



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 13 845 T2** 2008.01.31

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 465 923 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 14/575** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 13 845.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US03/01454**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 731 965.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/062277**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.01.2003**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **31.07.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.10.2004**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **16.05.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.01.2008**

(30) Unionspriorität:

<b>349117 P</b>	<b>16.01.2002</b>	<b>US</b>
<b>376337 P</b>	<b>29.04.2002</b>	<b>US</b>
<b>388895 P</b>	<b>14.06.2002</b>	<b>US</b>
<b>411988 P</b>	<b>19.09.2002</b>	<b>US</b>

(74) Vertreter:

**TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR**  
Patentanwälte, 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR**

(73) Patentinhaber:

**The Procter & Gamble Company, Cincinnati, Ohio,  
US**

(72) Erfinder:

**ISFORT, Robert Joseph, Fairfield, OH 45014, US;  
MAZUR, Wieslaw Adam, Mason, OH 45040, US**

(54) Bezeichnung: **AGONISTEN DES CORTICOTROPIN-FREISETZENDEN FAKTOR REZEPTORS 2**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## GEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Diese Erfindung bezieht sich auf die Verwendung neuartiger Peptide und Nucleinsäuren, die dieselben kodieren, um CRF<sub>2</sub>R-modulierte Störungen zu behandeln.

## HINTERGRUND

## CRFR und Liganden

**[0002]** Es gibt mindestens zwei Rezeptoren von Corticotropin Releasing Factor (CRF), die bisher identifiziert wurden (CRF<sub>1</sub>R und CRF<sub>2</sub>R), die zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehören. Die Agonistenaktivierung von CRF<sub>1</sub>R oder CRF<sub>2</sub>R führt zu G<sub>qs</sub>-Aktivierung von Adenylatcyclase. Adenylatcyclase katalysiert die Bildung von cAMP, was wiederum zahlreiche Auswirkungen hat, einschließlich der Aktivierung von Proteinkinase A, intrazellulärer Calciumfreisetzung und Aktivierung von Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAP-Kinase). In anderen Studien weist die Verstärkung der intrazellulären Inositoltriphosphatsynthese, nach Agonistenaktivierung der CRF-Rezeptoren, daraufhin, dass CRFRs sich auch mit G<sub>αq</sub> verbinden.

**[0003]** CRF<sub>1</sub>R und CRF<sub>2</sub>R wurden von Menschen, Ratte, Maus, Huhn, Kuh, Wels, Frosch und Schaf geklont. CRF<sub>1</sub>R und CRF<sub>2</sub>R haben jeweils ein einzigartiges Verteilungsmuster. In Menschen wurden drei Isoformen, Alpha, Beta und Gamma, des CRF<sub>2</sub>R-Rezeptors geklont. Homologe für Alpha- und Beta-CRF<sub>2</sub>R wurden in Ratten identifiziert.

**[0004]** Mehrere Liganden/Agonisten der CRFRs sind bekannt und schließen Corticotropin Releasing Factor (oder Hormon, CRF, CRH), Urocortin I, Urocortin II (oder Stresscopin-verwandtes Peptid), Urocortin III (oder Stresscopin), Urotensin I, Sauvagin und andere verbundene Peptide ein. Corticotropin Releasing Factor bindet sich an und aktiviert CRF<sub>1</sub>R und CRF<sub>2</sub>R. CRF ist ein wichtiger Modulator der Körperreaktionen auf Stress. Dieses 41-Aminosäurenpeptid kontrolliert eine Vielzahl von neuronalen, Endokrin- und Immunprozessen als der primäre Regulator der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Hormonachse (HPA-Achse). Zusätzlich besteht eine bedeutende Sequenzhomologie zwischen allen bekannten Liganden von CRFR. Ferner wurden zwei CRF<sub>2</sub>R-selektive Liganden identifiziert, Urocortin II (oder Stresscopin-verwandtes Peptid) und Urocortin III (Stresscopin). Diese Peptide wurden von mehreren Säugetier- und Fischarten identifiziert.

**[0005]** Die CRF-Rezeptoren können pharmakologisch von Nicht-CRFRs durch die Verwendung Rezeptor-selektiver Agonisten und Antagonisten unterschieden werden. Diese selektiven Agonisten und Antagonisten, zusammen mit den CRFR-Knock-out-Mäusen, waren nützlich bei der Bestimmung, welcher CRF-Rezeptor eine bestimmte biologische Reaktion vermittelt.

**[0006]** Die Rolle von CRF<sub>1</sub>R ist relativ gut erwiesen. Mäuse, bei denen das CRF<sub>1</sub>R-Gen entfernt wurde (CRF<sub>1</sub>R-Knockout), zeigen eine beeinträchtigte Stressreaktion und vermindertes angstähnliches Verhalten. CRF<sub>1</sub>R ist ein wichtiger Mediator der HPA-Achse. Besonders CRF, das vom Hypothalamus freigesetzt wird und über das Hypothalamus-Hypophysen-Portalsystem zur vorderen Hypophyse transportiert wird, interagiert mit dem CRF<sub>1</sub>R, das auf Zellen vorliegt, die sich in der vorderen Hypophyse befinden. Agonistenaktivierung des CRF<sub>1</sub>R führt zu der Freisetzung von ACTH von den Zellen der vorderen Hypophyse in die systemische Zirkulation. Das freigesetzte ACTH bindet den ACTH-Rezeptor, der sich auf Zellen im Nebennierenkortex befindet, was zu der Freisetzung von Nebennierenhormonen einschließlich Corticosteroiden führt. Corticosteroide vermitteln zahlreiche Wirkungen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Immunsystemunterdrückung über einen Mechanismus, der Thymus- und Milzatrophy zur Folge hat. Daher resultiert die Aktivierung von CRF<sub>1</sub>R indirekt in der Herunterregulierung des Immunsystems über Aktivierung der HPA-Achse.

**[0007]** Die Rolle von CRF<sub>2</sub>R ist weniger klar erwiesen. Mäuse, bei denen das CRF<sub>2</sub>R-Gen entfernt wurde (CRF<sub>2</sub>R-Knockout), zeigen eine beeinträchtigte oder verminderte Nahrungsaufnahme nach Stimulierung mit Urocortin, mangelnde Vasodilatation, aber eine normale Stressreaktion. Experimente mit CRF<sub>2</sub>R haben gezeigt, dass CRF<sub>2</sub>R für die hypotensiven/die Gefäß erweiternden Wirkungen der CRFR-Agonisten und für die beobachtete Verminderung bei der Nahrungsaufnahme nach Behandlung von Mäusen mit CRFR-Agonisten verantwortlich ist.

**[0008]** Zusätzlich ist CRF<sub>2</sub>R an der Modulation von Skelettmuskelatrophie und der Induktion von Hypertrophie beteiligt. Skelettmuskel ist ein formbares Gewebe, das sich leicht an Änderungen in physiologischen Anforderungen für die Arbeit oder den Stoffwechselbedarf anpasst. Hypertrophie bezieht sich auf eine Erhöhung der Skelettmuskelmasse, während sich Skelettmuskelatrophie auf eine Verringerung der Skelettmuskelmasse bezieht. Akute Skelettmuskelatrophie ist auf eine Vielzahl von Ursachen zurückverfolgbar, einschließlich, aber nicht beschränkt auf: Nichtgebrauch aufgrund eines chirurgischen Eingriffs, Bettruhe oder gebrochener Knochen; Denervierung/Nervenschaden aufgrund von Rückenmarksverletzung, Autoimmunkrankheit oder Infektionskrankheit; Glucocorticoidverwendung für nicht verwandte Zustände; Sepsis aufgrund von Infektion oder anderer Ursachen; Nährstoffbeschränkung aufgrund von Krankheit oder Mangelernährung und Raumfahrt. Skelettmuskelatrophie tritt durch normale biologische Prozesse auf, in bestimmten medizinischen Situationen führt dieser normale biologische Prozess jedoch zu einem schwächenden Grad der Skelettmuskelatrophie. Akute Skelettmuskelatrophie stellt beispielsweise eine bedeutende Begrenzung bei der Rehabilitation von Patienten von Immobilisierungen dar, einschließlich, aber nicht beschränkt auf diejenigen, die eine orthopädische Prozedur begleiten. In solchen Fällen ist die Rehabilitationsperiode, die erforderlich ist, um die Skelettmuskelatrophie rückgängig zu machen, oft wesentlich länger als die Zeitperiode, die erforderlich ist, um die ursprüngliche Verletzung zu heilen. Solche akute Atrophie durch Nichtgebrauch ist ein besonderes Problem bei alten Menschen, die bereits unter bedeutenden altersverbundenen Defiziten bei der Muskelfunktion und -masse leiden, da solche Atrophie zu permanenter Behinderung und vorzeitigem Tod führen kann.

**[0009]** Skelettmuskelatrophie kann auch durch chronische Bedingungen hervorgerufen sein, wie Krebskachexie, chronische Entzündung, AIDS-Kachexie, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD), kongestive Herzinsuffizienz, genetische Störungen, z. B. Muskeldystrophien, neurodegenerative Krankheiten und Sarkopenie (altersbedingter Muskelschwund). In diesen chronischen Bedingungen kann Skelettmuskelatrophie zu einem vorzeitigen Verlust der Mobilität führen und dadurch zu der krankheitsbedingten Morbidität beitragen.

**[0010]** Wenig ist hinsichtlich der molekularen Prozesse bekannt, die Atrophie oder Hypertrophie des Skelettmuskels steuern. Während der initiierende Auslöser der Skelettmuskelatrophie für die verschiedenen Atrophie einleitenden Ereignisse unterschiedlich ist, treten mehrere gemeinsame biochemische Veränderungen in der betroffenen Skelettmuskelfaser auf, einschließlich einer Verminderung bei der Proteinsynthese und einer Erhöhung in der Proteindegradation und Änderungen sowohl in den kontraktilen als auch den metabolischen Enzymprotein-Isozymen, charakteristisch für einen langsamen (hoch oxidativer Stoffwechsel/langsame kontraktile Proteinisoformen) bis schnellen (hoch glycolytischer Stoffwechsel/schnell kontraktile Proteinisoformen) Faserschalter. Zusätzliche Veränderungen im Skelettmuskel, die auftreten, schließen den Verlust der Vaskulatur und Umformung der extrazellulären Matrix ein. Sowohl der schnelle als auch der langsame Schaltmuskel zeigen unter den entsprechenden Bedingungen Atrophie, wobei der relative Muskelschwund von den spezifischen Atrophiestimuli oder der spezifischen Atrophiebedingung abhängt. Alle diese Änderungen sind wesentlich koordiniert reguliert und werden je nach Änderungen im physiologischen und metabolischen Bedarf ein- oder ausgeschaltet.

**[0011]** Die Prozesse, durch die Atrophie und Hypertrophie auftreten, sind über die Säugetierspezies hinweg beibehalten. Mehrere Studien haben gezeigt, dass dieselben grundlegenden molekularen, zellulären und physiologischen Prozesse während Atrophie sowohl in Nagetieren als auch in Menschen auftreten. Daher wurden Nagetiermodelle der Skelettmuskelatrophie erfolgreich eingesetzt, um menschliche Atrophiereaktionen zu verstehen und vorauszusagen. Beispielsweise führt Atrophie, die durch eine Vielzahl von Methoden in Nagetieren und Menschen eingeleitet wurde, zu ähnlichen Veränderungen bei der Muskelanatomie, dem Querschnittsbereich, der Funktion, dem Faserschalten, der kontraktilen Proteinexpression und der Histologie. Zudem wurde gezeigt, dass mehrere Mittel Skelettmuskelatrophie in Nagetieren und Menschen regulieren. Diese Mittel schließen anabole Steroide, Wachstumshormone, insulinähnlichen Wachstumsfaktor I, beta-adrenerge Agonisten und CRF<sub>2</sub>R-Agonisten ein. Zusammen zeigen diese Daten, dass Skelettmuskelatrophie sowohl in Nagetieren als auch in Menschen durch gemeinsame Mechanismen hervorgerufen wird.

**[0012]** Während gezeigt wurde, dass einige Mittel Skelettmuskelatrophie regulieren, und sie für diese Indikation zum Gebrauch bei Menschen freigegeben sind, haben diese Mittel ungewünschte Nebeneffekte wie Hypertrophie des Herzmuskels, Neoplasie, Hirsutismus, Androgenisierung von Frauen, erhöhte Morbidität und Sterberate, Leberschaden, Hypoglykämie, Muskelskelettschmerz, erhöhte Gewebeswellung, Tachycardie und Ödeme. Derzeit gibt es keine hoch wirksamen und selektiven Behandlungen für akute oder chronische Skelettmuskelatrophie. Daher besteht ein fortgesetzter Bedarf, andere therapeutische Mittel zu identifizieren, die Skelettmuskelatrophie behandeln.

## Muskeldystrophien

**[0013]** Muskeldystrophien umfassen eine Gruppe vererbter, progressiver Muskelstörungen, die klinisch durch die selektive Verteilung von Skelettmuskelschwäche unterschieden werden. Die beiden üblichsten Formen der Muskeldystrophie sind Duchenne- und Becker-Dystrophien, die jeweils die Folge der Vererbung einer Mutation im Dystrophingen sind, das sich am Genort Xp21 befindet. Andere Dystrophien schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, Gliedergürtelmuskeldystrophie, die die Folge von Mutation mehrerer Gene ist, einschließlich den Genorten p94 Calpain, Adhelin,  $\gamma$ -Sarcoglycan und  $\beta$ -Sarcoglycan; fascioscapulohumerale (Landouzy-Dejerine) Muskeldystrophie, myotonische Dystrophie und Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie. Die Symptome der Duchenne-Muskeldystrophie, die fast ausschließlich bei Männern auftritt, schließen Watschelgang, Zehengang, Lordose, häufiges Fallen und Schwierigkeiten beim Aufstehen und Treppengehen ein. Symptome beginnen im Alter von etwa 3–7 Jahren, wobei die meisten Patienten mit 10–12 Jahren an den Rollstuhl gebunden sind und viele im Alter von etwa 20 Jahren aufgrund von Atemkomplikationen sterben. Die derzeitige Behandlung für Duchenne-Muskeldystrophie schließt die Verabreichung von Prednison (einer Corticosteroid-Arznei) ein, die, während sie nicht heilend ist, den Niedergang der Muskelstärke verlangsamt und eine Behinderung verzögert. Es wird angenommen, dass Corticosteroide, wie Prednison, durch Blockieren der Immunzellenaktivierung und -infiltration agieren, was durch Muskelfaserschaden durch die Krankheit ausgelöst wird. Leider führt die Corticosteroidbehandlung auch zu Skelettmuskelatrophie, was einen Teil des potenziellen Nutzens der Blockierung der Immunreaktion bei diesen Patienten aufhebt. Daher besteht ein fortgesetzter Bedarf, therapeutische Mittel zu identifizieren, die den Muskelfaserschaden verlangsamen und das Einsetzen von Behinderung bei Patienten mit Muskeldystrophien verzögern, aber ein geringeres Maß an Skelettmuskelatrophie verursachen als derzeitige Therapien.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0014]** Die vorliegende Erfindung bietet isolierte Peptide nach Anspruch 1, die CRF<sub>2</sub>R-Agonisten sind. Spezifisch bietet die Erfindung ein isoliertes Peptid, nach Anspruch 1, oder Nucleinsäure, die selbige codiert, die CRF, Urocortin I, Urocortin II, Urocortin III, Sauvagin, Urotensin I oder verwandte Peptidderivate sind. Die Erfindung bietet auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine sichere und wirksame Menge eines isolierten Peptids der vorliegenden Erfindung und einen pharmazeutisch unbedenklichen Trägerstoff umfasst.

**[0015]** Die Verabreichung eines Peptids oder einer Nucleinsäure, die selbiges codiert, einer pharmazeutischen Zusammensetzung oder eines Sets der vorliegenden Erfindung an eine Person, die dieser bedarf, ist wirksam für die Behandlung von CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störungen wie Skelettmuskelatrophie oder -schwund. Die Erfindung bietet außerdem einen Antikörper, der spezifisch für die Peptide der vorliegenden Erfindung ist. Schließlich bietet die Erfindung den Gebrauch eines Peptids der vorliegenden Erfindung oder einer Nucleinsäure, die selbiges codiert, in der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung einer CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung bei einer Person, die dieser bedarf.

## SEQUENZLISTENBESCHREIBUNG:

**[0016]** Tabelle 1 beschreibt verschiedene Proteine und Proteinfragmentsequenzen, die sich an CRF-Rezeptoren binden. Diese ausgewählten Sequenzen sind mit der/den zugehörigen Genbank- oder Derwent-Annahmezahl(en) und den Tierspezies, von denen sie berichtet werden, sowie Annahmezahlen für verwandte Nucleotid-Sequenzen enthalten, die identische oder fast identische Aminosäure-Sequenzen codieren. Diese bekannten und neuartigen Sequenzen der Erfindung werden ferner in der Sequenzliste aufgeführt.

Tabelle 1

Sequenzbeschreibung	Aminosäure SEQ-ID Nr.:	Spezies	Genbank (GB), Swiss-Prot (SP) oder Derwent (D) Annahmezahl für Nucleotid-Sequenz	Verwandte Gen-bank (GB) oder Derwent (D) Annahmezahlen
Urocortin I-Fragment	1	Homo sapiens	Fragment der AF038633 (GB) Aminosäurereste 83-122	AC109828 (GB) AX015619 (GB) AV708591 (GB) AV708591 (GB) AAZ35707 (D) AAT73432 (D)
Urocortin II-Fragment	2	Homo sapiens	Fragment der AF320560 (GB) Aminosäurereste 72-109	
Urocortin III-Fragment	3	Homo sapiens	Fragment des AF361943 (GB) Aminosäurerests 118-157	AY026949 (GB)
Corticotropin Releasing Hormone-Fragment	4	Homo sapiens	Fragment der V00571 (GB) Aminosäurereste 154-194	AC090195(GB) AC090196 (GB) B0002599(GB) AC021240 (GB) E00245 (GB)
Corticotropin Releasing Factor-Fragment	5	Ovis sp.	E00212 (GB)	J00803 (GB) M22853 (GB)
Sauvagin	6	Phyllomedusa sauvagei	P01144 (SP)	

## BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

## Glossar der Begriffe

**[0017]** Das Folgende ist eine Liste der Definitionen für hier verwendete Begriffe: „Agonist“ bedeutet eine beliebige Verbindung, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Antikörpern, die einen Rezeptor aktiviert. CRFR-Agonisten schließen beispielsweise ein, sind aber nicht beschränkt auf CRF, Urocortin, Urocortin II, Urocortin III, Urotensin I, Sauvagin und verwandte Analoge.

**[0018]** „Antikörper“, in den verschiedenen grammatikalischen Formen, bedeutet Immunoglobulin-Moleküle und immunologisch wirksame Teile der Immunoglobulin-Moleküle, d. h. Moleküle, die einen Antigen bindenden Ort enthalten, der spezifisch ein Antigen bindet. Wie hier verwendet, bezeichnet „isolierter Antikörper“ einen Antikörper, der teilweise oder vollständig von den Proteinen und natürlich vorkommenden organischen Molekülen getrennt wurde, mit denen er natürlicherweise verbunden ist.

**[0019]** „Bindungsaffinität“ bedeutet die Neigung eines Liganden, mit einem Rezeptor zu interagieren, und steht in umgekehrtem Verhältnis zu der Dissoziationskonstante für eine spezifische CRF-Ligand-CRFR-Interaktion. Die Dissoziationskonstante kann direkt über standardmäßige Sättigung, Konkurrenz oder kinetische Bindungstechniken oder indirekt über pharmakologische Techniken gemessen werden, die funktionale Proben und Endpunkte betreffen.

**[0020]** „Heterozygoter Antikörper“ bezeichnet einen Antikörper, der strukturelle Elemente von zwei oder mehr verschiedenen Antikörpermolekülen enthält, z. B. von verschiedenen Tierspezies. Heterozygote Antikörper schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, Antikörper, die als „humanisierte Antikörper“ bekannt sind, die

einschließen, aber nicht beschränkt sind auf, heterozygote Antikörper, die durch die Technik erzeugt werden, die als Pfropfen der hypervariablen Region bekannt ist.

**[0021]** „CRF“ bedeutet Corticotropin Releasing Factor, was dasselbe wie Corticotropin Releasing Hormone (CRH) ist. Exemplarische CRF-Peptide schließen Ratten-/menschliches CRF und Schaf-CRF (siehe US-Pat.-Nr. 4,415,558) und dergleichen ein.

**[0022]** „CRF-Analog“ bezeichnet Substanzen, die als Liganden von CRFRs fungieren. Geeignete CRF-Analoga können von einer Vielzahl von Wirbeltierspezies erlangt werden und schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, Substanzen wie Sauvagin (siehe, z. B., US-Pat.-Nr. 4,605,642), Urotensin (siehe z.B., US-Pat.-Nr. 4,908,352; und 4,533,654), Maus-Urocortin II, menschliches urocortinverwandtes Peptid (Reges, T.M. et al., Proc. Nat'l Acad Sci 98:2843–2848 (2001)), Urocortin (siehe, z. B., WO 97/00063), menschliches Urocortin II (Stresscopin-verwandtes Peptid), menschliches Urocortin III (Stresscopin), Kugelfisch-URP 1, Kugelfisch-URP II, Urotensin I und die CRF-Analoga, beschrieben in US-Pat.-Nr. 4,415,558; 4,489,163; 4,594,329; 4,605,642; 5,109,111; 5,235,036; 5,278,146; 5,439,885; 5,493,006; 5,663,292; 5,824,771; 5,844,074; und 5,869,450. Letzteres Dokument offenbart CRF-ähnliche Peptide, die, indem sie durch Prolin auf der 4- oder 5-Position substituiert werden, für CRF<sub>2R</sub> ausgewählt werden. Spezifische CRF-Analoga schließen ein hUcnI (menschliches Urocortin I, AF038633 (GB)); hUroII (menschliches Urocortin II oder Stresscopin-verwandtes Peptid)(AF320560); hUroIII (menschliches Urocortin III oder Stresscopin, AF361943); hCRF (menschlicher Corticotropin Releasing Factor)(V00571(GB)); oCRF (Corticotropin Releasing Factor vom Schaf, E00212 (GB)); Svg (Sauvagin, P01144 (SP)).

**[0023]** „CRFR-Agonist“ bezeichnet eine Verbindung oder ein Molekül, die bzw. das die Fähigkeit hat, CRF<sub>1R</sub>, CRF<sub>2R</sub> oder beide zu aktivieren.

**[0024]** „CRFR“ bedeutet CRF<sub>1R</sub> oder CRF<sub>2R</sub>. Der Ausdruck „CRFR“ schließt auch gestutzte und/oder mutierte Proteine ein, wobei Regionen des Rezeptormoleküls, die nicht zur Bindung des Liganden oder zum Signalisieren benötigt werden, gelöscht oder modifiziert wurden.

**[0025]** „CRF<sub>1R</sub>“ bezeichnet beliebige Isoformen von CRF<sub>1R</sub> von einer beliebigen Tierspezies. Der CRF<sub>1R</sub> wurde in der Vergangenheit bezeichnet als CRF-RA, PC-CRF, CRF, (Perrin, M.H., et al. Endocrinology 133:3058–3061 (1993), Chen, R., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8967–8971 (1993), Chang, C-P. et al., Neuron 11:1187–1195 (1993), Kishimoto, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:1108–1112 (1995) und Vita, N. et al., FEBS Lett. 335: 1–5 (1993)) oder der CRH-Rezeptor.

**[0026]** Die Definition von CRF<sub>1R</sub> schließt ein, ist aber nicht beschränkt auf, die Rezeptoren, für die die cDNA- oder Genomsequenz, die den Rezeptor codiert, in einer Sequenzdatenbank hinterlegt ist. Diese Sequenzen schließen ein die Annahme-Nrn.: X72304, E11431, L23332, I92584, T37068, T28968, Q81952, L23333, NM\_004382, AF180301, T28970, L25438, L24096, I92586, Q81954, AH006791, NM\_007762, X72305, AF054582, Y14036, AF229359, AF229361, AB055434 und L41563. Die Nucleotid- und Proteinsequenzen dieser Rezeptoren sind erhältlich von GenBank oder Derwent.

**[0027]** „CRF<sub>2R</sub>“ bezeichnet eine beliebige Isoform von CRF<sub>2R</sub> von einer beliebigen Tierspezies. CRF<sub>2R</sub> wurde auch als HM-CRF, CRF-RB, (Kishimoto, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:1108–1112 (1995) und Perrin, M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:2969–2973 (1995)) bezeichnet.

**[0028]** Die Definition des CRF<sub>2R</sub>-Rezeptors schließt ein, ist aber nicht beschränkt auf, die Rezeptoren, für die die DNA-Sequenz, die den Rezeptor codiert, in einer Sequenzdatenbank hinterlegt ist. Diese Sequenzen schließen die Annahme-Nrn: U34587, E12752, NM\_001883, T12247, T66508, AF011406, AF019381, U16253, T12244, T28972, U17858, NM\_009953, Y14037 und AF229360 ein. Die Nucleotid- und Proteinsequenzen dieser Rezeptoren sind erhältlich von GenBank oder Derwent.

**[0029]** „Hemmen“ bedeutet teilweises oder vollständiges Blockieren eines bestimmten Vorgangs oder einer bestimmten Aktivität. Eine Verbindung hemmt beispielsweise Skelettmuskelatrophie, wenn sie Muskelatrophie vollständig oder teilweise verhindert.

**[0030]** „Isoliertes Peptid“ bedeutet, dass ein Peptidmolekül als „isoliert“ bezeichnet wird, wenn physikalische, mechanische oder chemische Methoden angewendet werden, um das Peptid von zellulären Bestandteilen zu entfernen, die normalerweise mit dem Protein verbunden sind. Eine Person mit einschlägiger fachlicher Ausbildung kann einfach standardmäßige Reinigungsmethoden einsetzen, um ein isoliertes Peptid zu erhalten.

**[0031]** „Isolierte Nucleinsäure“ bedeutet, dass ein Nucleinsäuremolekül im Wesentlichen von kontaminierenden Nucleinsäuremolekülen getrennt ist, die andere Polypeptide codieren. Reinigungs- und Sequenzidentifikationstechniken entsprechen dem Stand der Technik.

**[0032]** Wie hier verwendet, werden zwei DNA-Sequenzen als „funktionsmäßig assoziiert“ bezeichnet, wenn die Eigenschaft der Verbindung zwischen den beiden DNA-Sequenzen nicht (1) zu der Einführung einer Rasterverschiebungsmutation führt, (2) die Fähigkeit einer Promoterregion stört, die Transkription der Kodierungssequenzen zu steuern, oder (3) die Fähigkeit des entsprechenden RNA-Transkripts stört, in ein Protein translatiert zu werden. Eine Kodierungssequenz und Regulierungssequenzen sind funktionsmäßig assoziiert, wenn sie kovalent auf eine solche Weise verbunden sind, dass sie die Transkription der Kodierungssequenz unter den Einfluss oder die Kontrolle der Regulierungssequenzen stellen. Eine Promotorregion ist daher funktionsmäßig mit einer Kodierungssequenz assoziiert, wenn die Promotorregion in der Lage ist, die Transkription dieser DNA-Sequenz so zu bewirken, dass das resultierende Transkript in das gewünschte Peptid translatiert werden kann.

**[0033]** „Selektiver Agonist“ bedeutet, dass der Agonist im Allgemeinen eine größere, vorzugsweise bedeutend größere, Aktivität gegenüber einem bestimmten Rezeptor(en) im Vergleich mit anderen Rezeptoren hat, nicht, dass er vollständig inaktiv hinsichtlich anderer Rezeptoren ist.

**[0034]** „Sequenzidentität“ oder „Homologie“ auf dem Niveau der Aminosäure- oder Nucleotid-Sequenz wird durch BLAST-Analyse (Basic Local Alignment Search Tool) bestimmt, wobei der Algorithmus verwendet wird, der von den Programmen blastp, blastn, blastx, tblastn und tblastx eingesetzt wird (Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389–3402 und Karlin et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2264–2268), die für die Suche von Sequenzähnlichkeiten ausgelegt sind. Die vom BLAST-Programm verwendete Herangehensweise ist, zunächst ähnliche Segmente, mit Unterbrechungen (nicht unmittelbar benachbart) und ohne Unterbrechungen (unmittelbar benachbart), zwischen einer Abfragesequenz und einer Datenbanksequenz zu betrachten, dann die statistische Signifikanz aller Übereinstimmungen zu bewerten, die identifiziert wurden, und schließlich nur die Übereinstimmungen zusammenzufassen, die einen zuvor ausgewählten Grenzwert der Signifikanz erfüllen. Für eine Diskussion von grundlegenden Fragen bei der Ähnlichkeitssuche von Sequenzdatenbanken siehe Altschul et al. (1994) Nature Genetics 6, 119–129. Die Suchparameter für Histogramm, Beschreibungen, Ausrichtungen, Expect-Wert (d. h. der statistische Signifikanzgrenzwert für die Meldung von Übereinstimmungen gegenüber Datenbanksequenzen), Obergrenze, Matrix und Filter (niedrige Komplexität) sind die standardmäßigen Einstellungen. Die standardmäßige Bewertungsmatrix, die von blastp, blastx, tblastn und tblastx verwendet wird, ist die BLOSUM62-Matrix (Henikoff et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915–10919), empfohlen für Abfragesequenzen mit einer Länge über 85 Nucleotiden oder Aminosäuren.

**[0035]** Für blastn ist die Bewertungsmatrix durch die Verhältnisse von M (d. h. die Belohnungspunktzahl für ein Paar übereinstimmender Reste) zu N (d. h. die Strafpunktzahl für nicht übereinstimmende Reste) festgelegt, wobei die Standardwerte für M und N +5 bzw. -4 sind. Vier blastn-Parameter wurden wie folgt angepasst: Q = 10 (GAP Creation Penalty); R = 10 (GAP Extension Penalty); wink = 1 (erzeugt Worttreffer in jeder wink-Position in der Abfrage) und gapw = 16 (stellt die Fensterbreite ein, in der Ausrichtungen mit Unterbrechungen erzeugt werden). Die äquivalenten Blastp-Parametereinstellungen waren Q = 9; R = 2; wink = 1; und gapw = 32. Ein Bestfit-Vergleich zwischen den Sequenzen, erhältlich im GCG-Softwarepaket, Version 10.0, verwendet DNA-Parameter GAP = 50 (GAP Creation Penalty) und LEN = 3 (Gap Extension Penalty) und die äquivalenten Einstellungen bei den Proteinvergleichen sind GAP = 8 und LEN = 2.

**[0036]** „Skelettmuskelhypertrophie“ bezeichnet eine Zunahme der Skelettmuskelmasse oder Skelettmuskelfunktion oder beides.

**[0037]** „Skelettmuskelatrophie“ bezeichnet dasselbe wie „Muskelschwund“ und bedeutet eine Verminderung der Skelettmuskelmasse oder Skelettmuskelfunktion oder beides.

**[0038]** Beim Beschreiben einer Proteinstruktur und -funktion wird auf Aminosäuren verwiesen, die das Protein umfassen. Auf die Aminosäuren kann auch mit ihren herkömmlichen Abkürzungen verwiesen werden, wie gezeigt: A = Ala = Alanin; T = Thr = Threonin; V = Val = Valin; C = Cys = Cystein; L = Leu = Leucin; Y = Tyr = Tyrosin; I = Ile = Isoleucin; N = Mn = Asparagin; P = Pro = Prolin; Q = Gln Glutamin; F = Phe = Phenylalanin; D = Asp = Asparaginsäure; W = Trp = Tryptophan; E = Glu = Glutaminsäure; M = Met = Methionin; K = Lys = Lysin; G = Gly = Glycin; R = Arg = Arginin; S = Ser = Serin; H = His = Histidin. Der Buchstabe Z = Glx = Pyrrolidincarbonsäure, wird verwendet, um Glutaminsäure oder Glutamin mit N-Endstelle anzuzeigen, die bzw. das ein internes cyclisches Lactam gebildet hat. Dies wurde in der Sequenzliste unter dem Merkmal

„MODIFIED\_RES" beschrieben, wo angemessen. Der Buchstabe B wird in der Spezifikation verwendet, um Naphthylalanin anzuzeigen, eine Modifikation von Alanin in bestimmten Peptiden, und wurde in der Sequenzliste unter „sonstiges Merkmal" in der Sequenzliste in der Peptid-Sequenz angezeigt, wo es auftritt. Die Abkürzung „Ac" wurde benutzt, um eine modifizierte acetylierte NH<sub>2</sub>-Endstelle in der Spezifikation anzuzeigen, und wurde unter dem Merkmal „MODIFIED\_RES" beschrieben, wo angemessen. Die Peptide der Erfindung sind auch modifiziert, um eine Amidgruppe an der Carboxy-Endstelle zu haben. Dies wird in der Sequenzliste unter dem Merkmal „MODIFIED\_RES" angezeigt. Um eine Löschung oder eine Abwesenheit einer Aminosäure im Zusammenhang des natürlichen Homologs anzuzeigen, wird ein „-" oder „nil" in der Anwendung verwendet.

**[0039]** Sofern nicht anders definiert, haben alle hier verwendeten technischen und wissenschaftlichen Ausdrücke dieselbe Bedeutung, wie gemeinhin von einem Fachmann der Proteinchemie, Pharmakologie oder Molekularbiologie verstanden. Die Methoden, Materialien und Beispiele, die hier beschrieben sind, sollen nicht beschränkend sein. Andere Methoden und Materialien, ähnlich oder gleichwertig zu den hier beschriebenen, können in der Praxis oder dem Prüfen der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

### Peptide

**[0040]** Die vorliegende Erfindung umfasst isolierte, nicht native Peptide, wie in Anspruch 1 angeführt.

**[0041]** Varianten der offenbaren Peptide sind auch von der vorliegenden Erfindung umfasst. Wie hier verwendet, bezeichnen „Varianten" diejenigen Peptide mit zumindest 95 %, vorzugsweise 97 %, mehr bevorzugt 98 % und am meisten bevorzugt 99 % Sequenzidentität mit ihrer jeweiligen nativen Aminosäuresequenz. Fusionsproteine oder N-Endstellen-, C-Endstellen oder interne Erweiterungen, Löschungen oder Einfügungen in der Peptid-Sequenz sollen nicht als die Homologie beeinflussend gedeutet werden.

### Verwendung der Peptide der Erfindung als CRF<sub>2</sub>R-Agonisten

**[0042]** Die Peptide der Erfindung sind nützlich für die Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten, Störungen und Leiden, die durch CRF<sub>2</sub>R oder CRF<sub>2</sub>R-Aktivität moduliert sind. Wie hier verwendet, werden die Begriffe „Krankheit", „Störung" und „Leiden" austauschbar verwendet. Wie hier verwendet, bezieht sich eine Störung, die durch die Begriffe „moduliert von CRF<sub>2</sub>R" oder „moduliert von CRF<sub>2</sub>R-Aktivität" beschrieben wird, auf eine Störung, ein Leiden oder eine Krankheit, wo CRF<sub>2</sub>R-Aktivität ein wirksames Mittel zur Linderung der Störung oder einer oder mehrerer biologischer Manifestationen der Krankheit oder Störung ist oder eine oder Punkte in der biologischen Kaskade stört, die entweder zu der Störung führt oder für die zugrunde liegende Störung verantwortlich ist, oder eines oder mehrere Symptome der Störung mildert. Daher schließen von „Modulation" abhängige Störungen diejenigen ein, bei denen: (1) Der Mangel an CRF<sub>2</sub>R-Aktivität eine „Ursache" dieser Störung oder einer oder mehrerer biologischer Manifestationen ist, unabhängig davon, ob die Aktivität genetisch, durch Infektion, durch Reizung, durch internen Stimulus oder durch eine andere Ursache geändert wurde; (2) Die Krankheit oder Störung oder die beobachtbare Manifestation oder Manifestationen der Krankheit oder Störung durch CRF<sub>2</sub>R-Aktivität gemildert werden (der Mangel an CRF<sub>2</sub>R-Aktivität braucht nicht kausal mit der Krankheit oder Störung oder den beobachtbaren Manifestationen davon verbunden zu sein); (3) CRF<sub>2</sub>R-Aktivität einen Teil der biochemischen oder zellulären Kaskade stört, die zu der Krankheit oder Störung führt oder mit dieser verbunden ist. In dieser Hinsicht ändert die CRF<sub>2</sub>R-Aktivität die Kaskade und kontrolliert so die Krankheit, das Leiden oder die Störung.

**[0043]** In einer Ausführungsform der Erfindung haben die Peptide der vorliegenden Erfindung keine oder nur schwache Aktivität des CRF<sub>1</sub>R-Agonisten. Daher sind die Peptide der vorliegenden Erfindung besonders nützlich für die Behandlung von CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störungen. Eine solche von CRF<sub>2</sub>R modulierte Störung ist Skelettmuskelatrophie. Skelettmuskelatrophie kann durch Nichtgebrauch aufgrund eines chirurgischen Eingriffs, Bettruhe, gebrochener Knochen; Denervation/Nervenschaden aufgrund von Rückenmarksverletzung; Autoimmunkrankheit; Infektionskrankheit; Glucocorticoid-Verwendung für nicht verwandte Leiden; Sepsis aufgrund von Infektion oder anderen Ursachen; Nährstoffbegrenzung aufgrund von Krankheit oder Mangelernährung; Krebskachexie; chronische Entzündung; erworbenes Immunschwäche-Syndrom (AIDS); Kachexie; chronisch-obstruktive Lungenkrankheit (COPD); kongestive Herzinsuffizienz, Sarcopenie und genetische Störungen; z. B. Muskeldystrophien, neurodegenerative Krankheiten hervorgerufen werden.

**[0044]** In einer anderen Ausführungsform führt die Behandlung einer CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung zu einer Erhöhung der Skelettmasse und -funktion. Krankheiten und Leiden, die die Skelettmuskelmasse und -funktion beeinflussen, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, Skelettmuskelatrophie oder -schwund, einschließlich akuter Atrophie/Schwund als Folge von Nichtgebrauch durch Krankheit, chirurgischen Eingriff, Bettruhe



oder Unfall; Nervenschaden aufgrund von Rückenmarksverletzung, Autoimmunkrankheit oder Infektionskrankheit, Glucocorticoid-Verwendung für nicht verwandte Zustände; Sepsis aufgrund von Infektion oder anderen Ursachen; Nährstoffbeschränkung aufgrund von Krankheit oder Mangelernährung und Raumfahrt: und chronische(r) Atrophie/Schwund einschließlich Krebskachexie, chronischer Entzündung, AIDS-Kachexie, COPD, kongestive Herzinsuffizienz, genetische Störungen, z. B. Muskeldystrophien, neurodegenerative Krankheiten und Sarcopenie (altersbedingter Muskelschwund).

**[0045]** In noch einer anderen Ausführungsform schließt die Behandlung von einer CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung Störungen ein, die sich auf den Knochen auswirken. Krankheiten und Leiden, die sich auf den Knochen auswirken, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, Knochenschwund durch Nichtgebrauch aufgrund von Krankheit, chirurgischem Eingriff, Bettruhe oder Unfall; Nervenschaden aufgrund von Rückenmarksverletzung, Autoimmunkrankheit oder Infektionskrankheit; Glucocorticoid-Anwendung für nicht verwandte Leiden; Sepsis aufgrund von Infektion oder anderen Ursachen; Nährstoffbeschränkung aufgrund von Krankheit oder Mangelernährung und Raumfahrt. Alters- und hormonbedingter Knochenschwund (Osteoporose) sind auch eingeschlossen.

**[0046]** In noch einer anderen Ausführungsform schließt die Behandlung einer CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung Störungen ein, die sich auf das Herz und den Kreislauf auswirken, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Hypertonie, kongestive Herzinsuffizienz, Herzschaden aufgrund eines Herzinfarkts, Ischämierereperusionsverletzung, Schlaganfall, Migräne, Gedächtnisverlust, Alzheimersche Krankheit, Demenz und dergleichen.

**[0047]** In noch einer anderen Ausführungsform schließt die Behandlung einer CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung Störungen ein, die sich auf die Gelenke auswirken, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Arthritis, insbesondere Osteoarthritis und rheumatoide Arthritis.

**[0048]** In noch einer anderen Ausführungsform schließt die Behandlung einer CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung metabolische Krankheiten ein, einschließlich Fettleibigkeit und Diabetes.

**[0049]** In noch einer anderen Ausführungsform schließt die Behandlung einer CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung Folgendes ein: Schmerzlinderung; Schwellungsminderung; Allergiereaktionen, Allergie; Senken der Körpertemperatur; Appetitunterdrückung; kongestive Herzinsuffizienz; Stress und Angst; Änderung von unerwünscht niedrigen Konzentrationen der adrenocorticotropischen Hormonausscheidung („ACTH“); Kontrolle von Appetit, sexueller Erregung und kognitiven Funktionen und Verhindern langfristiger Wirkungen von Stress, wie Angststörungen, Anorexia nervosa und melancholische Depression.

**[0050]** Der Ausdruck „Behandlung“ soll hier zumindest die Verabreichung eines Peptids der vorliegenden Erfindung meinen, das eine CRF<sub>2</sub>R-modulierte Störung in einem Säugetierpatienten, vorzugsweise in Menschen, mildert. Somit umfasst der Begriff „Behandlung“: Verhindern des Auftretens einer CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung bei einem Säugetier, insbesondere, wenn das Säugetier dazu neigt, die CRF<sub>2</sub>R-modulierte Störung zu bekommen, aber noch nicht mit der Krankheit diagnostiziert wurde; Hemmen der CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung und/oder Milder oder Umkehren der CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung. Insofern, als die Methoden der vorliegenden Erfindung darauf gerichtet sind, die CRF<sub>2</sub>R-modulierte Störung zu verhindern, ist klar, dass der Ausdruck „verhindern“ nicht erfordert, dass die CRF<sub>2</sub>R-modulierte Störung vollständig vereitelt wird (siehe Webster's Ninth Collegiate Dictionary). Stattdessen bezieht sich der Ausdruck „verhindern“, wie hier verwendet, auf die Fähigkeit der Person mit einschlägiger fachlicher Ausbildung, eine Population zu identifizieren, die für CRF<sub>2</sub>R-modulierte Störungen anfällig ist, so dass die Verabreichung von den Peptiden und Sets der vorliegenden Erfindung vor dem Einsetzen der Symptome der CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung stattfinden kann. Die Population, die für eine bestimmte CRF<sub>2</sub>R-modulierte Störung gefährdet ist, ist einfach zu identifizieren. Die Population, die für die Entwicklung von Muskeldystrophie gefährdet ist, kann zum Beispiel durch Identifizieren von Mutationen in Genen bestimmt werden, die für die Störung charakteristisch sind. Zum Beispiel, und zuvor diskutiert, resultieren Duchenne- und Becker-Dystrophien von dem Ererben einer Mutation im Dystrophiegen, das sich am Genort Xp21 befindet. Diese Personen einer Population, die diese Mutationen haben, sind gefährdet, Muskeldystrophie zu entwickeln. Daher ist die Patientenpopulation identifizierbar und könnte die Verabreichung einer Zusammensetzung oder Einheitsdosisform eines Sets der vorliegenden Erfindung vor dem Fortschreiten der Krankheit erhalten. Daher würde das Fortschreiten von Skelettmuskelatrophie oder -schwund in solchen Personen „verhindert“.

#### Nucleinsäuremoleküle

**[0051]** Die vorliegende Erfindung bietet ferner Nucleinsäuremoleküle, die die Peptide der vorliegenden Erfin-

dung codieren, vorzugsweise in isolierter Form. Wie hier verwendet, ist „Nucleinsäure“ als RNA oder DNA definiert, die ein Peptid der vorliegenden Erfindung wie oben definiert codiert oder zu einer Nucleinsäure-Sequenz komplementär ist, die solche Peptide codiert. Besonders betrachtet werden genomische DNA-, cDNA-, mRNA- und Antisense-Moleküle sowie Nucleinsäuren, die auf alternativen Grundgerüsten basieren oder alternative Grundlagen einschließen, unabhängig davon, ob sie aus natürlichen Quellen abgeleitet oder synthetisiert sind.

**[0052]** Die vorliegende Erfindung bietet ferner ein Fragment eines Codierungs-Nucleinsäuremoleküls. Wie hier verwendet, bezieht sich ein Fragment des Kodierungs-Nucleinsäuremoleküls auf einen kleinen Teil der gesamten Proteinkodierungssequenz. Die Größe des Fragments wird durch die beabsichtigte Verwendung bestimmt. Wenn das Fragment beispielsweise so gewählt wird, dass es einen aktiven Abschnitt eines Peptids der vorliegenden Erfindung codiert, muss das Fragment groß genug sein, um die funktionalen Bereiche des Peptids zu codieren.

**[0053]** Fragmente der Kodierungs-Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung (d. h. synthetische Oligonucleotide), die als Proben oder spezifische Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder zum Synthetisieren von Gensequenzen zur Kodierung von Peptiden der Erfindung verwendet werden, können leicht durch chemische Techniken synthetisiert werden, zum Beispiel die Phosphotriester-Methode von Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc., 103:3185–3191 (1981) oder durch Verwenden automatisierter Synthesemethoden. Zusätzlich können größere DNA-Segmente einfach durch bekannte Methoden hergestellt werden, wie die Synthese einer Gruppe von Oligonucleotiden, die verschiedene modulare Segmente des Gens definieren, gefolgt von der Ligation der Oligonucleotide, um das vollständige modifizierte Gen zu bauen.

**[0054]** Die Kodierungs-Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung können ferner so modifiziert werden, dass sie eine erkennbare Markierung für Diagnose- und Untersuchungszwecke enthalten. Eine Vielzahl solcher Markierungen entsprechen dem Stand der Technik und können problemlos mit den hier beschriebenen Kodierungsmolekülen eingesetzt werden. Geeignete Markierungen schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, Biotin, radiomarkierte Nucleotide und dergleichen. Eine Person mit einschlägiger fachlicher Ausbildung kann eine solche beliebige Markierung problemlos einsetzen, um markierte Varianten der Nucleinsäuremoleküle der Erfindung zu erhalten.

#### Herstellung von Peptiden oder Zellreihen, die Peptide exprimieren

**[0055]** Die Peptide der vorliegenden Erfindung können für eine Vielzahl von Verwendungen hergestellt werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Verwendung als pharmazeutische Reagenzien für die Behandlung von CRF2R modulierten Störungen. Dem Fachmann wird klar sein, dass für einige Ausführungsformen der Erfindung gereinigte Peptide am nützlichsten sind, während für andere Ausführungsformen Zellreihen, die die Peptide exprimieren, am nützlichsten sind.

**[0056]** Da die Peptide der vorliegenden Erfindung kurze Polypeptide sind, erkennt die Person mit einschlägiger fachlicher Ausbildung, dass Peptide der vorliegenden Erfindung durch direkte Synthese, statt durch rekombinierte Mittel, unter Verwendung von dem Stand der Technik entsprechenden Techniken synthetisiert werden können. Siehe Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg (1984); und über Festphasensynthese, siehe, z. B., Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149–54 (1963); Barany et al., Int. J. Peptide Protein Res., 30:705–739 (1987); und US-Pat.-Nr. 5,424,398.

**[0057]** Die Peptide können zum Beispiel entweder mit einem automatisierten Synthetisiergerät Applied Biosystem, Inc. (ABI) Modell 433 oder einem Multireaktor-Synthetisiergerät (Modell Symphony™) von Protein Technology, Inc (PTI) synthetisiert werden. Hinsichtlich der Peptide, die mit dem ABI-Synthetisiergerät synthetisiert werden, werden alle Reagenzien von ABI bezogen (ausschließlich Piperidin, das von Aldrich bezogen wird). Fmoc-Aminosäuren werden von ABI bezogen (außer Fmoc-L-Pyr, das von Chem-Impek bezogen wird). Rink-Amidharze werden von Nova Chemicals bezogen. Standardmäßige 0,1 mMol FastMoc-Chemie mit einfacher Kopplung wird angewendet. Das allgemeine Fmoc-Chemieprotokoll für SPPS (Festphasen-Peptidsynthese) schließt Folgendes ein: 1) Spaltung der Fmoc-Schutzgruppen mit Piperidin; 2) Aktivierung der Carboxylgruppe der Aminosäuren und 3) Kopplung der aktivierten Aminosäuren an die Amino-Endstelle der harzgebundenen Peptidkette, um Peptidbindungen zu bilden. Aminosäuren werden mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-Hexafluorphosphat (HBTU) aktiviert. Eine trockene geschützte Aminosäure in einer Patrone (1,0 mMol) wird in einer Lösung aus HBTU, N,N-Diisopropylethylamin (DIEA) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) in N,N-Dimethylformamid (DMF) mit hinzugefügtem zusätzlichem N-Methylpyrrolidon (NMP) gelöst. Die aktivierte Fmoc-Aminosäure wird fast unmittelbar gebildet und die Lösung wird direkt

in das Umsetzungsgefäß übertragen. Der Schritt der Fmoc-Entschützung wird durch Leitfähigkeitsmessung beobachtet und gesteuert. Die Peptidkette ist auf einem Rink-Amidharz aufgebaut, da das Amid der C-Endstelle erforderlich ist. Das Endprodukt wird ausgiebig mit NMP und Dichlormethan (DCM) gewaschen.

**[0058]** Hinsichtlich der Peptide, die mit dem PTI-Multi-Synthetisiergerät synthetisiert werden, werden alle Fmoc-Aminosäuren von NovaBiochem bezogen (außer Fmoc-Pyr, das von Chem-Impex bezogen wird). Standardmäßige 0,05 mMol-Fmoc-Syntheseprotokolle werden für Synthesen verwendet. Fmoc-Aminosäuren (0,4 mMol) werden in einer Lösung aus HBTU (200 mM), N-Methylmorpholin (NMM, 0,4 M) und N,N-Dimethylformamid (DMF) mit hinzugefügtem zusätzlichem N-Methylpyrrolidon (NMP) gelöst. Die aktivierte Fmoc-Aminosäure wird fast unmittelbar gebildet und die Lösung wird direkt in das Umsetzungsgefäß übertragen. Der Schritt der Fmoc-Entschützung wird zweimal durchgeführt. Die Peptidkette ist auf einem Rink-Amidharz aufgebaut, da das Amid der C-Endstelle erforderlich ist. Das Syntheseendprodukt wird ausgiebig mit NMP und Dichlormethan (DCM) gewaschen.

**[0059]** Die neu synthetisierten Peptide sind entschützt. Die Harze, die synthetisierte Peptide enthalten, werden vom Synthetisiergerät entladen und kurz luftgetrocknet. Unter Verwendung von 1,5–2,0 ml des Spaltungscocktails (umfassend 95 % Trifluoressigsäure (TFA), 2,5 % Ethanodithiol, 2,5 % Thioanisol, 2,5 % Phenol (W/V) in Wasser) für 4 Stunden bei Raumtemperatur werden die Peptide vom Harz gespalten und gleichzeitig werden die Seitenketten-Schutzgruppen [O-t-Butyl (OtBu) für Asp, Glu, Tyr, Thr und Ser; Pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc) für Arg, t-Butoxycarbonyl (Boc) für Trp und Lys; Trityl (Trt) für His, Asn und Gin] unter Entschützungsbedingung entfernt. Die Spalllösung wird durch Filtration vom Harz getrennt. Das Filtrat wird dann mit 15 ml Wasser verdünnt. Sechs Durchgänge der Etherextraktion werden durchgeführt, um das Peptidprodukt zu reinigen. Das Peptid wird lyophilisiert und vor der Reinigung bei –20°C aufbewahrt.

**[0060]** Die entschützten Peptide werden gereinigt und charakterisiert. Das Peptidpulver wird in 50 % Essigsäurelösung gelöst und auf eine C-8 Säule, Vydac 1,0 cm Innendurchmesser 25 cm Länge, mit 5 µm Partikelgröße und 300 Å Porengröße zur Reinigung gespritzt. Ein hochleistungsfähiges Beckman System Gold Flüssigchromatographiesystem (HPLC) mit Ultraviolett-detektor mit dualer Wellenlänge (220 nm und 280 nm) wird verwendet. Ein linearer Gradient von Acetonitril wird programmiert und in die Säule eingeleitet, um das Peptidprodukt von anderen Substanzen zu trennen. Das Eluat wird von einem Pharmacia Fraktionssammler gesammelt und die individuellen Abscheidefraktionen wurden sowohl analytischer HPLC als auch (matrixunterstützter Laser-Desorptions-Ionisation in Verbindung mit Flugzeitmassenspektrometrie) MALDI-TOF MS für die Charakterisierung unterzogen, um die Identität und Reinheit sicherzustellen.

**[0061]** Die Verwendung der rekombinierten DNA-Technologie in der Herstellung der Peptide oder der Zellreihen, die diese Peptide exprimieren, wird auch betrachtet. Solche rekombinierten Methoden entsprechen dem Stand der Technik. Methoden für das Erzeugen von rDNA-Molekülen entsprechen dem Stand der Technik, siehe beispielsweise Sambrook et al., *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Um rekombinierte Peptide der vorliegenden Erfindung zu exprimieren, wird ein Expressionsvektor hergestellt, der eine Nucleinsäure umfasst, die das jeweilige Polypeptid unter der Kontrolle von einem oder mehreren regulierenden Elementen kodiert. Die Sequenz der Nucleinsäuren, die die Peptide der vorliegenden Erfindung kodieren, können von den Peptid-Sequenzen abgeleitet werden, die hier diskutiert oder beansprucht werden.

**[0062]** Durch dem Stand der Technik entsprechende Methoden kann das isolierte Nucleinsäuremolekül, das das jeweilige Peptid kodiert, in einen geeigneten Expressionsvektor gebunden werden. Die Wirts-Expressionsvektorsysteme, die für Zwecke der Erfindung verwendet werden können, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf: Mikroorganismen wie Bakterien (z. B. *E. coli*, *B. subtilis*), umgeformt mit rekombinierten Bacteriophage-DNA-, Plasmid-DNA- oder Cosmid-DNA-Expressionsvektoren, die Nucleotid-Sequenzen enthalten, die die Peptide der vorliegenden Erfindung kodieren; Hefe (z. B. *Saccharomyces*, *Pichia*), umgeformt mit rekombinierten Hefe-Expressionsvektoren, die Nucleotid-Sequenzen enthalten, die die Peptide der vorliegenden Erfindung kodieren; Insektenzellsysteme, die mit rekombinierten Virusexpressionsvektoren (z. B. Baculovirus) infiziert sind, die Nucleotid-Sequenzen enthalten, die die Peptide der vorliegenden Erfindung kodieren; Pflanzenzellsysteme, die mit rekombinierten Virusexpressionsvektoren (z. B. Blumenkohl-Mosaikvirus, Tabak-Mosaikvirus) infiziert oder mit rekombinierten Plasmidexpressionsvektoren (z. B. Ti-Plasmid) umgewandelt sind, die Nucleotid-Sequenzen enthalten, die die Peptide der vorliegenden Erfindung kodieren, oder Säugetierzellsysteme (z. B. COS, CHO, HEK293, NIH3T3), die rekombinierte Expressionskonstrukte beherbergen, die Promotoren enthalten, die von dem Genom von Säugetierzellen (z. B. Metallothionein-Promotor) oder von Säugetierviren (z. B. Retrovirus LTR) abgeleitet sind und auch Nucleotid-Sequenzen enthalten, die die Peptide der vorliegenden Erfindung kodieren.

**[0063]** In Bakteriensystemen kann eine Reihe von Expressionsvektoren vorteilhaft je nach der beabsichtigten Verwendung für das exprimierte Peptid ausgewählt werden. Wenn beispielsweise eine große Menge eines solchen Proteins erforderlich ist, sind Vektoren wünschenswert, die die Expression hoher Konzentrationen von Proteinprodukten steuern. Ein Fachmann kann solche Vektorkonstrukte erzeugen und die Proteine durch eine Vielzahl von Methodologien reinigen, einschließlich selektiver Reinigungstechnologien wie selektive Fusion-Protein-Säulen und Antikörpersäulen und nicht selektive Reinigungstechnologien.

**[0064]** In einem Insektenprotein-Expressionssystem wird der Baculovirus *A. californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) als ein Vektor verwendet, um fremde Gene in *S. frugiperda*-Zellen zu exprimieren. In diesem Fall werden Nucleotid-Sequenzen, die die Peptide der vorliegenden Erfindung kodieren, in nicht wesentliche Bereiche des Virus geklont und unter die Kontrolle eines AcNPV-Promotors gestellt. Die rekombinierten Viren werden dann verwendet, um Zellen zu infizieren, in denen das eingefügte Gen exprimiert ist, und das Protein wird durch eine der vielen Techniken gereinigt, die dem Fachmann bekannt sind.

**[0065]** In Säugetierwirtszellen kann eine Reihe von Expressionssystemen auf Virenbasis verwendet werden. Die Nutzung dieser Expressionssysteme erfordert oft die Erstellung spezifischer Initiationssignale in den Vektoren für effiziente Translation der eingefügten Nucleotid-Sequenzen. Dies ist besonders wichtig, wenn ein Teil der verwendeten Nucleotid-Sequenz das endogene Initiationssignal nicht enthält. Die Platzierung dieses Initiationssignals, im Rahmen mit der Kodierungsregion der eingefügten Nucleotid-Sequenz, sowie das Hinzufügen von Transkription und Translation fördernden Elementen und die Reinigung des rekombinierten Proteins werden durch eine der vielen Methodologien erreicht, die dem Fachmann bekannt sind. Auch wichtig in Säugetierwirtszellen ist die Auswahl eines geeigneten Zelltyps, der zu den erforderlichen Modifikationen des rekombinierten Proteins nach der Translation in der Lage ist. Solche Änderungen, beispielsweise Spaltung, Phosphorylierung, Glycosylierung, Acetylierung usw., erfordern die Auswahl der geeigneten Wirtszelle, die die modifizierenden Enzyme enthält. Solche Wirtszellen schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, CHO, HEK293, NIH3T3, COS usw. und sind Fachleuten bekannt.

**[0066]** Für langfristige rekombinierte Proteine mit hoher Expression ist eine stabile Expression bevorzugt. Zum Beispiel können Zellreihen erstellt werden, die Peptide der vorliegenden Erfindung stabil exprimieren. Ein Fachmann kann, die bekannten Methoden wie Elektroporation, Calciumphosphat-Transfektion oder Liposom-katalysierte Transfektion befolgend, eine Zellreihe erzeugen, die die Peptide der vorliegenden Erfindung stabil exprimiert. Dies wird normalerweise durch Transfektieren von Zellen unter Verwendung von Expressionsvektoren erreicht, die entsprechende Expressionskontrollelemente (z. B. Promotorsequenzen, Enhancersequenzen, transkriptionale Terminationssequenzen, Polyadenylierungsorte, translationale Startorte usw.), eine auswählbare Markierung und das jeweilige Gen enthalten. Die auswählbare Markierung kann entweder in demselben Vektor wie das jeweilige Gen oder auf einem separaten Vektor enthalten sein, der mit dem die Peptid-Kodierungssequenz enthaltenden Vektor kotransfiziert ist. Die auswählbare Markierung in dem Expressionsvektor kann Widerstand auf die Auswahl übertragen und es den Zellen ermöglichen, den Vektor stabil in ihre Chromosomen zu integrieren und zu wachsen, um Foki zu bilden, die wiederum geklont und in Zellreihen erweitert werden können. Als Alternative kann der Expressionsvektor die Wahl der Zelle ermöglichen, die die auswählbare Markierung exprimiert, ein physikalisches Attribut der Markierung verwendend, d. h. Expression des Green Fluorescent Protein (GFP) ermöglicht die Auswahl von Zellen, die die Markierung mithilfe der fluoreszenzaktivierten Zellsortierungsanalyse (FACS) exprimieren.

**[0067]** Ein Fachmann kann einen geeigneten Zelltyp für die Transfektion auswählen, um die Auswahl von Zellen zu ermöglichen, in die die jeweilige Sequenz erfolgreich integriert wurde. Wo beispielsweise die auswählbare Markierung Herpes Simplex Virus-Thymidinkinase, Hypoxanthin-guaninphosphoribosyltransferase oder Adeninphosphoribosyltransferase ist, wäre der entsprechende Zelltyp tk-, hgprt- bzw. aprt-Zellen. Oder normale Zellen können verwendet werden, bei denen die auswählbare Markierung dhfr, gpt, neo oder hygro ist, was Widerstand auf Methotrexat, Mycophenolsäure, G-418 bzw. Hygromycin überträgt.

#### Herstellung von Antikörpern

**[0068]** Antikörper, die selektiv ein oder mehrere Epitope der Peptide der vorliegenden Erfindung erkennen, sind ebenfalls von der Erfindung umfasst. Solche Antikörper schließen beispielsweise polyklonale Antikörper, monoklonale Antikörper, heterozygote Antikörper, menschliche Antikörper, einkettige Antikörper, Fab-Fragmente, F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente, mithilfe einer Fab-Expressionsbibliothek produzierte Moleküle, menschliche Antikörper (polyklonal oder monoklonal), die in transgenen Mäusen produziert wurden, und Epitop-bindende Fragmente der oben stehenden ein.

**[0069]** Die Antikörper können zusammen mit Gentherapietechniken eingesetzt werden, um beispielsweise die Expression der Peptide der vorliegenden Erfindung entweder in Zellen oder direkt in Patientengeweben, in die diese Gene eingeführt wurden, zu bewerten.

**[0070]** Für die Produktion von Antikörpern kann eine Vielzahl von Wirtstieren durch Injektion mit Peptiden der vorliegenden Erfindung, Antipeptid-Antikörpern, Antipeptid-Analogantikörpern oder immunogenen Fragmenten davon durch dem Stand der Technik entsprechende Methoden immunisiert werden. Zur Herstellung eines Anti-Idiotyp-Antikörpers ist das Immunogen ein Anti-Peptid-Antikörper oder ein Anti-Peptid-Analogantikörper. Die Produktion von Anti-Idiotyp-Antikörpern wird zum Beispiel im US-Patent Nr. 4,699,880 beschrieben. Geeignete Wirtstiere schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, Kaninchen, Mäuse, Ziegen, Schafe und Pferde. Immunisierungstechniken entsprechen dem Stand der Technik. Polyklonale Antikörper können vom Serum des immunisierten Tiers gereinigt werden oder monoklonale Antikörper können durch dem Stand der Technik entsprechende Methoden erzeugt werden. Diese Techniken schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, die gut bekannten Hybridom-Techniken von Kohler und Milstein, menschliche B-Zellen-Hybridom-Techniken und die EBV-Hybridom-Technologie. Monoklonale Antikörper können einer beliebigen Immunglobulin-Klasse entstammen, einschließlich IgG, IgE, IgM, IgA und IgD, die entweder leichte Kappa- oder Lambda-Ketten enthalten. Verfahren zur Herstellung und Verwendung von heterozygoten Antikörpern entsprechen dem Stand der Technik und werden zum Beispiel in den US-Pat.-Nrn. 5,807,715; 4,816,397; 4,816,567; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 6,180,370; und 5,824,307 beschrieben.

#### CRF<sub>2</sub>R-Selektivität bestimmende Proben

**[0071]** Die pharmakologische Aktivität und Selektivität der Peptide der vorliegenden Erfindung können unter Verwendung veröffentlichter Testverfahren bestimmt werden. Siehe z. B. WO 02/69908. Da CRF<sub>2</sub>R und CRF<sub>1</sub>R homologe Proteine sind, wird davon ausgegangen, dass ein bestimmter Anteil an Agonisten für CRF<sub>2</sub>R ebenfalls als Agonisten für CRF<sub>1</sub>R agieren wird. Wie oben stehend besprochen, ruft die Aktivierung von CRF<sub>1</sub>R die Aktivierung der HPA-Achse hervor, da erhöhte Corticosteroid-Produktion zu Skelettmuskelatrophie führt. In den meisten Fällen, in denen eine Erhöhung der Muskelmasse oder -funktion gewünscht ist, ist es nicht wünschenswert, die HPA-Achse zu aktivieren. Bei der Auswahl eines Peptids, das für die Behandlung einer CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung nützlich ist, die nicht mit einer Muskeldystrophie verbunden ist, ist es vorzuziehen, dass das Peptid selektiv für CRF<sub>2</sub>R ist. Vorzugsweise zeigt das Peptid 10-fache Selektivität für CRF<sub>2</sub>R gegenüber CRF<sub>1</sub>R (d. h. 10-mal aktiver gegenüber CRF<sub>2</sub>R als gegenüber CRF<sub>1</sub>R), mehr bevorzugt 100-fache Selektivität und am meisten bevorzugt 1000-fache oder größere Selektivität. Da veröffentlichte Studien einen Nutzen einer Corticosteroid-Therapie bei der Behandlung von Muskeldystrophien gezeigt haben, kann es nützlich sein, dass ein CRF<sub>2</sub>R-Agonist ein gewisses Niveau des CRF<sub>1</sub>R-Agonismus beibehält, wenn er zur Behandlung von Muskeldystrophien verwendet wird. Daher wird für die Behandlung von Muskeldystrophien ein Peptid niedrigerer Selektivität, das das CRF<sub>2</sub>R sowie das CRF<sub>1</sub>R in einem ähnlichen Konzentrationsbereich aktiviert, bevorzugt. Vorzugsweise ist das Peptid 100-fach für CRF<sub>2</sub>R gegenüber CRF<sub>1</sub>R selektiv, mehr bevorzugt 10-fach selektiv und am meisten bevorzugt nicht selektiv für CRF<sub>2</sub>R gegenüber CRF<sub>1</sub>R (d. h. die Aktivität der Kandidatverbindung ist im Wesentlichen ähnlich für CRF<sub>2</sub>R und CRF<sub>1</sub>R). In diesem Fall kann es auch mehr bevorzugt sein, dass das Peptid ein Vollagonist für CRF<sub>2</sub>R ist, während es ein Partialagonist für CRF<sub>1</sub>R ist. Ein solches Peptid hätte daher eine eingebaute Grenze für den maximalen Grad der Cortisolserhöhung und des Potenzials für Skelettmuskelatrophie, während die Anti-atrophie-Wirkung, die durch das CRF<sub>2</sub>R moduliert wird, durch Erhöhen der Dosis gesteigert werden könnte. Ein Fachmann wäre in der Lage, unter Verwendung von dem Stand der Technik entsprechenden Methoden einfach zu bestimmen, ob ein Peptid ein Voll- oder Partialagonist des CRF<sub>1</sub>R oder CRF<sub>2</sub>R ist.

**[0072]** Da es wünschenswert ist, Bindungen zwischen CRF<sub>2</sub>R im Vergleich mit CRF<sub>1</sub>R zu benachteiligen, können die oben beschriebenen Prüfungen mithilfe einer Zelle, oder einer Membran von einer Zelle, durchgeführt werden, die nur CRF<sub>2</sub>R exprimiert, oder die Prüfungen können mit einer rekombinierten Quelle von CRF<sub>2</sub>R durchgeführt werden. Zellen, die beide Formen von CRFR exprimieren, können mithilfe von homologer Rekombination modifiziert werden, um das CRF<sub>1</sub>R-Gen zu deaktivieren oder auf andere Weise zu sperren. Als Alternative, wenn die Quelle von CRFR mehr als einen CRFR-Typ enthält, muss das Hintergrundsignal, das vom Rezeptor erzeugt wird, der nicht von Interesse ist, von dem in der Prüfung erhaltenen Signal abgezogen werden. Die Hintergrundreaktion kann durch eine Reihe von Methoden bestimmt werden, einschließlich der Eliminierung des Signals vom CRFR, das nicht von Interesse ist, durch die Verwendung von Antisense, Antikörpern oder selektiven Antagonisten. Bekannte Antagonisten von CRFRs schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, Antalarmin (CRF<sub>R</sub>-selektiv), Antisauvagin-30 (CRF<sub>2</sub>R-selektiv) und Astressin (nichtselektiv für CRF<sub>1</sub>R/CRF<sub>2</sub>R).

**[0073]** Um zu bestimmen, ob ein Peptid CRF<sub>2</sub>R und/oder CRF<sub>1</sub>R aktiviert, sind die Prüfungen üblicherweise auf Zellbasis; jedoch sind zellfreie Prüfungen bekannt, die Agonisten- und Antagonisten-Bindung wie oben beschrieben unterscheiden können. Prüfungen auf Zellbasis schließen die Schritte des Berührens von Zellen, die CRF<sub>1</sub>R oder CRF<sub>2</sub>R exprimieren, mit einem Peptid der vorliegenden Erfindung oder einer Kontrolle und des Messens der Aktivierung des CRFR durch Messen der Expression oder Aktivität der Bestandteile der CRFR-Signaltransduktionspfade ein.

**[0074]** Wie im obigen Abschnitt über den Hintergrund beschrieben, scheinen CRFRs sich über mehrere verschiedene Pfade zu koppeln, einschließlich G<sub>os</sub>, G<sub>oq</sub> oder G<sub>oi</sub>, je nach dem Zelltyp. Es wird angenommen, dass die Agonistenaktivierung des CRFR es dem Rezeptor ermöglicht, über einen dieser Pfade zu signalisieren, sofern die erforderlichen Pfadkomponenten in dem spezifischen Zelltyp vorhanden sind. Um daher ein bestimmtes Peptid der vorliegenden Erfindung auf CRFR-Aktivierung zu prüfen, kann eine Prüfung einen beliebigen Signaltransduktionspfad als den Ablesewert verwenden, selbst wenn der relevante Zelltyp für die Behandlung, in vivo, CRFR über einen anderen Pfad an Skelettmuskelatrophie bindet. Ein Fachmann würde erkennen, dass eine Prüfung für die Identifizierung nützlicher Peptidagonisten unabhängig von dem Pfad, durch den die Rezeptoraktivierung gemessen wurde, effektiv wäre. Prüfungen für die Messung der Aktivierung dieser Signalisierungspfade entsprechen dem Stand der Technik.

**[0075]** Nach dem Berühren mit einem Peptid der vorliegenden Erfindung können beispielsweise Lysate der Zellen hergestellt und auf die Induktion von cAMP geprüft werden. cAMP wird als Reaktion auf G<sub>os</sub>-Aktivierung induziert. Da Gas von anderen Rezeptoren als CRFR aktiviert wird und da ein Testpeptid seine Wirkung durch CRFR oder durch andere Mechanismen ausüben kann, sind zwei Kontrollvergleiche für die Bestimmung relevant, ob das Peptid die Konzentrationen von cAMP über Aktivierung eines CRFRs erhöht. Eine Kontrolle vergleicht die cAMP-Konzentration von Zellen, die mit dem Peptid in Kontakt gebracht wurden, und die cAMP-Konzentration von Zellen, die mit einer Kontrollverbindung in Kontakt gebracht wurden (d. h. die Träger-substanz, in der das Peptid gelöst ist). Wenn das Peptid die cAMP-Konzentrationen im Vergleich zu der Kontrollverbindung erhöht, zeigt dies an, dass das Peptid cAMP durch einen Mechanismus erhöht. Die andere Kontrolle vergleicht die cAMP-Konzentrationen einer CRFR exprimierenden Zellreihe und einer Zellreihe, die im Wesentlichen gleich ist außer, dass sie nicht das CRFR exprimiert, wobei beide Zellreihen mit dem Peptid behandelt wurden. Wenn das Peptid cAMP-Konzentrationen in der CRFR exprimierenden Zellreihe im Verhältnis zur Zellreihe erhöht, die CRFRs nicht exprimiert, ist dies ein Anzeichen, dass das Peptid cAMP über Aktivierung der CRFRs erhöht.

**[0076]** In einem Beispiel wird die cAMP-Induktion mit der Verwendung von DNA-Konstruktionen gemessen, die das cAMP-responsive Element verbunden mit einem einer Vielzahl von Reportergenen enthält, können in Zellen eingeleitet werden, die CRFRs exprimieren. Solche Reportergene schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf Chloramphenicolacetyltransferase (CAT), Luciferase, Glucuronidsynthetase, Wachstumshormon, fluoreszierende Proteine (z. B. Green Fluorescent Protein) oder alkalische Phosphatase. Nach Kontakt der Zellen mit dem Peptid kann die Konzentration der Reportergenexpression quantitativ bestimmt werden, um die Fähigkeit des Peptids zu bestimmen, cAMP-Konzentrationen zu erhöhen, und so die Fähigkeit des Peptids zu bestimmen, das CRFR zu aktivieren.

**[0077]** Die in dieser Prüfung nützlichen Zellen sind dieselben wie für die oben beschriebene CRFR-Bindungsprüfung, außer dass in den Aktivierungsprüfungen verwendete Zellen vorzugsweise einen funktionalen Rezeptor exprimieren, der eine statistisch signifikante Reaktion auf CRF oder einen oder mehrere CRF-Analoga zeigt. Zusätzlich zur Verwendung von Zellen, die CRFRs voller Länge exprimieren, können Zellen hergestellt werden, die CRFRs exprimieren, die die Liganden bindende Domäne des Rezeptors enthalten, der verbunden ist mit oder physikalisch modifiziert wurde, um Reporterelemente zu enthalten oder um mit signalisierenden Proteinen zu interagieren. Ein Wildtyp-CRFR oder CRFR-Fragment kann beispielsweise mit einem G-Protein kondensiert werden, was zu der Aktivierung des kondensierten G-Proteins bei Bindung des Agonisten an den CRFR-Teil des Fusionsproteins führt. Siefert, R. et al., Trends Pharmacol. Sci., 20: 383–389 (1999). Die Zellen sollten außerdem vorzugsweise eine Reihe von Eigenschaften, je nach dem Ablesewert, besitzen, um die induktive Reaktion durch CRF oder das CRF-Analog beispielsweise für die Erkennung einer starken Induktion eines CRE-Reportergens zu maximieren; (a) eine niedrige natürliche Konzentration von cAMP; (b) G-Proteine, die in der Lage sind, mit CRFRs zu interagieren; (c) eine hohe Konzentration von Adenylylcyclase; (d) eine hohe Konzentration von Proteinkinase A; (e) eine niedrige Konzentration von Phosphodiesterasen und (f) eine hohe Konzentration des das cAMP-Reaktionselement bindenden Proteins wären vorteilhaft. Um die Reaktion auf CRF oder ein CRF-Analog zu erhöhen, könnten Wirtszellen hergestellt werden, um eine größere Menge vorteilhafter Faktoren oder eine niedrigere Menge nachteiliger Faktoren zu exprimieren. Zusätzlich könnten alternative Pfade für die Induktion des CRE-Reporters beseitigt werden, um Basiskonzentrationen zu senken.

**[0078]** Die pharmakologische Aktivität von den Peptiden der vorliegenden Erfindung kann durch Verwendung veröffentlichter Testverfahren bestimmt werden. Beispielsweise schließen Modelle von Skelettmuskelatrophie oder -hypertrophie sowohl in vitro-Zellkulturmodelle als auch in vivo-Tiermodelle von Skelettmuskelatrophie ein.

**[0079]** In vitro-Modelle der Skelettmuskelatrophie entsprechen dem Stand der Technik. Solche Modelle sind beispielsweise in Vandenburg, H.H., *In Vitro*, 24:609–619 (1988), Vandenburg, H.H. et al., *J. Biomechanics*, 24 Suppl 1:91–99 (1991), Vandenburg, H.H. et al., *In Vitro Cell. abw. Biol.*, 24(3):166–174 (1988), Chromiak, J.A., et al., *In Vitro Cell. abw. Biol. Anim.*, 34(9):694–703 (1998), Shansky, J., et al., *In Vitro Cell. abw. Biol. Anim.*, 33(9):659–661 (1997), Perrone, C.E. et al., *J. Biol. Chem.*, 270(5):2099–2106 (1995), Chromiac, J.A. und Vandenburg, H.H., *J. Cell. Physiol.*, 159(3):407–414 (1994) und Vandenburg, H.H. und Karlisch, P., *In Vitro Cell. abw. Biol.*, 25(7):607–616 (1989) beschrieben.

**[0080]** Eine Vielzahl von Tiermodellen für Skelettmuskelatrophie entspricht dem Stand der Technik, wie die in den folgenden Verweisen beschriebenen: Herbison, G.J., et al. *Arch. Phys. Bereich Rehabil.*, 60:401–404 (1979), Appell, H-J. *Sports Medicine* 10:42–58 (1990), Hasselgren, P-O. und Fischer, J.E. *World J. Surg.*, 22:203–208 (1998), Agbenyega, E.T. und Wareham, A.C. *Corp. Biochem. Physiol.*, 102A:141–145 (1992), Thomason, D.B. und Booth, F.W. *J. Appl. Physiol.*, 68:1–12 (1990), Fitts, R.H., et al. *J. Appl. Physiol.*, 60:1946–1953 (1986), Bramanti, P., et al. *Int. J. Anat. Embryol.* 103:45–64 (1998), Cartee, G.D. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Bereich Sci.*, 50:137–141 (1995), Cork, L.C., et al. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 229:241–269 (1987), Booth, F.W. und Gollnick, P.D. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 15:415–420 (1983), Bloomfield, S.A. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 29:197–206 (1997). Bevorzugte Tiere für diese Modelle sind Mäuse und Ratten. Diese Modelle schließen beispielsweise Modelle von durch Nichtgebrauch induzierter Atrophie wie Eingipsen oder auf andere Weise Ruhigstellen von Gliedmaßen, Aufhängung hinterer Gliedmaßen, vollständige Immobilisierung des Tiers und Situationen mit verminderter Schwerkraft ein. Modelle von durch Nervenschaden induzierter Atrophie schließen beispielsweise Nervenquetschung, Entfernung von Nervenabschnitten, die bestimmte Muskeln innervieren, Toxinanwendung auf Nerven und Infektion von Nerven mit viralen, bakteriellen oder eukaryoten Infektionsmitteln ein. Modelle von Glucocorticoid-induzierter Atrophie schließen Anwendung von Atrophie induzierenden Dosen von exogenem Glucocorticoid in Tieren und Stimulierung endogener Corticosteroid-Produktion, zum Beispiel durch Anwendung von Hormonen ein, die die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) aktivieren. Modelle von durch Sepsis induzierter Atrophie schließen beispielsweise Impfung mit Sepsis induzierenden Organismen wie Bakterien, Behandlung des Tiers mit immunaktivierenden Verbindungen wie bakteriellem Zellwandextrakt oder Endotoxin und Punktur der Darmwände ein. Modelle von durch Kachexie induzierter Atrophie schließen beispielsweise Impfung eines Tiers mit karzinogenen Zellen mit Kachexiebildungspotenzial, Infektion eines Tiers mit Infektionsmitteln (wie Viren, die AIDS verursachen), was zu Kachexie führt, und Behandlung eines Tiers mit Hormonen oder Cytokinen wie CNTF, TNF, IL-6, IL-1 usw. ein, die Kachexie induzieren. Modelle von durch Herzversagen induzierter Atrophie schließen die Behandlung eines Tiers ein, so dass Herzversagen mit einhergehender Skelettmuskelatrophie auftritt. Durch neurodegenerative Krankheit induzierte Atrophie Modelle schließen Autoimmun-Tiermodelle ein wie diejenigen, die durch die Immunisierung eines Tiers mit neuronalen Komponenten resultieren. Durch Muskeldystrophie induzierte Modelle von Atrophie schließen natürliche oder künstliche genetisch induzierte Modelle der Muskeldystrophie ein wie die Mutation des Dystrophingens, das in der Mdx-Maus auftritt.

**[0081]** Tiermodelle für Skelettmuskelhypertrophie schließen beispielsweise Modelle von erhöhtem Gliedmaßenmuskelgebrauch aufgrund der Inaktivierung der gegenüber liegenden Gliedmaße, Nachwiegen nach einem Nichtgebrauch-Atrophie induzierenden Ereignis, erneute Nutzung eines Muskels, der aufgrund vorübergehenden Nervenschadens atrophierte, erhöhte Nutzung ausgewählter Muskeln aufgrund von Inaktivierung eines synergistischen Muskels (z. B. kompensierende Hypertrophie), erhöhte Muskelnutzung aufgrund erhöhter Belastung des Muskels und Hypertrophie als Folge der Entfernung des Glucocorticoids nach Glucocorticoid-induzierter Atrophie ein. Bevorzugte Tier-Atrophie Modelle schließen das Ischiasnerv-Denervierungs-Atrophie Modell, Glucocorticoid-induziertes Atrophie Modell und das Nichtgebrauch-Atrophie Modell durch Eingipsen des Beins ein, die unten stehend genauer beschrieben sind.

**[0082]** Das Ischiasnerv-Denervierungs-Atrophie Modell betrifft das Narkotisieren des Tiers gefolgt von der chirurgischen Entfernung eines kurzen Segments entweder des rechten oder linken Ischiasnervs, z. B. wird der Ischiasnerv in Mäusen etwa in der Mitte des Femurs isoliert und ein 3–5 mm Segment wird entfernt. Dies denerviert die Muskulatur des unteren hinteren Glieds, was zu Atrophie dieser Muskeln führt. Üblicherweise wird die Innervierung des Biceps femoris intakt gelassen, um eine zufrieden stellende Bewegung des Knies für na-

hezu normalen Gang zu ergeben. Üblicherweise ist die Muskelmasse der denervierten Muskeln, bei unbehandelten Tieren, zehn Tage nach der Denervierung um 30–50% vermindert. Nach der Denervierung werden Testpeptide verabreicht, z. B. durch Injektion oder kontinuierliche Infusion, z. B. über Implantation einer osmotischen Minipumpe (z. B. Atzet, Palo Alto, CA), um ihre Wirkung auf von Denervierung induzierte Skelettmuskelatrophie zu bestimmen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Denervierung werden die Tiere eingeschläfert und die unteren Beinmuskeln werden schnell von den denervierten und nicht denervierten Beinen seziiert, die Muskeln, von Sehnen und Bindegewebe befreit, werden gewogen. Das Ausmaß der Atrophie in den betroffenen Muskeln wird analysiert, beispielsweise durch Messen der Muskelmasse, des Querschnittsbereichs der Muskeln, des Myofaser-Querschnittsbereichs oder des Gehalts des kontraktiven Proteins.

**[0083]** Das Glucocorticoid-induzierte Atrophiemodell betrifft das Verabreichen eines Glucocorticoids an das Versuchstier, z. B. 1,2 mg/kg/Tag Dexamethason im Trinkwasser. Üblicherweise ist die Skelettmuskelmasse, in unbehandelten Tieren, zehn Tage nach der Dexamethason-Verabreichung um 30–50% reduziert. Begleitend mit oder nach Glucocorticoid-Verabreichung werden Testpeptide verabreicht, z. B. durch Injektion oder kontinuierliche Infusion, um ihre Wirkung auf Glucocorticoid-induzierte Skelettmuskelatrophie zu bestimmen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Glucocorticoid-Verabreichung wird das Ausmaß der Atrophie in den betroffenen Muskeln analysiert, wie oben stehend für das Denervierungsmodell beschrieben.

**[0084]** Das Nichtgebrauch-Atrophiemodell durch Eingipsen eines Beins betrifft das Eingipsen eines Hinterbeins eines Tiers vom Knie bis zum Fuß. Üblicherweise ist die Muskelmasse nach zehn Tagen nach dem Eingipsen um 20–40% reduziert. Nach dem Eingipsen werden Testpeptide durch Injektion oder kontinuierliche Infusion durch Implantation einer osmotischen Minipumpe (z. B. Alzet, Palo Alto, CA) verabreicht, um ihre Wirkung auf die durch Eingipsen des Beins induzierte Skelettmuskelatrophie zu bestimmen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Eingipsen des Beins wird das Ausmaß der Atrophie in den betroffenen Muskeln analysiert, wie oben stehend für das Denervierungsmodell beschrieben.

**[0085]** Die Knochenaktivität der betroffenen Peptide kann praktisch unter Verwendung einer Prüfung gezeigt werden, die dafür ausgelegt ist, die Fähigkeit der betroffenen Verbindungen zu prüfen, Knochenvolumen, -masse oder -dichte zu erhöhen. Ein Beispiel solcher Prüfungen ist die Prüfung ovariectomierter Ratten.

**[0086]** In der Prüfung ovariectomierter Ratten werden sechs Monate alte Ratten ovariectomiert, im Alter von 2 Monaten, und dann einmal täglich subkutan mit einer Testverbindung dosiert. Bei Abschluss der Studie kann die Knochenmasse und/oder -dichte durch Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie (DXA) oder periphere quantitative Computer-Tomographie (pQCT) oder mikroberechnete Tomographie (mCT) gemessen werden. Als Alternative können statische und dynamische Histomorphometrie verwendet werden, um die Erhöhung bei Knochenvolumen oder -bildung zu messen.

#### Zusammensetzungen

**[0087]** Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung sind Zusammensetzungen, die umfassen: (a) eine sichere und wirksame Menge eines Peptids der vorliegenden Erfindung und (b) einen pharmazeutisch unbedenklichen Träger. Standardmäßige pharmazeutische Formulierungstechniken werden verwendet, wie diejenigen, die in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Esston, Pa., neueste Ausgabe, offenbart sind.

**[0088]** Eine „sichere und wirksame Menge“ bedeutet eine Menge des Peptids der Erfindung, die ausreicht, um eine positive Modifikation in dem zu behandelnden Leiden signifikant zu induzieren, aber niedrig genug ist, um ernsthafte Nebenwirkungen (wie Toxizität, Reizung oder allergische Reaktion) in einem Tier, vorzugsweise einem Säugetier, mehr bevorzugt einer menschlichen Testperson, die dessen bedarf, zu vermeiden, entsprechend einem angemessenen Nutzen-/Risikoverhältnis bei der Anwendung auf Art und Weise dieser Erfindung. Die spezifische „sichere und wirksame Menge“ variiert offensichtlich mit solchen Faktoren wie dem bestimmten zu behandelnden Leiden, der körperlichen Verfassung des Patienten, der Behandlungsdauer, der Art der Begleittherapie (falls vorhanden), der spezifischen zu verwendenden Dosierungsform, dem eingesetzten Träger, der Löslichkeit des Peptids darin und dem Dosierungsplan, der für die Zusammensetzung erwünscht ist. Ein Fachmann kann die folgenden Belehrungen verwenden, um eine „sichere und wirksame Menge“ gemäß der vorliegenden Erfindung zu bestimmen. Spilker B., Guide to Clinical Studies and Developing Protocols, Raven Press Books, Ltd., New York, 1984, S. 7–13, 54–60; Spilker B., Guide to Clinical Trials, Raven Press, Ltd., New York, 1991, S. 93–101; Craig C. und R. Stitzel, Hrsg., Modern Pharmacology, 2. Auflage, Little, Brown and Co., Boston, 1986, S. 127–33; T. Speight, Hrsg., Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3. Auflage, Williams and Wilkins, Baltimore, 1987, S. 50–56; R. Tallarida, R. Raffa und P. McGonigle, Principles in General Pharmacology, Springer-Verlag, New York, 1988, S. 18–20.



**[0089]** Zusätzlich zu dem betreffenden Peptid enthalten die Zusammensetzungen des Erfindungsgegenstands einen pharmazeutisch unbedenklichen Träger. Der Ausdruck „pharmazeutisch unbedenklicher Träger“, wie hier verwendet, bedeutet einen oder mehrere verträgliche feste oder flüssige Füllstoffverdünnungsmittel oder Verkapselungssubstanzen, die für die Verabreichung an ein Tier, vorzugsweise ein Säugetier, mehr bevorzugt einen Menschen geeignet sind. Der Begriff „verträglich“, wie hier verwendet, bedeutet, dass sich die Bestandteile der Zusammensetzungen mit dem betroffenen Peptid und miteinander in einer Weise vermischen lassen, dass keine Wechselwirkungen auftreten, die die pharmazeutische Wirksamkeit der Zusammensetzung unter normalen Anwendungsbedingungen wesentlich reduzieren würden. Pharmazeutisch unbedenkliche Träger müssen natürlich von einer ausreichend hohen Reinheit und ausreichend niedrigen Toxizität sein, um sie für die Verabreichung an das behandelte Tier, vorzugsweise ein Säugetier, mehr bevorzugt einen Menschen geeignet zu machen.

**[0090]** Einige Beispiele für Substanzen, die als pharmazeutisch unbedenkliche Träger oder Bestandteile davon dienen können, sind: Zucker, wie Lactose, Glucose und Saccharose; Stärken, wie Maisstärke und Kartoffelstärke; Cellulose und seine Derivate, wie Natriumcarboxymethylcellulose, Ethylcellulose und Methylcellulose; pulverförmiges Tragant; Malz, Gelatine; Talk; feste Schmiermittel, wie Stearinsäure und Magnesiumstearat; Calciumsulfat; pflanzliche Öle, wie Erdnussöl, Baumwollsamöl, Sesamöl, Olivenöl, Maisöl und Öl des Theobroma; Polyole wie Propylenglycol, Glycerin, Sorbitol, Mannitol und Polyethylenglycol; Alginsäure; Emulgatoren wie Tweens®; Benetzungsmittel wie Natriumlaurylsulfat; Färbemittel; Geschmacksstoffe; Tablettiermittel, Stabilisatoren; Antioxidationsmittel; Konservierungsstoffe; pyrogenfreies Wasser; isotope Salzlösung und Phosphatpufferlösungen.

**[0091]** Die Wahl eines pharmazeutisch unbedenklichen Trägers, der zusammen mit der betroffenen Verbindung zu verwenden ist, ist grundlegend durch die Art bestimmt, wie das Peptid zu verabreichen ist.

**[0092]** Wenn das betroffene Peptid zu injizieren ist, ist der bevorzugte pharmazeutisch unbedenkliche Träger sterile, physiologische Salzlösung mit einem mit Blut verträglichen kolloidalen Suspensionsmittel, dessen pH-Wert auf etwa 7,4 eingestellt wurde.

**[0093]** Insbesondere umfassen pharmazeutisch unbedenkliche Träger zur systemischen Verabreichung Zucker, Stärken, Cellulose und ihre Derivate, Malz, Gelatine, Talk, Calciumsulfat, pflanzliche Öle, synthetische Öle, Polyole, Alginsäure, Phosphatpufferlösungen, Emulgatoren, isotope Salzlösung und pyrogenfreies Wasser. Bevorzugte Träger zur parenteralen Verabreichung umfassen Propylenglycol, Ethyloleat, Pyrrolidon, Ethanol und Sesamöl. Vorzugsweise umfasst der pharmazeutisch unbedenkliche Träger in Zusammensetzungen zur parenteralen Verabreichung mindestens ungefähr 90 Gew.-% der Gesamtzusammensetzung.

**[0094]** Die Zusammensetzungen dieser Erfindung werden vorzugsweise in Einheitsdosierungsform bereitgestellt. Wie hier verwendet, ist eine „Einheitsdosierungsform“ eine Zusammensetzung dieser Erfindung, die eine Menge eines Peptids enthält, die gemäß guter medizinischer Praxis für die Verabreichung an ein Tier, vorzugsweise ein Säugetier, mehr bevorzugt einen menschlichen Patienten in einer Einzeldosis geeignet ist. Diese Zusammensetzungen enthalten vorzugsweise von etwa 0,1 mg (Milligramm) bis etwa 1000 mg, mehr bevorzugt von etwa 0,5 mg bis etwa 500 mg, mehr bevorzugt von etwa 1 mg bis etwa 30 mg ein Peptid.

**[0095]** Die Zusammensetzungen dieser Erfindung können in jeder beliebigen einer Reihe von Formen vorliegen, die zum Beispiel für orale, rektale, örtliche, nasale, okulare oder parenterale Verabreichung geeignet sind. Abhängig von der speziellen gewünschten Art der Verabreichung kann eine Vielzahl von pharmazeutisch unbedenklichen Trägern, die dem Stand der Technik entsprechen, verwendet werden. Diese umfassen feste oder flüssige Füllmittel, Verdünnungsmittel, hydrotrope Stoffe, oberflächenaktive Mittel und Verkapselungssubstanzen. Optionale pharmazeutisch aktive Substanzen können enthalten sein, die im Wesentlichen nicht die CRF<sub>2</sub>R-Agonistenaktivität der Peptide stören. Die Menge an Träger, die zusammen mit dem Peptid eingesetzt wird, reicht aus, um eine praktische Menge an Substanz zur Verabreichung pro Einheitsdosis des Peptids bereitzustellen. Techniken und Zusammensetzungen zur Herstellung von Dosierungsformen, die in den Verfahren dieser Erfindung nützlich sind, sind in den folgenden Referenzen beschrieben: Modern Pharmaceutics, Kapitel 9 und 10 (Banker & Rhodes, Herausgeber, 1979); Lieberman et al., Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets (1981); und Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms 2. Ausgabe (1976).

**[0096]** Es können verschiedene orale Dosierungsformen verwendet werden, einschließlich solcher fester Formen wie Tabletten, Kapseln, Granalien und Schüttgut. Diese oralen Formen umfassen eine sichere und wirksame Menge, in der Regel mindestens ungefähr 5 % und vorzugsweise von ungefähr 25 % bis ungefähr 50 % Peptid. Tabletten können komprimiert, Tablettenpulver, säureresistent überzogen, mit Zuckerguss überzogen,

mit einer Schicht überzogen oder mehrfachkomprimiert sein und geeignete Bindemittel, Schmiermittel, Verdünnungsmittel, Aufschlussmittel, Farbstoffe, Geschmackszusätze, Verlaufmittel und Schmelzmittel enthalten. Flüssige orale Dosierungsformen umfassen wässrige Lösungen, Emulsionen, Suspensionen, Lösungen und/oder Suspensionen, die von nicht sprudelnden Granalien zur ursprünglichen Konzentration gelöst wurden, und sprudelnde Zubereitungen, die von Sprudelgranalien zur ursprünglichen Konzentration gelöst wurden, die geeignete Lösungsmittel, Konservierungsstoffe, Emulgatoren, Suspendiermittel, Verdünnungsmittel, Süßstoffe, Schmelzmittel, Farbstoffe und Geschmackszusätze enthalten.

**[0097]** Der pharmazeutisch unbedenkliche Träger, der für die Herstellung der Einheitsdosierungsform für perorale Verabreichung geeignet ist, entspricht dem Stand der Technik. Tabletten umfassen üblicherweise herkömmliche pharmazeutisch verträgliche Adjuvantien wie inerte Verdünnungsmittel, wie Calciumcarbonat, Natriumcarbonat, Mannitol, Lactose und Cellulose; Bindemittel wie Stärke, Gelatine und Saccharose; zersetzende Wirkstoffe wie Stärke, Alginsäure und Croscarmellose; Schmiermittel wie Magnesiumstearat, Stearinsäure und Talk. Fließregulierungsmittel wie Siliziumdioxid können verwendet werden, um die Fließeigenschaften der Pulvermischung zu verbessern. Farbstoffe, wie die FD&C-Farbstoffe, können für das Aussehen hinzugefügt werden. Süßstoffe und Geschmackszusätze, wie Aspartam, Saccharin, Menthol, Pfefferminz und Fruchtgeschmacksstoffe sind nützliche Adjuvantien für Kautabletten. Kapseln umfassen üblicherweise ein oder mehrere feste, oben stehend offenbarte Verdünnungsmittel. Die Auswahl von Trägerkomponenten hängt von sekundären Überlegungen wie Geschmack, Kosten und Lagerstabilität ab, die für die Zwecke des Erfindungsgegenstands nicht von wesentlicher Bedeutung sind, und kann problemlos von einem Fachmann getroffen werden. Im Allgemeinen schließt die Formulierung das Peptid und inerte Bestandteile ein, die einen Schutz gegen die Magen Umgebung und die Freisetzung der biologisch aktiven Substanzen im Darm ermöglichen.

**[0098]** Das Peptid der Erfindung kann chemisch so modifiziert sein, dass orale Abgabe des Derivats wirksam ist. Im Allgemeinen ist die betrachtete chemische Modifizierung das Anfügen von mindestens einer Einheit an das Proteinmolekül selbst, wobei die Einheit (a) Hemmung der Proteolyse und (b) Aufnahme in den Blutkreislauf vom Magen oder Darm ermöglicht. Auch gewünscht ist die Erhöhung der allgemeinen Stabilität des Proteins und Erhöhung der Zirkulationszeit im Körper. Beispiele solcher Einheiten sind unter anderem: Polyethylenglycol, Copolymere von Ethylenglycol und Propylenglycol, Carboxymethylcellulose, Dextran, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon und Polyprolin. Newmark et al., J. Appl. Biochem., 4:185–189 (1982). Andere Polymere, die verwendet werden könnten, sind Poly-1,3-dioxolan und Poly-1,3,6-tioxocan. Bevorzugt für die pharmazeutische Verwendung sind, wie oben stehend angegeben, Polyethylenglycol-Einheiten.

**[0099]** Der Ort der Freisetzung kann der Magen, der Dünndarm (der Zwölffingerdarm, der Jejunum oder der Ileum) oder der Dickdarm sein. Einem Fachmann stehen Formulierungen zur Verfügung, die sich nicht im Magen lösen, jedoch das Material im Zwölffingerdarm oder anderswo im Darm freisetzen. Vorzugsweise vermeidet die Freisetzung schädliche Wirkungen der Magen Umgebung, entweder durch Schutz des Peptids (oder der Variante) oder durch Freisetzung der biologisch aktiven Substanz außerhalb der Magen Umgebung, wie im Darm.

**[0100]** Um vollständigen gastrischen Widerstand zu gewährleisten, wird eine Beschichtung bevorzugt, die bis mindestens pH 5,0 undurchlässig ist. Beispiele der üblicheren inerten Bestandteile, die als enterale Beschichtungen verwendet werden, sind Celluloseacetatrimellitat (CAT), Hydroxypropylmethylcellulosephthalat (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, Polyvinylacetatphthalat (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, Celluloseacetatphthalat (CAP), Eudragit L, Eudragit S und Schellack. Diese Beschichtungen können als gemischte Schichten verwendet werden.

**[0101]** Perorale Zusammensetzungen schließen außerdem flüssige Lösungen, Emulsionen, Suspensionen und dergleichen ein. Die pharmazeutisch unbedenklichen Träger, die für die Herstellung solcher Zusammensetzungen geeignet sind, entsprechen dem Stand der Technik. Typische Bestandteile von Trägern für Sirupe, Elixiere, Emulsionen und Suspensionen schließen Ethanol, Glycerol, Propylenglycol, Polyethylenglycol, flüssige Saccharose, Sorbit und Wasser ein. Für eine Suspension schließen typische Suspendiermittel Methylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose, Avicel<sup>®</sup> RC-591, Tragant und Natriumalginat ein; typische Benetzungsmittel schließen Lecithin und Polysorbat 80 ein und typische Konservierungsstoffe schließen Methylparaben und Natriumbenzoat ein. Perorale flüssige Zusammensetzungen können auch einen oder mehrere Bestandteile wie Süßstoffe, Geschmackszusätze und Farbstoffe, die oben stehend offenbart sind, enthalten.

**[0102]** Zusammensetzungen des Erfindungsgegenstands können wahlweise andere Wirkstoffe einschließen. Nicht beschränkende Beispiele von Wirkstoffen sind in WO 99/15210 aufgeführt.

**[0103]** Andere Zusammensetzungen, die nützlich für das Erreichen systemischer Abgabe der betreffenden Verbindungen sind, schließen sublinguale, bukkale, Suppositorium-, nasale und pulmonale Dosierungsformen ein. Solche Zusammensetzungen schließen üblicherweise eine oder mehrere lösliche Füllsubstanzen wie Saccharose, Sorbit und Mannitol ein und Bindemittel wie Akaziengummi, mikrokristalline Cellulose, Carboxymethylcellulose und Hydroxypropylmethylcellulose. Fließregulierungsmittel, Schmiermittel, Süßstoffe, Farbstoffe, Antioxidationsmittel und Geschmackszusätze, die oben stehend offenbart sind, können auch enthalten sein.

**[0104]** Die Zusammensetzungen dieser Erfindung können einem Patienten auch topisch verabreicht werden, z. B. durch direktes Auflegen oder Verteilen der Zusammensetzung auf das epiderme oder Epithelgewebe des Patienten oder über die Haut durch ein „Pflaster“. Ein Beispiel eines geeigneten Pflasterapplikators ist in WO 02/47593 beschrieben. Solche Zusammensetzungen umfassen zum Beispiel Lotionen, Cremes, Lösungen, Gele und Feststoffe. Diese örtlichen Verbindungen umfassen vorzugsweise eine sichere und wirksame Menge, in der Regel mindestens ungefähr 0,1 % und vorzugsweise von ungefähr 1 % bis ungefähr 5 % Peptid. Geeignete Träger zur örtlichen Verabreichung bleiben vorzugsweise als durchgehender Film an Ort und Stelle auf der Haut und sind gegen die Entfernung durch Transpiration oder Eintauchen in Wasser beständig. Generell ist der Träger organischer Natur und kann das Peptid darin dispergiert oder gelöst haben. Der Träger kann pharmazeutisch unbedenkliche Weichmacher, Emulgatoren, Verdickungsmittel, Lösungsmittel und dergleichen enthalten.

#### Methoden der Verabreichung

**[0105]** Diese Erfindung befasst sich auch mit der Verwendung eines erfindungsgemäßen Peptids in der Herstellung eines Medikaments für die Vorbeugung oder Behandlung von CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störungen in menschlichen oder anderen tierischen Patienten durch Verabreichen einer sicheren und wirksamen Menge eines Peptids an den Patienten. Solche Störungen sind oben stehend beschrieben.

**[0106]** Zusammensetzungen dieser Erfindung können örtlich oder systemisch verabreicht werden. Systemische Anwendung schließt eine beliebige Methode der Einführung eines Peptids der Formel (I) in die Gewebe des Körpers ein, z. B. intraartikuläre (besonders bei Behandlung von rheumatoider Arthritis), intrathekale, epidurale, intramuskuläre, transdermale, intravenöse, intraperitoneale, subkutane, nasale, pulmonale, sublinguale, rektale und orale Verabreichung.

**[0107]** Die spezifische Dosierung des zu verabreichenden Peptids sowie die Dauer der Behandlung und ob die Behandlung topisch oder systemisch ist, sind voneinander abhängig. Die Dosierung und der Behandlungsplan hängen außerdem von solchen Faktoren wie dem spezifischen verwendeten Peptid, der Behandlungssindikation, der Fähigkeit des Peptids, minimale Hemmkonzentrationen am Ort des der Behandlung bedürftigen Gewebes zu erreichen, den persönlichen Attributen des Patienten (wie Gewicht), Einhaltung des Behandlungsplans und das Vorliegen und der Stärke von Nebenwirkungen der Behandlung ab.

**[0108]** Örtliche Verabreichung kann verwendet werden, um das Peptid systemisch bereitzustellen oder um einen Patienten lokal zu behandeln. Die örtlich zu verabreichende Peptidmenge hängt von solchen Faktoren wie Hautempfindlichkeit, Art und Lage des zu behandelnden Gewebes, der Zusammensetzung und dem Träger (falls vorhanden), die verabreicht werden sollen, dem spezifischen zu verabreichenden Peptid sowie der spezifischen zu behandelnden Störung und dem Ausmaß, zu dem systemische (im Gegensatz zu örtlichen) Wirkungen erwünscht sind, ab.

**[0109]** Die Peptide der vorliegenden Erfindungen können durch die Verwendung von Zielliganden auf spezifische Orte ausgerichtet werden, wo die Behandlung benötigt wird. Um zum Beispiel ein Peptid zu fokussieren, um Muskeldystrophie zu behandeln, wird das Peptid an einen Antikörper oder ein Fragment davon gebunden, der mit einer Skelettmuskelmarkierung immunreaktiv ist, wie allgemein dem Stand der Technik nach bekannt ist. Der auf eine Zielstruktur gerichtete Ligand kann auch ein Ligand sein, der für einen Rezeptor geeignet ist, der auf Skelettmuskeln vorliegt. Jeder auf eine Zielstruktur gerichtete Ligand, der spezifisch mit einer Markierung für das beabsichtigte Zielgewebe reagiert, kann verwendet werden. Methoden für die Kopplung der Erfindungsverbindung an den Zielliganden sind gut bekannt und ähneln den unten beschriebenen für die Kopplung an einen Träger.

**[0110]** Ein Peptid der Erfindung kann über eine gesteuerte Freisetzung verabreicht werden. Das Peptid kann beispielsweise mithilfe intravenöser Infusion, einer implantierbaren osmotischen Pumpe, einem transdermalen Pflaster, Liposomen, subkutaner Depotinjektion, die ein biologisch abbaubares Material enthält, oder andere Modi der Verabreichung verabreicht werden. In einer Ausführungsform kann eine Pumpe verwendet werden,

Langer et al., eds., *Medical Applications of Controlled Release*, CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Sefton, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.*, 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery*, 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.*, 321:574 (1989). In einer anderen Ausführungsform können Polymermaterialien verwendet werden. Langer, 1974, supra; Sefton, 1987, supra; Smolen et al., Hrsg., *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Wiley, N.Y. (1984); Ranger et al., *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.*, 23:61 (1983); siehe auch Levy et al., *Science*, 228:190 (1985); During et al., *Ann. Neurol.*, 25:351 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.*, 71:105 (1989). In noch einer anderen Ausführungsform kann ein gesteuertes Freisetzungssystem in der Nähe des therapeutischen Ziels positioniert werden, wodurch es nur eine Fraktion der systemischen Dosis benötigt. Siehe z. B. Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, Band 2, S. 115–138 (1984). In noch einer anderen Ausführungsform ein Arzneibereitstellungssystem auf Polymerbasis, wobei Medikamente von Polymer- oder Lipidsystemen geliefert werden. Diese Systeme liefern ein Medikament durch drei allgemeine Mechanismen: (1) Diffusion der Arzneispezies von oder durch das System; (2) eine chemische oder enzymatische Reaktion, die zur Degradation des Systems oder Spaltung des Medikaments vom System führt, und (3) Lösungsmittelaktivierung, entweder durch Osmose oder Anschwellen des Systems. Geeignete Systeme sind in den folgenden Überblickartikeln beschrieben: Langer, Robert, „Drug delivery and targeting,” *Nature*: 392 (Supp):5–10 (1996); Kumar, Majeti N. V., „Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices,” *J Pharm Pharmaceut Sci*, 3(2):234–258 (2000); Brannon-Peppas, „Polymers in Controlled Drug Delivery,” *Medical Plastics and Biomaterials*, (Nov. 1997 Siehe auch Langer, 1990, supra; Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein und Fidler (Hrsg.), Liss, New York, S. 353–365 (1989); Langer, *Science*, 249:1527–1533 (1990). Geeignete Systeme können einschließen: Atrigel™ Arzneibereitstellungssystem von Atrix Labs; DepoFoam™ von SkyPharma; Hydrogele auf Polyethylenglycolbasis von Infimed Therapeutics, Inc.; ReGel™, orales SQZGel™, HySolv™ und ReSolv™ lösungsvermittelnde Arzneibereitstellungssysteme von MacroMed; ProGelz™ von ProGelz' Products und einspritzbares ProLease™ von Alkermes.

**[0111]** In allen oben genannten Fällen können die Peptide der Erfindung natürlich alleine oder als Mischungen verabreicht werden und die Zusammensetzungen können ferner zusätzliche Medikamente oder Arzneimittelträger einschließen, wie für die Indikation angemessen.

#### Gentherapie

**[0112]** Expressionsvektoren können verwendet werden, um die Nucleinsäuren der Erfindung in eine Zelle als Teil der Gentherapie einzuleiten. Solche Vektoren haben im Allgemeinen geeignete Restriktionsorte, die sich in der Nähe der Promotorsequenz befinden, um das Einfügen von Nucleinsäuresequenzen zu ermöglichen. Transkriptionskassetten können hergestellt werden, die eine Transkription-Initiierungsregion, das Zielgen oder ein Fragment davon und eine Transkription-Terminierungsregion umfassen. Die Transkriptionskassetten können in eine Vielzahl von Vektoren eingeleitet werden, z. B. Plasmid, Retrovirus, Lentivirus, Adenovirus und dergleichen, wobei die Vektoren in den Zellen vorübergehend oder stabil erhalten werden können, normalerweise für eine Dauer von mindestens einem Tag, üblicher für eine Dauer von mindestens etwa mehreren Tagen bis mehreren Wochen.

**[0113]** Die Proteine und Nucleinsäuren der Erfindung können in Gewebe oder Wirtszellen durch eine beliebige Zahl von Routen eingeleitet werden, einschließlich viraler Infektion, Mikroinjektion oder Fusion von Blasen. Strahlinjektion kann auch für intramuskuläre Verabreichung verwendet werden, wie beschrieben von Furth et al., *Anal. Biochem.*, 205:365–368 (1992). Die DNA kann auf Goldmikropartikel geschichtet und intradermal durch eine Partikelbeschussvorrichtung oder „Gepistole“ geliefert werden, wie in der Literatur beschrieben. Siehe z. B. Tang et al., *Nature* 356:152–154 (1992), wo Goldmikroprojekte mit DNA überzogen und dann in Hautzellen bombardiert werden.

#### Sets

**[0114]** Die Peptide der vorliegenden Erfindung können in einem Set zur Verhinderung oder Behandlung einer CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung aufgenommen sein, umfassend: (a) das Peptid in einer Einheitsdosenform; und (b) Gebrauchsanweisungen. Solch ein Set schließt vorzugsweise eine Reihe von Einheitsdosen ein. Solche Sets können eine Karte mit Dosen enthalten, die in der Reihenfolge ihrer beabsichtigten Verwendung angeordnet sind. Ein Beispiel eines solchen Sets ist eine „Blisterpackung“. Blisterpackungen sind in der Verpackungsindustrie gut bekannt und werden vielfach für die Verpackung von pharmazeutischen Einheitsdosisformen verwendet. Wenn gewünscht, kann eine Gedächtnisstütze bereitgestellt werden, beispielsweise in der Form von Zahlen, Buchstaben oder anderen Markierungen oder mit einer Kalendereinlage, die die Tage im Behandlungsplan zeigt, an denen die Dosen verabreicht werden können. Das Beispiel für ein Set wird in WO

01/45636 beschrieben. Die Behandlungspläne fallen in den Aufgabenbereich der medizinischen Fachleute. Nicht beschränkende Beispiele schließen einmal täglich, wöchentlich, zweiwöchentlich, monatlich oder zweimonatlich ein.

## Beispiele

## Beispiel 1

**[0115]** Savagin und andere nichtselektive CRFR-Agonisten sind im Allgemeinen nicht effektiv bei der Behandlung von CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störungen, da diese Agonisten auch CRF<sub>1</sub>R aktivieren und dadurch zu ungewünschten Nebenwirkungen führen.

**[0116]** Tabelle 2 zeigt komparative CRF-Bindung für native Sequenzfragmente von menschlichem Urocortin I (hUcni), menschlichem Urocortin II (hUroII), menschlichem Urocortin III (hUroIII), menschlichem Corticotropin Releasing Factor (hCRF), Schaf-Corticotropin (oCRF) und Savagin (Svg), jeweils als SEQ-ID Nr.: 1–6 bezeichnet.

Tabelle 2

SEQ-ID NR.	PEPTID	CRF <sub>2</sub> R EC <sub>50</sub> (nM) (Emax %)	CRF <sub>1</sub> R EC <sub>50</sub> (nM) (Emax %)
1	hUcni	3,52 (100)	9,00 (100)
2	hUroH	3,64 (98)	> 100 (9)
3	hUroIII	> 100 (60)	> 1000 (10,25)
4	hCRF	49,25 (100)	19,95 (87)
5	oCRF	> 100 (33)	27,35 (98)
6	Svg	6,03 (95)	17,60 (100)

## Beispiel 2

**[0117]** Tabelle 3 zeigt komparative CRF-Bindung von verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung.

Tabelle 3

7	7,81 (99)	906,00 (60)
8	8,46 (96)	908,00 (88)
9	8,33 (100)	1000,00 (64)
10	10,20 (100)	1000,00 (82)
11	9,16 (85,33)	567 (100)
12	6,75 (94,0)	101,60 (96,00)
13	9,45 (51,50)	295,00 (100)
14	26,20 (95,50)	1000 (40,70)
15	34,65 (70,50)	1000 (5,70)
16	36,75 (96,00)	1000 (19,90)
17	4,8 (89)	219,5 (97)
18	7,6 (100)	315,0 (95)
19	8,1 (100)	219,0 (100)
20	5,9 (100)	94,0 (100)
21	45,3 (100)	1000,0 (7)
22	46,1 (95)	1000 (11)
23	40,4 (97)	1000,0 (15)
24	22,2 (93)	1000,0 (18)
25	29,0 (94)	358,5 (99)
26	16,8 (100)	440,5 (96)
27	8,8 (98)	299,5 (100)
28	7,5 (93)	381,0 (100)
29	38,8 (100)	1000,0 (33)
30	19,6 (98)	1000,0 (32)
31	11,8 (100)	926,0 (80)
32	19,55 (100,00)	1000,00 (48,70)
33	13,10 (100,00)	1000,00 (93,00)
34	13,50 (92,45)	1000,00 (19,20)
35	12,16 (97,30)	1000,00 (69,55)
36	100,00 (63,75)	1000,00 (4,75)
37	100,00 (86,10)	1000,00 (7,00)
38	8,70 (87,55)	1000,00 (45,30)
39	11,65 (100,00)	1000,00 (29,70)
40	19,05 (100,00)	718,00 (68,75)
41	13,75 (100)	1000 (44,20)
42	11,59 (98,10)	1000 (48,00)
43	12,93 (97,37)	1000 (85,70)
44	8,26 (83,65)	780 (82,60)
45	4,75 (89,90)	229,50 (92,25)

## Beispiel 3

## Erhöhte In Vivo-Wirksamkeit

**[0118]** Die Peptide der vorliegenden Erfindung zeigen erweiterte biologische Verfügbarkeit, insbesondere un-

ter Bedingungen niedriger Dosierung, im Vergleich zu bekannten nativen Sequenzen, z. B. UroII-Peptidfragment (SEQ-ID Nr.: 4): Die Halbwertszeit eines Peptids in einem Patienten kann beispielsweise durch hochleistungsfähige Flüssigchromatographie (HPLC) von Serumproben bestimmt werden, die vom Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verabreichung des Peptids abgenommen wurden. Ein Fachmann würde wissen, wie geeignete Elutionspuffer für HPLC auf Grundlage der physicochemischen Eigenschaften eines bestimmten Peptids auszuwählen sind.

**[0119]** Ein nicht beschränkendes Beispiel einer in vivo-Untersuchung zur Bestimmung der Wirksamkeit ist hier beschrieben. Mäuse werden durch intravenöse (IV) (1000 µg/kg) und subkutane (SC) (1000 µg/kg) Routen mit einem Peptid der Formel (I) dosiert. Blutproben werden zu verschiedenen Zeitpunkten (IV = 0, 2, 10, 30 min und 1, 2, 4 und 6 Std. und SC = 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 und 6 Std.) nach Dosierung in Mikrozentrifugenröhrchen abgenommen, die Natriumheparin enthalten. Die Blutproben werden weiter verarbeitet, um Plasma zu erhalten, das bis zur Analyse bei -70°C gelagert wird.

**[0120]** Plasmastandards werden hergestellt. Aufstocklösung eines Peptids der Formel (I), die einen Konzentrationsbereich von 50 ng/ml bis 100 µg/ml abdeckt, wird am Analysetag in Methanol durch serielle Verdünnung einer zuvor hergestellten methanolischen Aufstocklösung von 1 mg/ml Peptid der Formel (I) hergestellt. Auf ähnliche Weise wird die Aufstocklösung des internen Standards (ISTD), stabiles Isotop mit der Markierung h-Unc-II, durch serielle Verdünnung einer gelagerten 1 mg/ml ISTD-Aufstocklösung hergestellt, um eine abschließende Konzentration von 5 µg/ml am Tag der Analyse zu erhalten. Arbeitsplasmastandards, die einen Massebereich von 0,5 bis 100 ng abdecken, werden durch Zugeben von 10 µL der entsprechenden Aufstocklösung des Peptids der Formel (I) in Röhrchen erreicht, die bereits 10 µL einer 5 µg/mL ISTD-Lösung, 100 µL dd-Wasser und 100 µL Rattenplasma-Blindprobe enthalten. Die Arbeitsstandards werden für die Analyse wie unten stehend beschrieben hergestellt.

**[0121]** Qualitätskontrollproben (QC) werden hergestellt. Eine QC-Stammlösung wird mit der 50 ng/ml Konzentration durch Zugeben von 25 µL einer 1 µg/ml Aufstocklösung des Peptids der Formel (I) in eine 475 µL Blindprobe aus heparinisertem Rattenplasma hergestellt, das in einem Plastikfläschchen enthalten ist. QC-Arbeitsproben werden durch Hinzufügen von 100 µL der QC-Stammlösung (50 ng/ml) in Röhrchen hergestellt, die bereits 10 µL einer 5 µg/ml ISTD-Lösung und 100 µL dd-Wasser enthalten. Die QC-Arbeitsprobe wurde für die Analyse wie unten stehend beschrieben hergestellt.

**[0122]** Untersuchungsproben werden hergestellt. Am Tag der Analyse werden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und ein Aliquot der Probe wurde zu einem Röhrchen gegeben, das bereits 10 µL einer 5 µg/ml ISTD-Lösung, 100 µL dd-Wasser und ein Aliquot einer heparinisierten Rattenplasma-Blindprobe enthält. Das Volumen der Probe und der Rattenplasma-Blindprobe sind so, dass das Gesamtvolumen des Plasmas gleich 100 µL ist.

**[0123]** Die Arbeitsstandards, QC-Arbeitsproben und Untersuchungsproben werden für die Analyse durch Hinzufügen von 400 µL Acetonitril zu Röhrchen, die diese jeweils enthalten, Verkappen, Verwirbeln, Zentrifugieren und Isolieren des Überstands hergestellt. Ein Aliquot (300 µL) des Überstands wird unter N<sub>2</sub> getrocknet und in 50 µL Methanol/Wasser (50/50) rekonstituiert.

**[0124]** Die hergestellten Arbeitsstandards, QC-Arbeitsproben und Untersuchungsproben werden durch Separation mit hochleistungsfähiger Gradienten-Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (RP-HPLC) gefolgt von Probeneinleitung durch Elektron-Sprühionisierung (ESI) mit Massenspektroskopie/Massenspektroskopie (MS/MS-) Erkennung unter Verwendung von Selected Reaction Monitoring (SRM) im positiven Innenmodus analysiert. Ein SRM-Kanal wird für h-Unc-II und den ISTD beobachtet.

**[0125]** Die Dosislösungen von der pharmakokinetischen Studie werden mit Methanol verdünnt und durch RP-HPLC mit Ultravioletterkennung analysiert. Die Konzentrationen des Peptids der Formel (I) in den Dosislösungen werden durch Interpolation von einer linearen Regressionskurve errechnet, die nach bekannten Standards erstellt wird.

SEQUENZAUF LISTUNG

<110> Procter & Gamble Company

Isfort, Robert J

Mazur, Wieslaw A

<120> Corticotropin Releasing Factor 2-Rezeptoragonisten

<130> 8847M2/CA

<140> EP 03731965.4

<141> 2003-01-16

<150> US 60/349,117

<151> 2002-01-16

<150> US 60/376,337

<151> 2002-04-29

<150> US 60/388,895

<151> 2002-06-14

<150> US 60/411,988

<151> 2002-09-19



<160> 45

<170> Patentversion 3.1

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Asn Pro Ser Leu Ser Ile Asp Leu Thr Phe His Leu Leu Arg Thr

1                    5                    10                    15

Leu Leu Glu Leu Ala Arg Thr Gln Ser Gln Arg Glu Arg Ala Glu Gln

                  20                    25                    30

Asn Arg Ile Ile Phe Asp Ser Val

                  35                    40

<210> 2

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu Leu

1 5 10 15

Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn Ala

20 25 30

Arg Ile Leu Ala Arg Val

35

<210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Thr Lys Phe Thr Leu Ser Leu Asp Val Pro Thr Asn Ile Met Asn Leu

1 5 10 15

Leu Phe Asn Ile Ala Lys Ala Lys Asn Leu Arg Ala Gln Ala Ala Ala

20 25 30

Asn Ala His Leu Met Ala Gln Ile

35

40

<210> 4

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Glu Glu Pro Pro Ile Ser Leu Asp Leu Thr Phe His Leu Leu Arg

1

5

10

15

Glu Val Leu Glu Met Ala Arg Ala Glu Gln Leu Ala Gln Gln Ala His

20

25

30

Ser Asn Arg Lys Leu Met Glu Ile Ile

35

40

<210> 5

<211> 41

<212> PRT

<213> Ovis sp.

<400> 5

Ser Gln Glu Pro Pro Ile Ser Leu Asp Leu Thr Phe His Leu Leu Arg

1 5 10 15

Glu Val Leu Glu Met Thr Lys Ala Asp Gln Leu Ala Gln Gln Ala His

20 25 30

Ser Asn Arg Lys Leu Leu Asp Ile Ala

35 40

<210> 6

<211> 40

<212> PRT

<213> *Phyllomedusa sauvagei*

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 6

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Ser Leu Glu Leu Leu Arg Lys

1 5 10 15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20 25 30

Asn Arg Leu Leu Leu Asp Thr Ile

35 40

<210> 7

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<400> 7

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Gln Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

                  20                    25                    30

Asn Ala Arg Leu Leu Asp Thr Val

                  35                    40

<210> 8

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<400> 8

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Gln Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

                  20                    25                    30

Asn Ala Arg Leu Leu Ala Thr Val

                  35                    40

<210> 9

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<400> 9

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Gln Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

20                    25                    30



Asn Ala Arg Leu Leu Asp Arg Val

35

40

<210> 10

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<400> 10

DE 603 13 845 T2 2008.01.31

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Gln Leu Leu Arg Lys

1 5 10 15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

20 25 30

Asn Ala Arg Leu Leu Ala Arg Val

35 40

<210> 11

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 11

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Leu Gln Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

                  20                    25                    30

Asn Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val

                  35                    40

<210> 12

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 12

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Tyr Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

                  20                    25                    30

Asn Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val

                  35                    40

<210> 13

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 13

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Gln Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

20                    25                    30

Asn Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val

35                    40

<210> 14

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 14

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Ile Tyr Leu Leu Arg Lys

1

5

10

15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

20

25

30

Asn Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val

35

40

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstlich

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Künstlich

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (40) . . (40)

&lt;223&gt; AMIDIERUNG

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (1) . . (1)

&lt;223&gt; PYRROLIDONCARBONSÄURE

&lt;400&gt; 15

DE 603 13 845 T2 2008.01.31

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Ile Gln Leu Leu Arg Lys

1 5 10 15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

20 25 30

Asn Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val

35 40

<210> 16

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>



<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 16

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Thr Tyr Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

                  20                    25                    30

Asn Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val

                  35                    40

<210> 17

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 17

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Tyr Tyr Leu Leu Arg Lys

1 5 10 15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20 25 30

Asn Ala Leu Leu Leu Ala Thr Ile

35 40

<210> 18

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400>18

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Tyr Tyr Leu Leu Arg Lys

1 5 10 15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20 25 30

Asn Ala Leu Lue Leu Asp Thr Ile

35 40

<210> 19

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 19

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Tyr Leu Leu Arg Lys

1

5

10

15

DE 603 13 845 T2 2008.01.31

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20

25

30

Asn Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ile

35

40

<210> 20

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 20

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Tyr Leu Leu Arg Lys

1 5 10 15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20 25 30

Asn Ala Leu Leu Leu Ala Thr Ile

35 40

<210> 21

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 21

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Thr Tyr Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

                  20                    25                    30

Asn Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ile

                  35                    40

<210> 22

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 22

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Thr Tyr Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

                  20                    25                    30

Asn Ala Leu Leu Leu Ala Thr Ile

                  35                    40

<210> 23

<211> 40

<212> PRT



<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 23

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Ile Tyr Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

                  20                    25                    30

Asn Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ile

35

40

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstlich

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Künstlich

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (1) . . (1)

&lt;223&gt; PYRROLIDONCARBONSÄURE

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (40) . . (40)

&lt;223&gt; AMIDIERUNG

&lt;400&gt; 24

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Ile Tyr Leu Leu Arg Lys

1

5

10

15

DE 603 13 845 T2 2008.01.31

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20

25

30

Asn Ala Leu Leu Leu Ala Thr Ile

35

40

<210> 25

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 25

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Arg Lys

1 5 10 15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

20 25 30

Asn Ala Arg Leu Leu Asp Thr Val

35 40

<210> 26

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 26

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

                  20                    25                    30

Asn Ala Arg Leu Leu Asp Arg Val

                  35                    40

<210> 27

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 27

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20                    25                    30

Asn Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ile

35                    40

<210> 28

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 28

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20                    25                    30

Asn Ala Leu Leu Leu Ala Thr Ile

35

40

<210> 29

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 29

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Leu Gln Leu Leu Arg Lys



1 5 10 15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr  
20 25 30

Asn Ala Arg Leu Leu Asp Thr Val  
35 40

<210> 30

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 30

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Leu Gln Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

                  20                    25                    30

Asn Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ile

                  35                    40

<210> 31

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 31

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Gln Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Asn

                  20                    25                    30

Asn Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ile

                  35                    40

<210> 32

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 32

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Gln Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Val Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

                  20                    25                    30

Asn Ala Arg Leu Leu Asp Arg Thr Ile

                  35                    40

<210> 33

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 33

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Gln Leu Leu Arg Lys

1 5 10 15

Val Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20 25 30

Asn Ala Arg Leu Leu Ala Arg Ile

35

40

<210> 34

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 34

DE 603 13 845 T2 2008.01.31

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Tyr Gln Leu Leu Arg Lys

1 5 10 15

Val Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20 25 30

Asn Ala Arg Leu Leu Ala Arg Ile

35 40

<210> 35

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 35

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Tyr Trp Leu Leu Arg Lys

1 5 10 15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20 25 30

Asn Ala Arg Leu Leu Ala Arg Ile

35 40

<210> 36

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES



<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 36

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Thr Trp Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Val Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

                  20                    25                    30

Asn Ala Arg Leu Leu Ala Arg Ile

                  35                    40

<210> 37

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 37

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Thr Trp Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20                    25                    30

Asn Ala Arg Leu Leu Ala Arg Ile

35                    40

<210> 38

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 38

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Tyr Trp Leu Leu Arg Lys

1

5

10

15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20

25

30

Asn Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ile

35

40

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstlich

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Künstlich

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (1) . . (1)

&lt;223&gt; PYRROLIDONCARBONSÄURE

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (40) . . (40)

&lt;223&gt; AMIDIERUNG

&lt;400&gt; 39

DE 603 13 845 T2 2008.01.31

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Tyr Trp Leu Leu Arg Lys

1 5 10 15

Val Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

. 20 25 30

Asn Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ile

35 40

<210> 40

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 40

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Leu Gln Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Val Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

                  20                    25                    30

Asn Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val

                  35                    40

<210> 41

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 41

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Leu Gln Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Val Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

                  20                    25                    30

Asn Ala Leu Leu Leu Ala Thr Ile

                  35                    40

<210> 42

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 42

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Gln Leu Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

Val Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20                    25                    30

Asn Ala Leu Leu Leu Asp Thr Ile

35                    40



<210> 43

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 43

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Gln Leu Leu Arg Lys

1

5

10

15

DE 603 13 845 T2 2008.01.31

Val Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

20

25

30

Asn Ala Arg Leu Leu Asp Arg Val

35

40

<210> 44

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) . . (40)

<223> AMIDIERUNG

<400> 44

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Phe Gln Leu Leu Arg Lys

1 5 10 15

Val Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Ala Asn

20 25 30

Asn Ala Leu Leu Leu Ala Thr Ile

35 40

<210> 45

<211> 40

<212> PRT

<213> Künstlich

<220>

<223> Künstlich

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) . . (1)

<223> PYRROLIDONCARBONSÄURE

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (40) . . (40)

&lt;223&gt; AMIDIERUNG

&lt;400&gt; 45

Glx Gly Pro Pro Ile Ser Ile Asp Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Arg Lys

1 5 10 15

Met Ile Glu Ile Glu Lys Gln Glu Lys Glu Lys Gln Gln Ala Thr Thr

20 25 30

Asn Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val

35 40

**Patentansprüche**

1. Nichtnativatives Peptid, umfassend die Sequenz

-ZGPPISIDL<sub>12</sub>PX<sub>13</sub>LLR<sub>18</sub>KX<sub>18</sub>IEIEKQEKEKQQAX<sub>32</sub>X<sub>33</sub>NAX<sub>36</sub>X<sub>37</sub>LX<sub>39</sub>X<sub>40</sub>X<sub>41</sub>

worin:

- a) X<sub>12</sub> aus F, Y, L, I und T ausgewählt ist;
- b) X<sub>13</sub> aus Q, W und Y ausgewählt ist;
- c) X<sub>18</sub> aus V und M ausgewählt ist;
- d) X<sub>32</sub> aus T und A ausgewählt ist;
- e) X<sub>33</sub> aus N und T ausgewählt ist;
- f) X<sub>36</sub> aus R und L ausgewählt ist;
- g) X<sub>37</sub> aus L und I ausgewählt ist;
- h) X<sub>39</sub> aus D und A ausgewählt ist;
- i) X<sub>40</sub> aus T und R ausgewählt ist; und
- j) X<sub>41</sub> aus I und V ausgewählt ist;

oder Variationen davon, die zu mindestens 95% mit der Sequenz identisch sind, wobei die Variationen CRF<sub>2</sub>R-Agonisten sind.

- 2. Peptid nach Anspruch 1, wobei X<sub>12</sub> aus F, L, T und Y ausgewählt ist.
- 3. Peptid nach Anspruch 1, wobei die Sequenz X<sub>12</sub>X<sub>13</sub> aus FQ, YQ, YW, LQ, LY, IY und TY ausgewählt ist.
- 4. Peptid nach Anspruch 1, wobei die Sequenz X<sub>32</sub>X<sub>33</sub> aus AN und TT ausgewählt ist.
- 5. Peptid nach Anspruch 1, wobei die Sequenz X<sub>36</sub>X<sub>37</sub> aus RL, LL und RI ausgewählt ist.

6. Peptid nach Anspruch 3, wobei die Sequenz  $X_{32}X_{33}$  aus AN und TT ausgewählt ist.
7. Peptid nach Anspruch 3 oder Anspruch 4, wobei die Sequenz  $X_{36}X_{37}$  aus RL, LL und RI ausgewählt ist.
8. Peptid nach einem der Ansprüche 1, 3, 4, 5, 6 oder 7, wobei die Sequenz  $X_{39}X_{40}X_{41}$  aus DTI, ARI, ATI, DRV und ARV ausgewählt ist.
9. Peptid nach Anspruch 1, das aus SEQ-ID NR. 9, 11, 13, 14, 16, 32, 33, 34, 39, 41, 42, 43, 44 und 45 ausgewählt ist.
10. Peptid nach einem der vorstehenden Ansprüche zur Vorbeugung oder Behandlung einer CRF<sub>2</sub>R-modulierten Störung.
11. Peptid nach Anspruch 10, wobei die Störung Skelettmuskelatrophie ist.
12. Isolierte Nukleinsäure, die ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 9 kodiert.
13. Isolierter Antikörper, der für ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 9 spezifisch ist.
14. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend:
  - a) eine sichere und wirksame Menge eines Peptids nach einem der Ansprüche 1 bis 9; und
  - b) einen pharmazeutisch unbedenklichen Träger.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen