15 30. El uso de acuerdo con la reivindicación 28 ó 29, en el que la enfermedad y/o trastorno está mediado por un ghrelín bioactivo.
- 20 31. Un procedimiento para la detección de ghrelín bioactivo, que comprende las siguientes etapas:
- (a) proporcionar una muestra que se va a ensayar para evaluar la presencia de ghrelín bioactivo.
- (b) proporcionar un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las
- 25 reivindicaciones 1 a 12,

(c) hacer reaccionar la muestra con el ácido nucleico,
mediante el que la etapa (a) se puede realizar antes de la etapa (b), o la
etapa (b) se puede realizar antes de la etapa (a).

5 32. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 31, en el que se
proporciona una etapa (d) adicional:

(d) detectar la reacción de la muestra con el ácido nucleico.

10 33. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 32, en el que el ácido
nucleico de la etapa (b) está inmovilizado a una superficie.

34. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 33, en el que el ácido
nucleico está inmovilizado a una superficie mediante un enlace químico
covalente entre la superficie y el ácido nucleico.

15 35. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 34, en el que el ácido
nucleico está inmovilizado a una superficie mediante una pareja de
interacción del ácido nucleico.

20 36. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 35, en el que la
pareja de interacción se selecciona entre el grupo comprendido por
ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas y anticuerpos.

25 37. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 36, en el que la
pareja de interacción es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo

monoclonal, en el que el anticuerpo se une al ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

38. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 36, en el que la pareja de interacción es un ácido nucleico, preferiblemente un ácido nucleico funcional.

39. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 38, en el que el ácido nucleico funcional se selecciona entre el grupo comprendido por aptómeros, Spiegelmers, y ácidos nucleicos que son al menos parcialmente complementarios al ácido nucleico.

40. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 33, en el que el ácido nucleico comprende un primer miembro de un par de parejas de interacción y la superficie comprende un segundo miembro del par de parejas de interacción.

41. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 40, en el que el par de parejas de interacción se selecciona entre el grupo de parejas de interacción comprendido por biotina y avidina, biotina y estreptavidina, y biotina y neutravidina.

42. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 41, en el que el primer miembro del par de parejas de interacción es biotina.

43. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 33 a 42, en el que se forma un complejo inmovilizado de ghrelin bioactivo y el ácido nucleico.
- 5 44. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 43, en el que se detecta el complejo.
45. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 44, en el que se detecta el ghrelin bioactivo.
- 10 46. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 45, en el que se detecta el ghrelin bioactivo mediante un medio de detección que es específico de ghrelin bioactivo.
- 15 47. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 46, en el que se detecta el ghrelin bioactivo mediante un medio de detección que detecta tanto ghrelin bioactivo como ghrelin no bioactivo.
- 20 48. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 44 a 47, en el que el medio de detección se selecciona entre el grupo comprendido por ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas y anticuerpos.
- 25 49. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48, en el que después de la formación del complejo la muestra se retira del recipiente de reacción.

50. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 32, en el que una pareja de interacción de ghrelín bioactivo y/o no bioactivo está inmovilizada sobre una superficie.
- 5
51. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 50, en el que la pareja de interacción se selecciona entre el grupo comprendido por ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas y anticuerpos.
- 10
52. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 51, en el que la pareja de interacción es capaz de unirse a ghrelín bioactivo y/o ghrelín no bioactivo.
- 15
53. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 51 ó 52, en el que la pareja de interacción es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal.
- 20
54. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 51 ó 52, en el que la pareja de interacción es un ácido nucleico funcional.
55. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 54, en el que el ácido nucleico funcional se selecciona entre el grupo comprendido por aptámeros y spiegelmers.

50. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 50 a 56, en el que la pareja de interacción forma un complejo con el ghrelina bioactivo y/o el no bioactivo.
- 5 57. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 50 a 56, en el que el ghrelina bioactivo se detecta por un medio de detección.
58. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 57, en el que el medio de detección es un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las
10 reivindicaciones 1 a 12.
59. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 58, en el que el ácido nucleico se detecta usando un segundo medio de detección.
- 15 60. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 59, en el que el segundo medio de detección se selecciona entre el grupo comprendido por ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas y anticuerpos.
61. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 60, en el que el
20 segundo medio de detección es un anticuerpo, mediante el que preferiblemente el anticuerpo es específico para el ácido nucleico.
62. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 60, mediante el que el
25 segundo medio de detección es un ácido nucleico, preferiblemente una guía molecular.

63. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 60, en el que el ácido nucleico comprende una marca de detección.

5 64. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 63, en el que la marca de detección se selecciona entre el grupo comprendido por biotina, una marca de bromo - desoxuridina, una marca de digoxigenina, una marca de fluorescencia, una marca UV, una marca radiactiva, y una molécula quelante.

10

65. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 63, en el que el segundo medio de detección interactúa con la marca de detección.

66. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 65, en el que

15

la marca de detección es biotina y el segundo medio de detección es un anticuerpo dirigido contra biotina, o en el que

la marca de detección es biotina y el segundo medio de detección es una avidina o una molécula que lleva avidina, o en el que

20

la marca de detección es biotina y el segundo medio de detección es una estreptavidina o una molécula que lleva estreptavidina, o en el que la marca de detección es biotina y el segundo medio de detección es una neutravidina o una molécula que lleva neutravidina, o

en el que la marca de detección es una bromo - desoxiuridina y el segundo medio de detección es un anticuerpo dirigido contra bromo-desoxiuridina, o en el que

la marca de detección es una digoxigenina y el segundo medio de detección es un anticuerpo dirigido contra digoxigenina, o

en el que la marca de detección es un quelante y el segundo medio de detección es un radionúclido.

67. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 50 a 66, en el que el segundo medio de detección se detecta usando un tercer medio de detección, preferiblemente el tercer medio de detección es una enzima, más preferiblemente que muestra una reacción enzimática tras la detección del segundo medio de detección, o el tercer medio de detección es un medio para detectar radiación, más preferiblemente la radiación emitida por un radionúclido.

68. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 56 a 67, en el que después de la formación del complejo la muestra se retira de la reacción, más preferiblemente del recipiente de reacción donde se realizan la etapa (c) y/o la etapa (d).

69. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 32, en el que el ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 comprende un resto de fluorescencia y mediante el que la fluorescencia del resto de fluorescencia es diferente tras la formación

del complejo entre el ácido nucleico y el ghrelín bioactivo y el ghrelín bioactivo libre.

5 70. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 32 y 69, en el que el ácido nucleico es un derivado del ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, mediante el que el derivado del ácido nucleico comprende al menos un derivado fluorescente de adenosina que reemplaza adenosina.

10 71. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 70, en el que el derivado fluorescente de adenosina es etenoadenosina.

15 72. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 69 a 71, en el que el complejo constituido por el derivado del ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y el ghrelín bioactivo se detecta usando fluorescencia.

20 73. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 72, en el que el ghrelín bioactivo es n-octanoil ghrelín.

74. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 73, en el que el ghrelín no bioactivo es ghrelín que es diferente del n-octanoil ghrelín.

75. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 74, en el que una señal se crea en la etapa (c) o la etapa (d) y preferiblemente la señal se correlaciona con la concentración de ghrelin bioreactivo en la muestra.
- 5 76. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 75, en el que la muestra se selecciona entre el grupo comprendido por sangre, plasma, suero, licor y tejidos.
- 10 77. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 76, en el que el procedimiento es un procedimiento de diagnóstico o procedimiento de pronóstico.
- 15 78. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 77, en el que el procedimiento es para diagnóstico, determinación del alcance, y/o pronóstico de una enfermedad y/o trastorno, mediante el que preferiblemente dicha enfermedad y/o trastorno se selecciona entre el grupo comprendido por obesidad, regulación de balance de energía, apetito, peso corporal, trastornos de alimentación, diabetes, 20 metabolismo de glucosa, tumor, presión sanguínea y enfermedad cardiovascular.

WO2005/049828

49

PCT/JP2004/012739

Resumen

La presente invención se refiere a un ácido nucleico que específicamente se une a ghrelin bioactivo, más preferiblemente n-octanoil
5 ghrelin, y su uso para la diagnosis de enfermedades y trastornos mediados por ghrelin.

nombre	secuencia	frecuencia	Seq. ID
B11	CGUGUG—AGGCAAU—AAAACU—UAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC—ACG	65	2
G2	CGUGUG—AGGCAGU—AAAACU—UAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC—ACG	1	3
E12	CGUGUG—AGGCAAU—AAAACU—UAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUGC—ACG	1	4
B7	CGUGUG—AGGCAAU—AAAACA—UAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC—ACG	2	5
A8	CGUGUG—AGGCAAU—AAAACG—UAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC—ACG	2	6
B12	CGUGUG—AGGCAAU—AAAACUUGUAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC—ACG	1	7
E3	CGUGUG—AGGCAAU—AAAACU—UAAGUCCGAAGGUAACCAAUCCUAC—ACG	5	8
C12	CGUGCGGUGAGGCA—AAAAC—GUAAGACCGAAGGUAACCAUCCUACCCACG	1	9
C11	CGUGUG—AGGUAGUAAA—AAAAC—GUAAAUCCGAAGGUAACCAUCCUAC—ACG	2	10
A3	CGUGUG—AGGUAGUAAAAAA—AAAAC—GUAAAUCCGAAGGUAACCAUCCUAC—ACG	2	11
F5	CGUGUG—AGGUAGUAAAAAA—AAAAC—GUAAAUCCGAAGGUAACCAUCCUAC—ACG	1	12
A12	CGUGUG—AGGUAGUAAAAAA—AAAAC—GUAAAUCCGAAGGUAACCAUCCUAC—ACG	1	13
F12	CGUGUG—AGGUAGUAAAAAA—AAAAC—GUAAAUCCGAAGGUAACCAUCCUAC—ACG	2	14
G5	CGUGUG—AGGUAGUAAAAAA—AAAAC—GUAAAUCCGAAGGUAACCAUCCUAC—ACG	1	15

Ins1

—Ins2—

Ins3

Ins4

Figura 1A

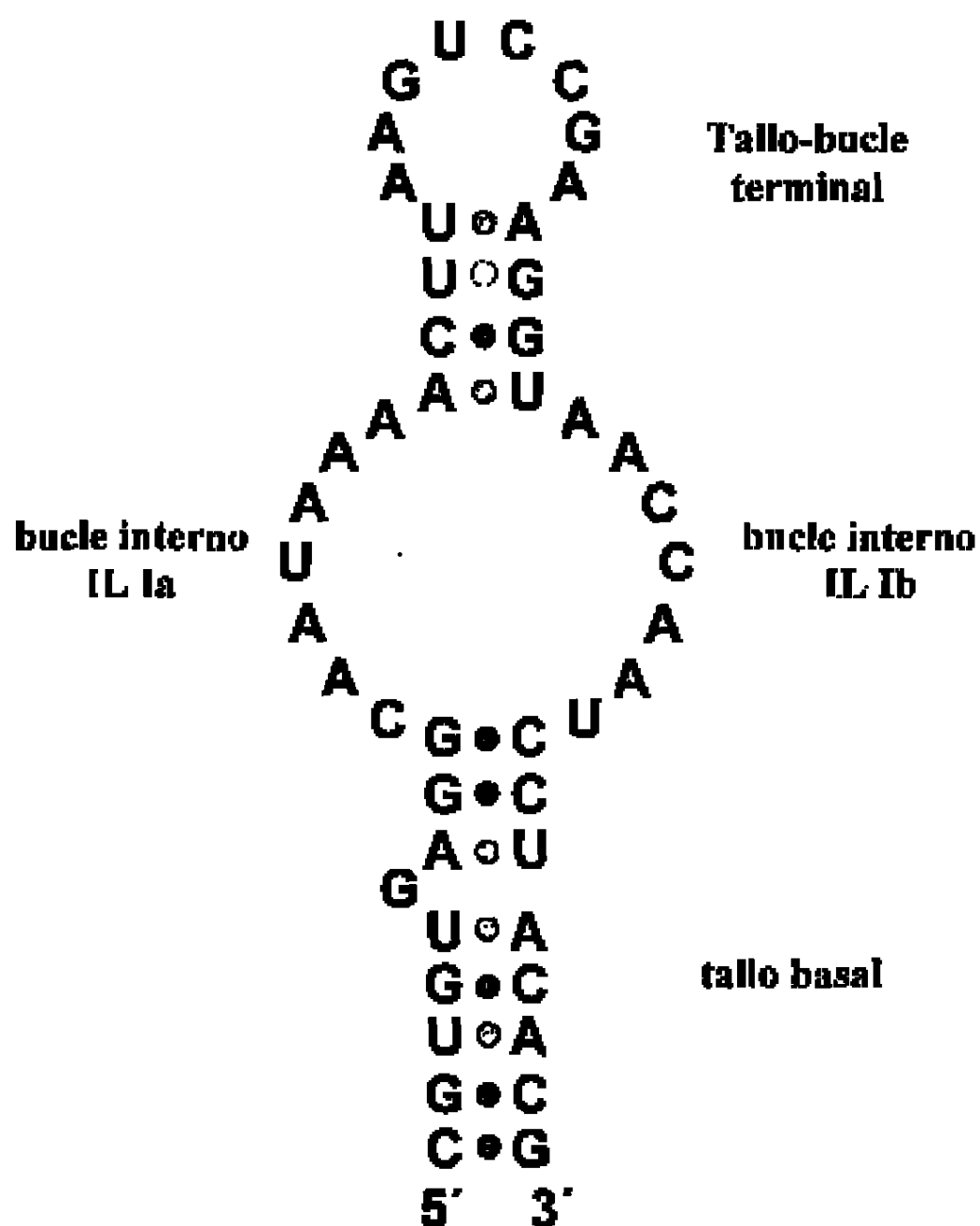
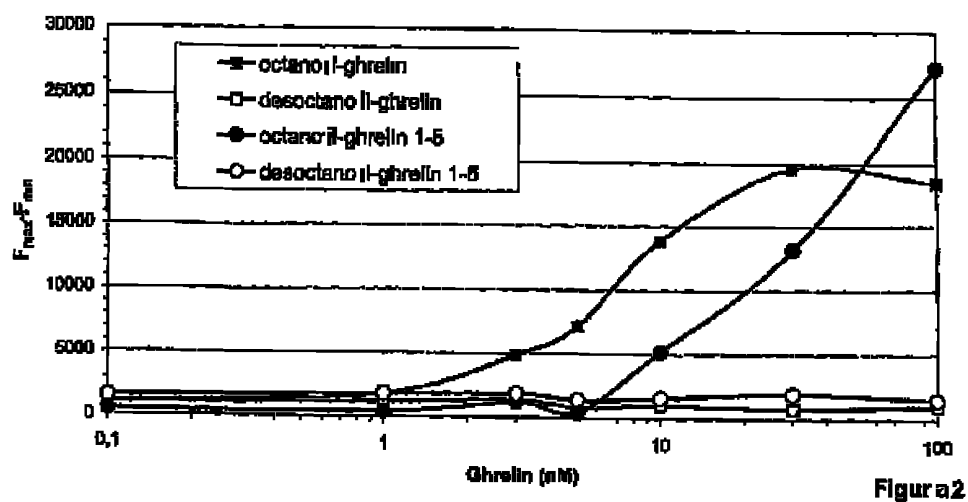


Figura 1B



27

15

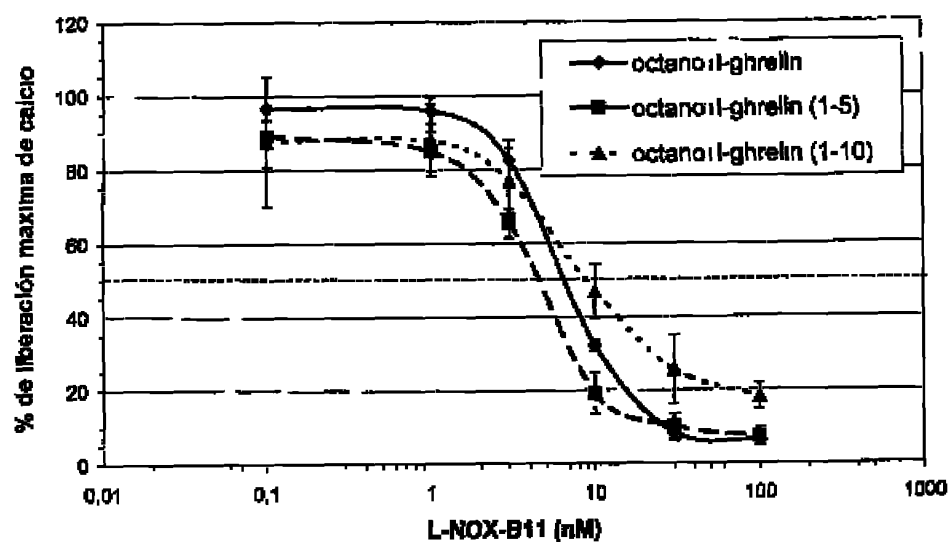


Figura 3

+

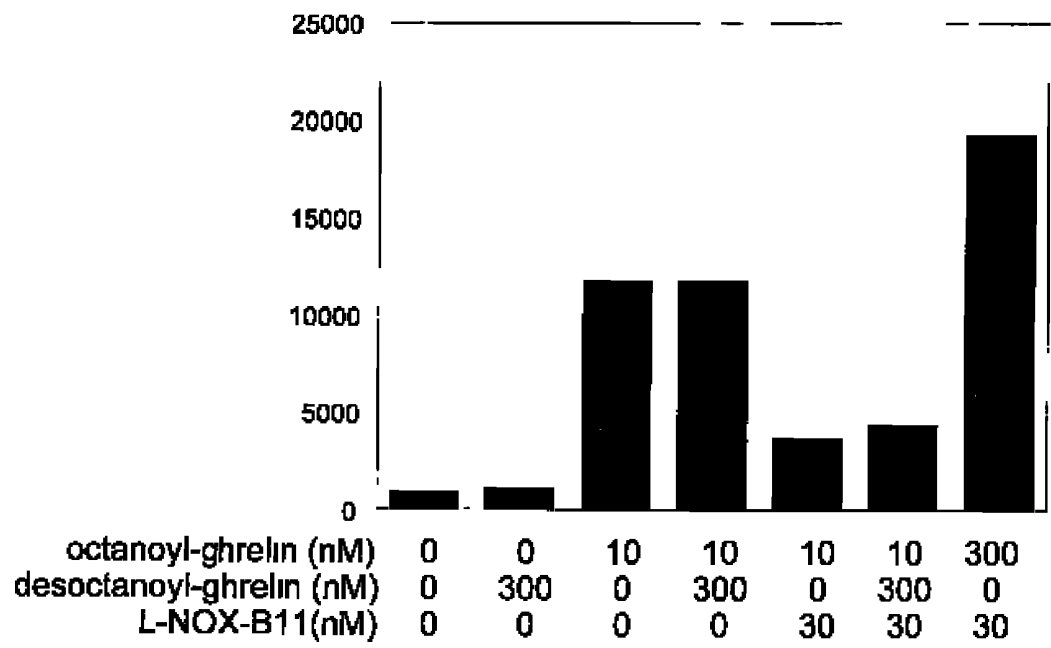


Figure 4

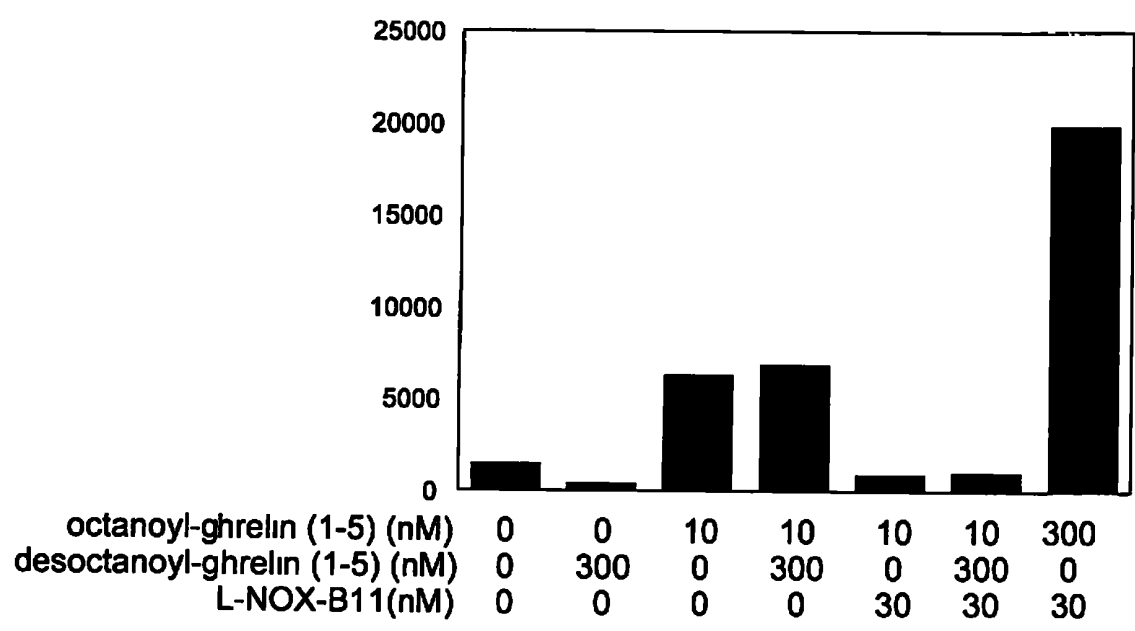


Figure 5

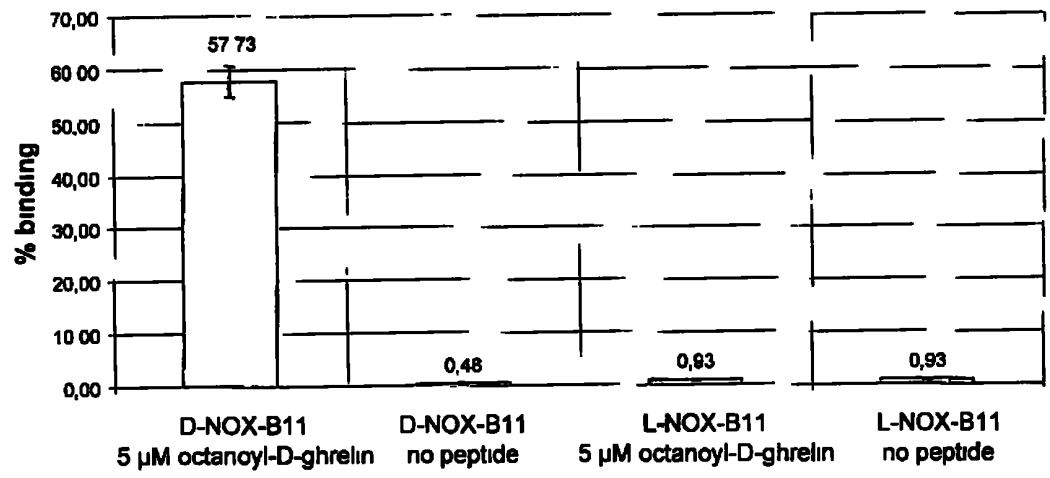


Figure 6

N 10044 PCT

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOXXON Pharma AG

<120> Ácidos nucleicos que se unen específicamente a ghrelín bioactivo

<130> N 10044 PCT

<140> PCT/EP04/012739

<141> 2004-11-10

<160> 21

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 48

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_característica

<223> secuencia de consenso de L-NOX-B11

<220>

<221> misc_característica

<223> secuencia de consenso de L-NOX-B11 de unión a ghrelín

<220>

<221> misc_característica

<222> (7)..(7)

<223> n es cualquiera de a, g, c y u

<220>

<221> misc_característica

<222> (13)..(13)

<223> n es cualquiera de a, g, c y u

<220>

<221> misc_característica

<222> (19)..(19)

<223> n es cualquiera de a, g, c y u

<220>
<221> misc_característica
<222> (45)..(45)
<223> n es cualquiera de a, g, c y u

<400> 1
cgugygnagg yanaaaacnu aarwccgaag guaaccawuc cuacnacg 48

<210> 2
<211> 47
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> misc_característica
<223> L-NOX-B11 de unión a ghrelin

<400> 2
cgugugaggc aauaaaacuu aaguccgaag guaaccaauc cuacacg 47

<210> 3
<211> 47
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> misc_característica
<223> L-NOX-G2 de unión a ghrelin

<400> 3
cgugugaggc aguaaaacuu aaguccgaag guaaccaauc cuacacg 47

<210> 4
<211> 47
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> misc_característica
<223> L-NOX-E12 de unión a ghrelin

<400> 4
cgugugagggc aaubaaacu aaguccgaag guaaccaauc cugcacg 47

<210> 5
<211> 47
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> misc_caracteristica
<223> L-NOX-B7 de unión a ghrelin

<400> 5
cgugugagggc aaubaaacu aaguccgaag guaaccaauc cuacacg 47

<210> 6
<211> 47
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> misc_caracteristica
<223> L-NOX-A8 de unión a ghrelin

<400> 6
cgugugagggc aaubaaacgu aaguccgaag guaaccaauc cuacacg 47

<210> 7
<211> 49
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> misc_caracteristica
<223> L-NOX-B12 de unión a ghrelin

<400> 7
cgugugagggc aaubaaacu guaaguccga agguaaccaa uccuacacg 49

<210> 8
<211> 48
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> misc_característica
<223> L-NOX-E3 de unión a ghrelin

<400> 8
cgugugaggc aaiaaaaaacu uaaguccgaa gguaaccaau ccuacacg 48

<210> 9
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> misc_característica
<223> L-NOX-C12 de unión a ghrelin

<400> 9
cgugcgguga ggcaaaaacg uaagaccgaa gguaaccavu ccuaccacg 50

<210> 10
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> misc_característica
<223> L-NOX-C11 de unión a ghrelin

<400> 10
cgugugaggu aguaaaaaaa cguaaaucg aagguaacca auccuacacg 50

<210> 11
<211> 53
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<221> misc_característica
<223> L-NOX-A3 de unión a ghrelin

<400> 11
cgugugaggu aguaaaaaaa aaacguaaau cgaagguaa ccaauccuac acg 53

<210> 12
 <211> 54
 <212> RNA
 <213> Artificial

<400> 12
 cgugugaggu aguaaaaaaaaa aaacguaaa uccgaaggua accaguccua cacg 54

<210> 13
 <211> 55
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_característica
 <223> L-NOX-A12 de unión a ghrelin

<400> 13
 cgugugaggu aguaaaaaaaaa aaacguaaa uccgaaggua accgaauccu acacg 55

<210> 14
 <211> 56
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_característica
 <223> L-NOX-F12 de unión a ghrelin

<400> 14
 cgugugaggu aguaaaaaaaaa aaacguaaa aauccgaagg uaaccgaucc uacacg 56

<210> 15
 <211> 59
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> misc_característica
 <223> L-NOX-G5 de unión a ghrelin

<400> 15
 ccugugaggu eguaaataaa aaaaaaaac auaaaucga agguaaacaa uccuaacag
 59

<210> 18
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_característica
 <223> ghrelin humano

<400> 16
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys
 1 5 10 15
 Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
 20 25

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_característica
 <223> aminoácidos 1 a 10 de ghrelin humano

<400> 17
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln
 1 5 10

<210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_característica
 <223> aminoácidos 1 a 5 de ghrelin humano

<400> 18

Gly Ser Ser Phe Leu
1 5

<210> 18

<211> 28

<212> PRT

<213> rata

<220>

<221> misc_característica

<223> ghrelin de rata

<400> 19

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> 20

<211> 17

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_característica

<223> secuencia del flanco 5'

<400> 20

ggagcucaga cuucacu

17

<210> 21

<211> 18

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_característica

<223> secuencia del flanco 3'

<400> 21

UACCACUGUC GGUUCCAC

18

N 10044 PCT

INFORME INTERNACIONAL DE BÚSQUEDA

		Nº de expediente internacional PCT/SP/2004/012730
A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE SOLICITUD IPC 7 C12N15/11 C12Q1/68 Según la clasificación internacional de Patentes (IPC) o según clasificación nacional e IPC		
B. CAMPOS INVESTIGADOS Máximo número comprobado en la búsqueda (sistema de clasificación y símbolos de clasificación) IPC 7 C.12N		
Publicaciones investigadas que, sin embargo, no forman parte del material mínimo comprobado, en la medida que pertenecen a los campos de la búsqueda		
Bases de datos electrónicas consultadas en la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y conceptos de búsqueda introducidos) EPI-Internet, SIKSIS, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS FUNDAMENTALES		
Categoría*	Designación de la publicación, si es necesario, indicando las partes relevantes	Resp. a reivindicación N°
A	LEVA S ET AL: 'Ngr. Binding RNA and KNA Splegthens: A novel approach toward Ngr. Antagonism' CHEMISTRY AND BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, LONDON, GB Vol 9, no 3 March 2002 (2002-03) pages 551-569, XP002221140 ISSN: 1074-5521 The whole document -J--	1-12
X Otras publicaciones se indican en la continuación del campo C		X Véase el mismo Familia de patentes
* Categorías especiales de las publicaciones hechas: "A" Publicación que define el estado general de la técnica, pero que no debe considerarse especialmente relevante "E" Documento anterior que, sin embargo, no se ha publicado antes de la fecha de solicitud internacional o incluso posteriormente a ésta. "I" Publicación que surge después la reivindicación de la principal o con la que se pretende comprobar la fecha de publicación de otra publicación indicada en el informe de búsqueda o que se indica por otra razón especial (aquí se indica). "O" Publicación que se refiere a una descripción oral, un uso, una exposición u otras medidas "P" Publicación que se ha publicado antes de la fecha de solicitud internacional, pero después de la fecha de prioridad reivindicada.		"I" Publicación posterior, que se ha publicado después de la fecha de solicitud internacional o después de la fecha de prioridad y con la que se cubren la solicitud, indicando así para la comprensión del público en el que se basa la invención o de la materia en la que se basa la misma. "O" Publicación de importancia especial; solamente en caso a esta publicación, la invención reivindicada no puede considerarse nueva, si puede considerarse que la misma está basada en una solicitud anterior. "P" Publicación de importancia especial; no puede considerarse que la invención reivindicada está basada en una solicitud anterior, si la publicación se asocia a una o a varias otras publicaciones de esta categoría y si esta asociación es relevante para el asunto. "X" Publicación que es miembro de la misma familia de patentes
Fecha de la entrada de la búsqueda internacional 17 de marzo de 2004		01/04/2005
Nombre y dirección postal de la Autoridad Internacional de Búsqueda European Patent Office (Oficina Europea de Patentes) K. - 2280 Leuven Tel (+31-70) 340.2040, Tx. 31 054 000 00 Fax (+31-70) 340.3010		Empresario autorizado Bilang, J

INFORME INTERNACIONAL DE BÚSQUEDA

Datos respecto a publicaciones que forman parte de la misma familia de patentes

Nº de publicación internacional
PCT/EP2004/012738

A	RAGHAVAN M ET AL: "Bioarray: a microchip-based system for analyzing the formation of macromolecular complexes" STRUCTURE, CURRENT BIOLOGY LTD, PHILADELPHIA, PA, US Vol. 3 no.4 April 2003(1093-04) pages 331-333 XP004551485 ISSN: 1093-3129 The whole document	10-21 21-78
A	WOOD S.J: "DNA-DNA HYBRIDIZATION IN REAL TIME USING BIACORE" MICROCHEMICAL JOURNAL, NEW YORK, NY, US Vol. 47 no.1, June 1993(1083-08), pages 331-337, XP005004259 ISSN: 0020-219X The whole document	
P,X	WO 2004/013274 A (NOVON PHARMA AG; HEMLING, STEFFEN; EULBERG, DIRK; MAASCH, CHRISTIAN) 12 February 2004 (2004-02- 12) The whole document	
P,X	HEMLING STEFFEN ET AL: "Inhibition of girefin action in vitro and in vivo by an RNA Splegamine" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, Vol. 101 no. 36 7 September 2004 12174-17179 XP002321440 ISSN: 0027-8424 The whole document	



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

PAQUETE DE INVENCIÓN ☒	MODELO DE UTILIDAD ☐	USUARIO ☐	RADICADOR ☐
Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒		☐	☐
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se solicita la solicitud ☒		☐	☐
Descripción de la invención ☒		☐	☐
Se adjuntan estos documentos ☒		☐	☐
Se adjunta el pago de las tasas establecidas ☒		☐	☐
COMPLETA ☐	INCOMPLETA ☐	☐	☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐	☐	☐
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se solicita la solicitud ☐	☐	☐
Descripción gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o Invencción ☐	☐	☐
Descripción que incorpora el diseño ☐	☐	☐
Se adjunta el pago de las tasas establecidas ☐	☐	☐
COMPLETA ☐	INCOMPLETA ☐	☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐	☐	☐
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se solicita la solicitud ☐	☐	☐
Descripción gráfica del Esquema Trazado ☐	☐	☐
Se adjunta el pago de las tasas establecidas ☐	☐	☐
COMPLETA ☐	INCOMPLETA ☐	☐

Fecha de recepción

1999

[Handwritten signature]

mayo 5 de 2006

129

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2010

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO

REFERENCIA	Radicación No.	06 42741
	Solicitud internacional	EP2004/012739
	Fecha inicio fase nacional	10/06/2006
	Trámite	11
	Evento	978
	Actuación	430
	Oficio No.	8777

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Debe aclarar la solicitud internacional ya que esta presenta defectos en la numeración de las reivindicaciones, o en su defecto adecuar la solicitud en este sentido.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su cesante. (Art. 26-k) Decisión 486.
3. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese al presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENNA CUSPIDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 13 ABO. 2006
adpal