



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 36 638 T2** 2007.10.04

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 011 704 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 36 638.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/10891**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 923 839.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/053842**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **03.12.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **13.12.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 7/50** (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

866545 30.05.1997 US

(73) Patentinhaber:

**Trustees of the University of Pennsylvania,
Philadelphia, Pa., US**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**GREENE, I., Mark, Penn Valley, PA 19072, US;
MURALI, Ramachandran, Drexel Hill, PA 19026,
US; TAKASAKI, Wataru, Koshigaya-shi, Saitama
343-0032, JP**

(54) Bezeichnung: **PEPTIDANALOGA ABGELEITET VOM TUMORNEKROSE-FAKTOR-REZEPTOR**

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**1. EINFÜHRUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide und Peptidanaloga, die nach einer Bindungsschleife eines Mitglieds der Tumornekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-R) Superfamilie gestaltet sind, welche an den Bindungswechselwirkungen mit seinen Liganden beteiligt ist. Insbesondere betrifft sie cyclische Peptide und Peptidanaloga, die nach drei spezifischen Bindungsschleifen in den Domänen 2 und 3 von TNF-R gestaltet sind, welche die Bindung des Tumornekrose-Faktors (TNF) an seine zellulären Rezeptoren hemmen, und Verfahren zum Verwenden derartiger Verbindungen, um die biologischen Aktivitäten von TNF zu hemmen, wobei dadurch seine unerwünschten klinischen Wirkungen antagonisiert werden.

2. HINTERGRUND DER ERFINDUNG**2.1. TUMORNEKROSE-FAKTOR UND SEINE PATHOPHYSIOLOGIE**

[0002] TNF wurde ursprünglich als ein Molekül entdeckt, welches hämorrhagische Nekrose von Tumoren in Maus verursacht (Carswell et al., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3666). Eine zweite Untersuchungsrichtung über ein als "Cachectin" bekanntes Serumprotein, von dem geglaubt wurde, dass es für den Zustand der Kachexie verantwortlich sei, führte zu der letztendlichen Entdeckung, dass Cachectin identisch mit TNF war (Beutler et al., 1989, Annu. Rev. Immunol. 7: 625). TNF ist nun als ein allgemeiner aktiver Entzündungsvermittler etabliert worden, beteiligt an verschiedenen klinischen Zuständen.

[0003] TNF/Cachectin wurde in TNF- α umbenannt, und ein strukturell und funktionell verwandtes Protein, vorher als Lymphotoxin (LT) bekannt, wurde als TNF- β bezeichnet (Vassalli, 1992, Annu. Rev. Immunol. 10: 411). Beide Moleküle sind als Homotrimer aktiv und vermitteln ähnliche biologische Wirkungen durch Bindung an die gleichen zwei zellulären Rezeptoren mit einem Molekulargewicht von 55 kD (p55 oder Komplex I) und 75 kD (p75) (Smith et al., 1990, Science 248: 1019; Schall et al., 1990, Cell 61: 361). Ein LT-Heterotrimer wurde später entdeckt, welches einen als TNF-R verwandtes Protein (rp) bekannten dritten Rezeptor besetzte, das aber nicht in der Lage ist, an TNF-R p55 und p75 zu binden (Browning et al., 1993, Cell 72: 847). Dieses LT ist LT- β genannt worden, und das LT-Homotrimer (oder TNF- β) wird ebenfalls als LT- α bezeichnet. Ein struktureller Vergleich der drei TNF-R mit einigen anderen Zelloberflächenrezeptoren hat zu der Klassifikation dieser Rezeptoren in die TNF-R Superfamilie geführt (Gruss und Dower, 1995, Cytokines and Mol. Ther. 1: 75).

[0004] Bei TNF- α handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kD, das von einigen Zellarten, besonders von aktivierten Makrophagen, erzeugt wird. Da TNF-R von zahlreichen Zellpopulationen exprimiert wird, induziert TNF eine breite Vielfalt zellulärer Reaktionen, von denen viele zu schädlichen Folgen führen. Zum Beispiel induziert TNF Kachexie, was ein Zustand ist, der sich aus Fettverlust und der Depletion des gesamten Körperproteins ergibt, begleitet von nicht ausreichender Nahrungsaufnahme aufgrund von Anorexie. Kachexie wird gewöhnlicherweise bei Krebspatienten gesehen, und es ist auch bei Patienten mit erworbenem Immundefizienzsyndrom (AIDS) beobachtet worden.

[0005] Zusätzlich erzeugt Injektion von hohen Dosen TNF in Tiere die meisten der Symptome von septischem Schock. Von TNF ist ebenfalls gezeigt worden, dass es eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen, wie multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis, Hypersensitivität, Immunkomplex Erkrankungen und Graft-versus-Host Erkrankung, sowie Transplantat-Abstossung, spielt. Die Beteiligung von TNF ist sogar mit Malaria und Lungenfibrose in Verbindung gebracht worden.

2.2. BEHANDLUNG VON MIT TNF-ASSOZIIERTEN STÖRUNGEN

[0006] Verfahren zum Neutralisieren der ungünstigen Wirkungen von TNF haben sich auf die Verwendung von anti-TNF Antikörpern und löslichem TNF-R konzentriert. In Tiermodellen hat eine Behandlung von mit TNF-assoziierten entzündlichen Störungen mit TNF-spezifischen Antikörpern therapeutische Wirksamkeit gezeigt (Williams et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 9784; Baker et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24: 2040; Suitters et al., 1994, J. Exp. Med. 179: 849). Chimäre Formen von anti-TNF Antikörpern sind zur Verwendung bei menschlichen klinischen Versuchen konstruiert worden (Lorenz et al., 1996, J. Immunol. 156: 1646; Walker et al., 1996, J. Infect. Dis. 174: 63; Tak et al., 1996, Arthritis Rheumat. 39: 1077). Zusätzlich sind lösliche TNF-R-Fusionsproteine als TNF-Antagonisten bei menschlichen Patienten eingeführt worden (Peppel et al., 1991, J. Exp. Med. 174: 1483; Williams et al., 1995, Immunol. 84: 4.33; Baumgartner et al., 1996, Arthritis Rheumat. 39 (Erg.) S74).

[0007] Während die zuvor erwähnten Ansätze einige Wirksamkeit bei bestimmten Erkrankungszuständen gezeigt haben, leiden sowohl anti-TNF Antikörper als auch lösliches TNF-R an gewöhnlichen Beschränkungen für Makromoleküle, wie schwache Bioverfügbarkeit und Stabilität, Induktion von Immunreaktionen und erfolglose Gewebedurchdringung. Somit bleibt ein Bedarf für verbesserte therapeutische Verbindungen zum Antagonisieren von unerwünschten Wirkungen von TNF.

[0008] WO/21193 offenbart cyclische Verbindungen, abgeleitet von primären Aminosäuresequenzen, innerhalb spezifischer β -Turn Regionen des Nervenwachstumsfaktors (NGF).

[0009] Zhang et al (1997) Nature Biotechnol. 15, 150–154, offenbart die Gestaltung und Synthese modifizierter exocyclischer Peptide, welche eine bestimmte Region von CD4 nachahmen und welche die Wechselwirkung zwischen CD4 und dem Hüllglycoprotein gp120 von HIV unterbrechen.

[0010] Banner et al. (1993) Cell 73, 431–445, und Naismith et al. (1988) Trends Biochem. Sci. 23, 74–79, offenbaren die Kristallstruktur von TNF-R und die Analyse davon. Es wurde gezeigt, dass die Ligandenbindungsdomänen aus kleinen Cysteinreichen Subdomänen bestehen.

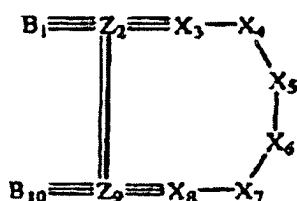
[0011] Hwang et al. (1991) Proc. R Soc.Lond. B 245, 115–119, und Lie et al. (1992), Biochem. Biophys. Res. Comm. 188, 503–509, offenbaren von TNF-R abgeleitete Peptide, welche die Wechselwirkung von TNF mit seinem Rezeptor modifizieren.

3. ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide und Peptidanaloga, die nach einer Bindungsschleife eines Mitglieds der TNF-R Superfamilie gestaltet sind. Insbesondere betrifft sie Peptide und Peptidanaloga, die nach drei Bindungsschleifen von TNF-R gestaltet sind. Spezifischer betrifft die Erfindung Peptide und Peptidanaloga, welche die Bindungwechselwirkungen zwischen TNF und TNF-R beeinträchtigen, und Verfahren zum Verwenden derartiger Verbindungen und pharmazeutischer Zusammensetzungen davon, um die unerwünschten biologischen Aktivitäten von TNF in vivo zu antagonisieren, sowie Verfahren zum Verwenden der Verbindungen, um die Anwesenheit von TNF in einer Probe nachzuweisen und zum Hemmen der TNF Aktivitäten in vitro.

[0013] Die Erfindung beruht zum Teil auf der Entdeckung des Anmelders, dass Peptide, die nach drei Bindungsschleifen von TNF-R p55 gestaltet wurden, das Binden von TNF- α an TNF-R hemmten. Derartige Peptide wurden auf Grundlage der Aminosäuresequenzen hergestellt, welche die spezifischen Bindungsschleifen bilden. Cys-Reste wurden zu den Peptiden gegeben, um ihre Cyclisierung durch Bildung von Disulfidbrücken zu ermöglichen, und hydrophobe aromatische Reste wurden ihren Enden zugegeben, um die strukturelle Stabilität zu verbessern. Unter den Peptiden, die auf kompetitive Weise die Bindung von TNF- α an seinen zugehörigen Rezeptor hemmten, waren Peptide, welche nach Schleife 1 der Domäne 3 von TNF-R gestaltet waren, die wirksamsten.

[0014] In einer Ausführungsform stellt die Erfindung eine Verbindung bereit, welche die Formel



aufweist, worin:

B_1 und B_{10} jeweils unabhängig voneinander ein Peptid von 1–3 Aminosäuren, wovon mindestens eine eine aromatische Aminosäure ist, sind;

Z_2 und Z_9 jeweils unabhängig voneinander eine Cys-ähnliche Aminosäure sind;

X_3 fehlt oder ist eine saure Aminosäure;

X_4 ist eine aromatische oder apolare Aminosäure;

X_5 ist eine polare Aminosäure;

X_6 ist eine polare Aminosäure;

X_7 ist eine aromatische oder polare Aminosäure;

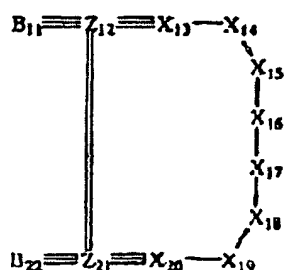
X_8 ist eine aromatische, apolare oder polare Aminosäure ausgewählt;

"-" ist eine Amidbrücke;

"=" ist eine Disulfidbrücke; und

"≡" ist eine Amidbrücke.

[0015] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine Verbindung bereit, welche die Formel:



aufweist, worin:

B₁₁ und B₂₂ jeweils unabhängig voneinander ein Peptid von 1–3 Aminosäuren, wovon mindestens eine eine aromatische Aminosäure ist, sind;

Z₁₂ und Z₂₁ jeweils unabhängig voneinander eine Cys-ähnliche Aminosäure sind;

X₁₃ fehlt oder ist eine aromatische Aminosäure;

X₁₄ fehlt oder ist eine polare Aminosäure;

X₁₅ ist eine basische, polare oder apolare Aminosäure;

X₁₆ ist eine polare Aminosäure;

X₁₇ fehlt oder ist eine apolare Aminosäure;

X₁₈ ist eine saure Aminosäure;

X₁₉ ist eine polare Aminosäure;

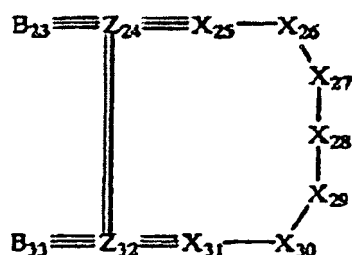
X₂₀ ist eine basische Aminosäure;

"-" ist eine Amidbrücke;

"=" ist eine Disulfidbrücke; und

"≡" ist eine Amidbrücke.

[0016] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine Verbindung bereit, welche die Formel:



aufweist, worin

B₂₃ und B₃₃ jeweils unabhängig voneinander ein Peptid von 1–3 Aminosäuren, wovon mindestens eine eine aromatische Aminosäure ist, sind;

Z₂₄ und Z₃₂ jeweils unabhängig voneinander eine Cys-ähnliche Aminosäure sind;

X₂₅ fehlt oder ist eine basische Aminosäure;

X₂₆ ist eine basische Aminosäure;

X₂₇ ist eine saure Aminosäure;

X₂₈ ist eine apolare Aminosäure;

X₂₉ ist eine apolare Aminosäure;

X₃₀ fehlt oder ist eine polare Aminosäure;

X₃₁ fehlt oder ist eine apolare Aminosäure;

"-" ist eine Amidbrücke;

"=" ist eine Disulfidbrücke; und

"≡" ist eine Amidbrücke.

[0017] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform hemmen die Peptide und Peptidanaloga spezifisch die Bindung von TNF an seine zellulären Rezeptoren. Daher sind derartige Verbindungen beim Antagonisieren der unerwünschten biologischen Aktivitäten von TNF nützlich. In diesem Zusammenhang werden eine große Vielfalt spezifischer Verwendungen hierin offenbart, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Behandlung von mit TNF-assoziierten pathologischen Zuständen, wie akute und chronische entzündliche Reaktionen, septischen Schock, Kachexie, Autoimmunität, Graft-versus-Host Erkrankung, Immunkomplex Erkrankung, Trans-

plantatabstossung und Malaria.

4. KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0018] Abb. 1 vergleichende Sequenz-Anordnung von Aminosäuren in bestimmten extrazellulären Cys-reichen Domänen von Mitgliedern der TNF-R Superfamilie: TNF-R p55 (SEQ ID NO: 1), TNF-R p75 (SEQ ID NO: 2), TNF-R-rp (SEQ ID NO: 3), NGF-R p75 (SEQ ID NO: 4), CD27 (SEQ ID NO: 5), CD30 (proximal) (SEQ ID NO: 6), CD30 (distal) (SEQ ID NO: 7), CD40 (SEQ ID NO: 8), Fas Antigen (SEQ ID NO: 9), OX40 (SEQ ID NO: 10) und 4-IBB (SEQ ID NO: 11).

[0019] Abb. 2 Hemmung der Wechselwirkung von radiomarkiertem TNF- α mit TNF-R. In einem kompetitiven Radiorezeptor-Assay wurde ^{125}I -markiertes TNF mit einem Peptid vorinkubiert, gefolgt von Binden an immobilisiertes TNF-R. Die Peptide wurden bei 25 μM in ihrer Fähigkeit verglichen, die Bindung von TNF- α (10 nM) an 1 nM des chimären TNF-R-IgG Proteins zu hemmen.

[0020] Abb. 3 Hemmung der Wechselwirkung von radiomarkiertem TNF- α mit TNF-R in einem Dosis-Wirkungs-Assay. In einem kompetitiven Radiorezeptor-Assay wurde TNF- α Bindung an immobilisiertes chimäres TNF-R Protein in Anwesenheit einiger Peptide der WP9 Serie in einem definierten Dosierungsbereich gehemmt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dar.

[0021] Abb. 4 Größenausschluß-HPLC-Profile exocyclischer Peptide. Jedes Peptid (4 mg) wurde von einer Protein-Pak 60 Säule mit 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 7,0 bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min eluiert und ihr UV wurde bei 214 nm überwacht.

[0022] Abb. 5 FAC-Analyse der TNF- α Bindung an zelluläre Rezeptoren in Anwesenheit des Peptids WP9QY. 1 = U937 Zellen, gefärbt mit Fluoresceinkonjugiertem sekundären Antikörper. 2 = U937 Zellen, gefärbt mit anti-TNF Rezeptor Antikörper (htr-9) und sekundärem Antikörper. 3 = U937 Zellen, gefärbt mit anti-TNF-R Antikörper in Anwesenheit von TNF- α und sekundärem Antikörper. 4 = U937 Zellen, gefärbt mit einem anti-TNF Rezeptor Antikörper (htr-9) und TNF- α , das mit 250 μM des Peptids WP9QY vorinkubiert war.

[0023] Abb. 6 FAC-Analyse der TNF- α Bindung an zelluläre Rezeptoren in Anwesenheit von einem von drei von TNF-R abgeleiteten Peptiden. TNF- α Bindung an U937 Zellen wurden durch jedes Peptid auf eine Dosis abhängige Weise gehemmt. -- = WP9QY Peptid; ---□--- = WP9Q Peptid; ---▲--- = WP5JY Peptid. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

[0024] Abb. 7 Hemmung von TNF- α induzierter Cytolyse von L929 Zellen durch von TNF-R abgeleitete Peptide. Absorption mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nur ACT-D und mit ACT-D plus 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TNF- α werden als 100 % Überleben bzw. als 100 Cytotoxizität bezeichnet. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten an.

[0025] Abb. 8A & B Hemmung der TNF- α induzierten Insulinresistenz durch das Peptid WP9QY. Differenzierte 3T3-L1 Zellen wurden mit Insulin stimuliert und an Tyr phosphoryliertes IRS-1 wurde analysiert. Bestimmte Proben wurden ebenfalls mit TNF- α behandelt, was die Tyr-Phosphorylierung von IRS-1 hemmte. Vorinkubation von TNF- α mit dem Peptid WP9QY stellte die Tyr-Phosphorylierung von IRS-1 als Reaktion auf Insulin wieder her. **Abb. 8A** zeigt die Ergebnisse eines Westemblots mit einem anti-phosphorylierten Tyr Antikörper nach Immunpräzipitation mit einem anti-IRS-1 Antiserum. **Abb. 8B** zeigt die Ergebnisse eines Westernblots nach Immunpräzipitation mit dem gleichen anti-IRS-1 Antiserum.

[0026] Abb. 9 Ansicht der dreidimensionalen Struktur der Bindungsstellen in TNF-R für TNF- α . Monomeres TNF- α wird rechts und monomeres TNF-R wird links gezeigt mit der Bindungsstelle in Schleife 1 der Domäne 3, in dunkler Farbe gezeigt.

5. DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0027] Die vorliegende Erfindung betrifft cyclische Peptide und Peptidanaloga, welche die Bindungswechselwirkungen zwischen einem Mitglied der TNF-R Superfamilie und seinem Liganden hemmen. Obwohl die spezifischen hierin beschriebenen Verfahren und Techniken unter Verwendung einiger spezifischer von TNF-R p55 abgeleiteter Peptide beispielhaft erläutert werden, sind sie für die Durchführung der Erfindung lediglich veranschaulichend. Analoge Verfahren und Techniken, sowie funktionell gleichwertige Peptide und Peptidana-

loga, werden ebenfalls ins Auge gefasst, wie es Fachleuten, beruhend auf der hierin bereitgestellten detaillierten Offenbarung offensichtlich sein wird.

[0028] Wie hierin verwendet, sollen die folgenden Begriffe die folgenden Bedeutungen aufweisen:

"Alkyl": bezeichnet einen gesättigten verzweigten, geradkettigen oder cyclischen Kohlenwasserstoffrest. Typische Alkylreste schließen Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, t-Butyl, Pentyl, Isopentyl, Hexyl und ähnliche ein, sind aber nicht darauf beschränkt. In bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei den Alkylresten um (C₁-C₆)-Alkyl, wobei (C₁-C₃) besonders bevorzugt ist.

"Substituiertes Alkyl": bezeichnet einen Alkylrest, worin ein oder mehrere Wasserstoffatome jeweils unabhängig voneinander mit anderen Substituenten ersetzt sind.

"Alkenyl": bezeichnet einen ungesättigten verzweigten, geradkettigen oder cyclischen Kohlenwasserstoffrest mit mindestens einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung. Der Rest kann entweder in cis oder trans Konformation um die Doppelbindungen vorliegen. Typische Alkenylreste schließen Ethenyl, Propenyl, Isopropenyl, Butenyl, Isobutenyl, tert-Butenyl, Pentenyl, Hexenyl und ähnliche ein, sind aber nicht darauf beschränkt. In bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei dem Alkenylrest um (C₁-C₆)-Alkenyl, wobei (C₁-C₃) besonders bevorzugt ist.

„Substituiertes Alkenyl“: bezeichnet einen Alkenylrest, worin ein oder mehrere Wasserstoffe jeweils mit anderen Substituenten ersetzt sind.

"Alkynyl": bezeichnet einen ungesättigten verzweigten, geradkettigen oder cyclischen Kohlenwasserstoffrest mit mindestens einer Kohlenstoff-Kohlenstoff Dreifachbindung. Typischen Alkynylreste schließen Ethinyl, Propinyl, Butinyl, Isobutinyl, Pentinyl, Hexinyl und ähnliche ein, sind aber nicht darauf beschränkt. In bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei dem Alkynylrest um (C₁-C₆)-Alkynyl, wobei (C₁-C₃) besonders bevorzugt ist.

"Substituiertes Alkynyl": bezeichnet einen Alkynylrest, worin ein oder mehrere Wasserstoffatome jeweils unabhängig voneinander mit anderen Substituenten ersetzt sind.

"Alkoxy": bezeichnet einen Rest -OR, worin es sich bei R um wie vorstehend definiertes Alkyl, Alkenyl oder Alkynyl handelt.

"Aromatische Einheit": bezeichnet eine Einheit mit einem ungesättigtem cyclischen Kohlenwasserstoffrest, welcher ein konjugiertes (4n+2) π-Elektronensystem hat. Typische aromatische Einheiten schließen Benzol, Naphthalin, Anthracen, Azulene, Indacen und ähnliche ein, sind aber nicht darauf beschränkt. In bevorzugten Ausführungsformen enthält die aromatische Einheit 5–20 Kohlenstoffe im Ringsystem, wobei 5–10 Kohlenstoffatome besonders bevorzugt sind.

"Substituierte aromatische Einheit" bezeichnet eine aromatische Einheit, worin eines oder mehrere der Wasserstoffatome jeweils unabhängig voneinander mit anderen Substituenten ersetzt sind.

"Heteroaromatische Einheit": bezeichnet eine aromatische Einheit, worin ein oder mehrere Ringkohlenstoffatome mit einem anderen Atom, wie N, O oder S ersetzt sind. Typische heteroaromatische Einheiten schließen Pyran, Pyrazol, Pyridin, Pyrrol, Pyrazin, Pyridazin, Pyrimidin, Pyrrolizin, Chinazolin, Chinolin, Chinolizin, Chinoxalin, Selenophen, Thiophen, Tellurophen, Xanthen und ähnliche ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

"Substituierte heteroaromatische Einheit" bezeichnet eine heteroaromatische Einheit, worin ein oder mehrere Wasserstoffatome jeweils unabhängig voneinander mit anderen Substituenten ersetzt sind.

5.1. DIE TNF-R SUPERFAMILIE

[0029] TNF übt seine biologischen Aktivitäten durch Binden an zwei TNF-R: p55 und p75 aus. Ein Vergleich dieser Rezeptoren mit einigen anderen Rezeptoren der Zelloberfläche deckte gemeinsame strukturelle Merkmale auf, die zu ihrer Klassifikation als eine Superfamilie führten (Beutler et al., 1994, Science 264: 667). Die Mitglieder der TNF-R Superfamilie besitzen kennzeichnende extrazelluläre Cys-reiche Domänen, teilen sich aber nur etwa 25 % Sequenzhomologie. Es gibt mindestens zehn Mitglieder in dieser Superfamilie, einschließlich: TNF-R p55 und p75, TNF-R verwandtes Protein (rp), CD40, Fas Antigen (CD95), Nervenwachstumsfaktor Rezeptor mit niedriger Affinität (p75), CD27, CD30, 41 BB und OX40 (Beutler et al., 1994, Ann. NY Acad. Sci., S. 118–133; Gruss und Dower, 1995, Cytokines and Mol. Ther. 1: 75–105).

[0030] Für Schleifen und Turns ist an vielen Proteinen gezeigt worden, dass sie wichtige funktionelle Rollen bei Protein-Protein Wechselwirkungen spielen. In einer spezifischen Ausführungsform, als Beispiele in Abschnitt 6 nachstehend veranschaulicht, wurden cyclische Peptide nach drei Bindungsschleifen von TNF-R p55 gestaltet, welche die Bindung von TNF an seine zellulären Rezeptoren hemmen. Insbesondere zeigten Peptide, die nach Schleife 1 der Domäne 3 gestaltet waren, die stärksten hemmenden Aktivitäten. Wenn ein nach dieser Bindungsschleife gestaltetes Peptid in Kombination mit Peptiden, die nach zwei anderen Schleifen gestaltet waren, verwendet wurde, wurde kein weiterer Anstieg der hemmenden Wirkungen beobachtet, was anzeigt, dass es sich bei Schleife 1 der Domäne 3 um eine dominante Ligandenbindungsstelle in TNF-R han-

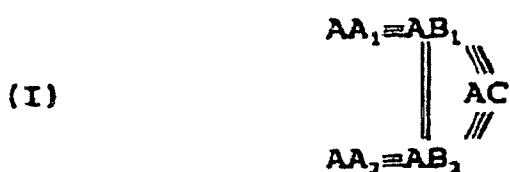
delt.

[0031] Beruhend auf dieser Feststellung werden entsprechende Regionen anderer Mitglieder der TNF-R Superfamilie nach welchen hemmende Peptide und Peptidanaloga gestaltet werden können, durch vergleichende Anordnung der Aminosäuresequenz mit den drei spezifischen Bindungsstellen von TNF-R p55 ([Abb. 1](#)) leicht identifiziert. Da die dominante Bindungsstelle von TNF-R p55 in die Aminosäurereste #119 bis 136 fällt, wobei die Sequenz mit Cys beginnt und endet, kann die gleiche Region bei jedem Mitglied der TNF-R Superfamilie verwendet werden, um Peptide und Peptidanaloga zu gestalten, die innerhalb des Geltungsbereichs der vorliegenden Erfindung sind. Bei Fällen, bei denen die Regionen nicht mit Cys beginnen oder enden, kann die Region auf das nächste Cys ausgedehnt werden. Zum Beispiel ist die entsprechende Region in Fas deletiert, und somit beginnt diese Region in Fas bei Rest #97 und endet mit #143. Im Fall von NGF-R endet die Region am Cys bei Position 135. Zusätzlich können die Reste 74–81 und 97–110 ebenfalls verwendet werden, um zusätzliche Peptide und Peptidanaloga zu gestalten. Derartige Verbindungen werden dann cyclisiert und an ihren Enden mit hydrophoben Einheiten, wie in den nachstehenden Abschnitten detaillierter beschrieben, modifiziert.

5.2. PEPTIDE UND PEPTIDANALOGA, GESTALTET NACH DEN BINDUNGSSCHLEIFEN EINES MITGLIEDS DER TNF-R SUPERFAMILIE

[0032] Im Allgemeinen handelt es sich bei einer wie hier offenbarten Verbindung um ein cyclisches Peptid oder Peptidanalogen. Das Peptid oder Peptidanalogen wird an seinen Enden mit hydrophoben Resten modifiziert. Bei Ausführungsformen, worin es sich bei der Verbindung um ein Peptid handelt, entspricht das Peptid in der Primärsequenz einer Bindungsschleife eines Mitgliedes der TNF-R Superfamilie oder einem Anteil davon. Bei einer bevorzugten Ausführungsform entspricht das Peptid in der Primärsequenz einer Bindungsschleife TNF-R p55 oder einem Anteil davon. Bei bestimmten Ausführungsformen sind ein oder mehrere Aminosäurereste innerhalb des Peptids mit anderen Aminosäureresten substituiert. Typischerweise sind derartige Aminosäuresubstitutionen konservativ, d. h. die Aminosäurereste sind mit anderen Aminosäureresten ersetzt, die physikalische und/oder chemische Eigenschaften aufweisen, die den Resten, die sie ersetzen, ähnlich sind. Vorzugsweise sind konservative Aminosäuresubstitutionen jene, worin eine Aminosäure mit einer anderen innerhalb der gleichen bezeichneten Klasse umfassten Aminosäure ersetzt wird, wie nachstehend gründlicher beschrieben werden wird. Bei Ausführungsformen, worin es sich bei der Verbindung um ein Peptidanalogen handelt, wird das Analogon durch Ersetzen von mindestens einer Amidbindung im Peptid mit einem substituierten Amid oder einem Isoster eines Amids erhalten.

[0033] In einer veranschaulichenden Ausführungsform weist eine wie hierin offenbarte Verbindung der Erfindung die folgende Formel auf:



worin:

AC ein Peptid von 3–18 Aminosäureresten, vorzugsweise 5–8 Aminosäuren, ist, welches in der Primärsequenz einer Bindungsschleife eines TNF-R entspricht und welches gegebenenfalls konservative Aminosäuresubstitutionen enthalten kann, oder ein Analogon davon, wobei mindestens eine Amidbindung mit einem substituierten Amid oder einem Isoster eines Amids ersetzt ist;

AB₁ eine Einheit mit einer ersten funktionellen Gruppe ist, die zum Bilden einer kovalenten Bindung mit einem Ende von AC in der Lage ist, mit einer zweiten funktionellen Gruppe, die zum Bilden einer kovalenten Bindung mit AB₂ in der Lage ist, und mit einer dritten funktionellen Gruppe, die zum Bilden einer kovalenten Bindung mit AA₁ in der Lage ist;

AB₂ ist eine Einheit mit einer ersten funktionellen Gruppe, die zum Bilden einer kovalenten Bindung mit dem anderen Ende von AC in der Lage ist, mit einer zweiten funktionellen Gruppe, die zum Bilden einer kovalenten Bindung mit AB₁ in der Lage ist und mit einer dritten funktionellen Gruppe, die zum Bilden einer kovalenten Bindung mit AA₂ in der Lage ist;

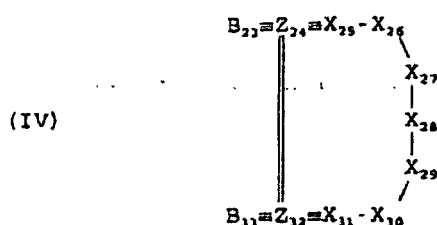
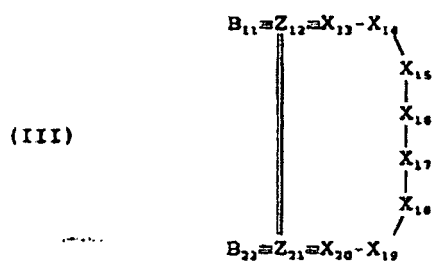
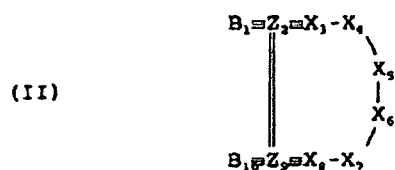
AA₁ ist eine Einheit mit hydrophoben Eigenschaften und einer funktionellen Gruppe, die in der Lage ist, eine kovalente Bindung mit der dritten funktionellen Gruppe AB₁ zu bilden;

AA₂ ist eine Einheit mit hydrophoben Eigenschaften und einer funktionellen Gruppe, die in der Lage ist, eine kovalente Bindung mit der dritten funktionellen Gruppe AB₂ zu bilden;

"=" ist eine kovalente Bindung; und

"≡" ist eine kovalente Bindung.

[0034] Die Erfindung stellt Verbindungen bereit, die die folgenden Formeln aufweisen:



[0035] Die Benennung X_n stellt in jedem Fall eine Aminosäure an der spezifischen Position in der Verbindung dar. In gleicher Weise stellt die Benennung Z_n eine Aminosäure oder andere Einheit dar, die zur Bildung von kovalenten Bindungen mit anderen Z_n , wie Disulfidbrücken, in der Lage ist.

[0036] Bei den mit X_n oder Z_n angegebenen Aminosäureresten kann es sich um genetisch kodierte L-Aminosäuren, in der Natur vorkommende nicht genetisch kodierte L-Aminosäuren, synthetische L-Aminosäuren oder D-Enantiomere von allen vorstehenden handeln. Bei den hierin verwendeten Aminosäurebezeichnungen für die zwanzig genetisch kodierten L-Aminosäuren und gewöhnlich nicht kodierten Aminosäuren handelt es sich um herkömmliche und sie sind wie folgt:

Aminosäure	Einbuchstabensymbol	Gewöhnliche Abkürzung
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val
β-Alanin		bAla
2,3-Diaminopropionsäure		Dpr
-α-Aminoisobuttersäure		Aib
N-Methylglycin (Sarcosin)		MeGly
Ornithin		Om
Citrullin		Cit
t-Butylalanin		t-BuA
t-Butylglycin		t-BuG
N-Methylisoleucin		Melle
Phenylglycin		Phg
Cyclohexylalanin		Cha
Norleucin		Nle
Naphthylalanin		Nal

(Fortsetzung)

Aminosäure	Einbuchstabensymbol	Gewöhnliche Abkürzung
Pyridylalanin		
3-Benzothierylalanin		
4-Chlorphenylalanin		Phe(4-Cl)
2-Fluorphenylalanin		Phe(2-F)
3-Fluorphenylalanin		Phe(3-F)
4-Fluorphenylalanin		Phe(4-F)
Penicillamin		Pen
1,2,3,4-Tetrahydro- isochinolin-3- carbonsäure		Tic
β -2-Thienylalanin		Thi
Methioninsulfoxid		MSO
Homoarginin		hArg
N-Acetyllysin		AcLys
2,4-Diaminobuttersäure		Dbu
p-Aminophenylalanin		Phe(pNH ₂)
N-Methylvalin		MeVal
Homocystein		hCys
Homoserin		hSer
ϵ -Aminohexansäure		Aha
δ -Aminovaleriansäure		Ava
2,3-Diaminobuttersäure		Dab

[0037] Die Verbindungen, die innerhalb des Geltungsbereichs der Erfindung umfasst sind, sind teilweise hinsichtlich der Aminosäurereste der genannten Klassen definiert. Die Aminosäuren können im Allgemeinen in drei Hauptklassen kategorisiert werden: hydrophile Aminosäuren, hydrophobe Aminosäuren und Cystein-ähnliche Aminosäuren, was in erster Linie von den Kennzeichen der Seitenkette der Aminosäure abhängt. Diese Hauptklassen können weiter in Unterklassen geteilt werden. Hydrophile Aminosäuren schließen Aminosäuren mit sauren, basischen oder polaren Seitenketten ein und hydrophobe Aminosäuren schließen Aminosäuren mit aromatischen oder polaren Seitenketten ein. Apolare Aminosäuren können weiter unterteilt werden, um unter anderem aliphatische Aminosäuren einzuschließen. Die Definitionen der Aminosäureklassen, wie hierin verwendet, sind wie folgt:

"Hydrophobe Aminosäure" bezeichnet eine Aminosäure mit einer Seitenkette, die bei physiologischem pH ungeladen ist und die durch wässrige Lösung abgestossen wird. Beispiele für genetisch kodierte hydrophobe Aminosäuren schließen Ile, Leu und Val ein. Beispiele für nicht genetisch kodierte hydrophobe Aminosäuren schließen t-BuA ein.

"Aromatische Aminosäure" bezeichnet eine hydrophobe Aminosäure mit einer Seitenkette, die mindestens einen Ring mit einem π -Elektronensystem (aromatischer Rest) enthält. Der aromatische Rest kann weiter mit Substituentenresten, wie Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyresten, Hydroxyl-, Sulfanyl-, Nitro- und Aminogruppen, sowie mit anderen substituiert sein. Beispiele für genetisch kodierte aromatische Aminosäuren schließen Phenylala-

nin, Tyrosin und Tryptophan ein. Gewöhnlicherweise angetroffene nicht genetisch kodierte aromatische Aminosäuren schließen Phenylglycin, 2-Naphthylalanin, β -2-Thienylalanin, 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure, 4-Chlorphenylalanin, 2-Fluorphenylalanin, 3-Fluorphenylalanin und 4-Fluorphenylalanin ein.

"Apolare Aminosäure" bezeichnet eine hydrophobe Aminosäure mit einer Seitenkette, die im Allgemeinen bei physiologischem pH ungeladen ist und die nicht polar ist. Beispiele für genetisch kodierte apolare Aminosäuren schließen Glycin, Prolin und Methionin ein. Beispiele für nicht kodierte apolare Aminosäuren schließen Cha ein.

"Aliphatische Aminosäure" bezeichnet eine apolare Aminosäure mit einer gesättigten oder ungesättigten Kette von einem Kohlenwasserstoffrest, verzweigte oder cyclische Seitenkette von einem Kohlenwasserstoffrest. Beispiele für genetisch kodierte aliphatische Aminosäuren schließen Ala, Leu, Val und Ile ein. Beispiele für nicht kodierte aliphatische Aminosäuren schließen Nle ein.

"Hydrophile Aminosäure" bezeichnet eine Aminosäure mit einer Seitenkette, die durch eine wässrige Lösung angezogen wird. Beispiele für genetisch kodierte hydrophile Aminosäuren schließen Ser und Lys ein. Beispiele für nicht kodierte hydrophile Aminosäuren schließen Cit und hCys ein.

"Saure Aminosäure" bezeichnet eine hydrophile Aminosäure mit einem pK-Wert der Seitenkette von weniger als 7. Saure Aminosäuren weisen bei physiologischem pH aufgrund des Verlusts eines Wasserstoffions typischerweise negativ geladene Seitenketten auf. Beispiele für genetisch kodierte saure Aminosäuren schließen Asparaginsäure (Aspartat) und Glutaminsäure (Glutamat) ein.

"Basische Aminosäure" bezeichnet eine hydrophile Aminosäure mit einem pK-Wert der Seitenkette von mehr als 7. Basische Aminosäuren weisen bei physiologischem pH aufgrund der Assoziation mit einem Hydroniumion typischerweise positiv geladene Seitenketten auf. Beispiele für genetisch kodierte basische Aminosäuren schließen Arginin, Lysin und Histidin ein. Beispiele für nicht genetisch kodierte basische Aminosäuren schließen die nicht cyclischen Aminosäuren Ornithin, 2,3-Diaminopropionsäure, 2,4-Diaminobuttersäure und Homoarginin ein.

"Polare Aminosäure" bezeichnet eine hydrophile Aminosäure mit einer Seitenkette, die bei physiologischem pH ungeladen ist, welche aber eine Bindung hat, bei welcher das gemeinsam von zwei Atomen geteilte Elektronenpaar näher bei einem der Atome ist. Beispiele für genetisch kodierte polare Aminosäuren schließen Asparagin und Glutamin ein. Beispiele für nicht genetisch kodierte polare Aminosäuren schließen Citrullin, N-Acetyllysin und Methioninsulfoxid ein.

"Cystein-ähnliche Aminosäure" bezeichnet eine Aminosäure mit einer Seitenkette, die mit einer Seitenkette eines anderen Aminosäurerests zur Bildung einer kovalenten Bindung in der Lage ist. Typischerweise weisen Cystein-ähnliche Aminosäuren im Allgemeinen eine Seitenkette auf, die mindestens eine Thiol-(SH)-Gruppe hat. Beispiele für genetisch kodierte Cystein-ähnliche Aminosäuren schließen Cystein ein. Beispiele für nicht genetisch kodierte Cystein-ähnliche Aminosäuren schließen Homocystein und Penicillamin ein.

[0038] Wie für Fachleute selbstverständlich, ist diese vorstehende Klassifikation nicht absolut – einige Aminosäuren zeigen mehr als eine kennzeichnende Eigenschaft, und können deshalb in mehr als einer Kategorie eingeschlossen werden. Zum Beispiel weist Tyrosin sowohl einen aromatischen Ring als auch eine polare Hydroxylgruppe auf. Somit weist Tyrosin duale Eigenschaften auf und kann sowohl in den aromatischen als auch polaren Kategorien eingeschlossen werden. Auf ähnlich Weise weist Cystein, zusätzlich zur Fähigkeit Disulfidbrücken zu bilden, ebenfalls einen apolaren Charakter auf. Somit kann Cystein, indem es nicht strikt als eine hydrophobe oder apolare Aminosäure klassifiziert ist, in vielen Fällen verwendet werden, um einem Peptid Hydrophobizität zu verleihen.

[0039] Bestimmte gewöhnlicherweise angetroffene Aminosäuren, welche nicht genetisch kodiert sind, aus denen die Peptide und Peptidanaloga der Erfindung zusammengesetzt werden können, schließen β -Alanin (b-Ala) und andere omega-Aminosäuren, wie 3-Aminopropionsäure (Dap), 2,3-Diaminopropionsäure (Dpr), 4-Aminobuttersäure und so weiter; (-)Aminoisobuttersäure (Aib); ϵ -Aminohexansäure (Aha); δ -Aminovaleriansäure (Ava); N-Methylglycin oder Sarcosin (MeGly); Ornithin (Orn); Citrullin (Cit); t-Butylalanin (t-BuA); t-Butylglycin (t-BuG); N-Methylisoleucin (Melle); Phenylglycin (Phg); Cyclohexylalanin (Cha); Norleucin (Nle); 2-Naphthylalanin (2-Nal); 4-Chlorphenylalanin (Phe(4-C1)); 2-Fluorphenylalanin (Phe(2-F)); 3-Fluorphenylalanin (Phe(3-F)); 4-Fluorphenylalanin (Phe(4F)); Penicillamin (Pen); 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure (Tic); P-2-Thienylalanin (Thi); Methioninsulfoxid (MSO); Homoarginin (hArg); N-Acetyllysin (AcLys); 2,3-Diaminobuttersäure (Dab); 2,3-Diaminobuttersäure (Dbu); p-Aminophenylalanin (Phe(pNH₂)); N-Methylvalin (MeVal); Homocystein (hCys) und Homoserin (hSer) ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Diese Aminosäuren fallen in geeigneter Weise in die vorstehend definierten Kategorien.

[0040] Die Klassifikationen der vorstehend beschriebenen genetisch kodierten und nicht kodierten Aminosäuren werden nachstehend in Tabelle 1 zusammengefasst. Es soll selbstverständlich sein, dass Tabelle 1 nur für veranschaulichende Zwecke ist und nicht vorgibt, eine erschöpfende Liste von Aminosäureresten zu sein, wel-

che die hierin beschriebenen Peptide und Peptidanaloga umfassen können. Andere Aminosäurereste, welche zum Herstellen der hierin beschriebenen Peptide und Peptidanaloga nützlich sind, können z. B. in Fasman, 1989, CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, CRC Press, Inc., und den hierin zitierten Referenzen gefunden werden. Hierin nicht spezifisch erwähnte Aminosäuren können in geeigneter Weise in die vorstehend beschriebenen Kategorien auf Grundlage von bekanntem Verhalten und/oder ihren kennzeichnenden chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften, verglichen mit den spezifisch identifizierten Aminosäuren, klassifiziert werden.

Tabelle 1

Klassifikation	Genetisch kodiert	Nicht genetisch kodiert
Hydrophob		
Aromatisch	F, Y, W	Phg, Nal, Thi, Tic, Phe(4-Cl), Phe(2-F), Phe(3-F), Phe(4-F), Pyridyl Ala, Benzothienyl Ala
Apolar	M, G, P	
Aliphatisch	A, V, L, I	t-BuA, t-BuG, Melle, Nle, MeVal, Cha, bAla, MeGly, Aib
Hydrophil		
Sauer	D, E	
Basisch	H, K, R	Dpr, Orn, hArg, Phe(<i>p</i> -NH ₂), DBU, A ₂ BU
Polar	Q, N, S, T, Y	Cit, AcLYs, MSO, hSer
Cystein-ähnlich	C	Phen, hCys, β -Methyl Cys

[0041] Die Benennung Z_n stellt in jedem Fall eine Aminosäure oder andere Einheit dar, die zur Bildung kovalenter Bindungen mit anderen Z_n in der Lage ist, um die Cyclisierung des Peptids zu gestatten. Beispiele für Aminosäurereste, die zur Bildung kovalenter Bindungen miteinander in der Lage sind, schließen Cystein-ähnliche Aminosäuren, wie Cys, hCys, β -Methyl Cys und Pen ein, die zur Bildung von Disulfidbrücken miteinander in der Lage sind. Bevorzugte Cystein-ähnliche Aminosäurereste schließen Cys und Pen ein.

[0042] Bei Aminosäuren, die verwendet werden, um ein Peptid zu cyclisieren, muß es sich nicht um Cystein-ähnliche Aminosäuren handeln. Paare von Aminosäuren, die funktionelle Gruppen in der Seitenkette aufweisen, die zur Bildung kovalenter Bindungen untereinander in der Lage sind, können ebenfalls verwendet werden. Derartige Paare von funktionellen Gruppen sind Fachleuten bekannt und schließen unter anderem -COOH und -OH, -COOH und -NH₂ und -COOH und -SH ein. Somit schließen Paare von Aminosäuren, die verwendet werden können, um ein Peptid zu cyclisieren, unter anderem Asp und Lys; Glu und Lys; Asp und Arg; Glu und Arg; Asp und Ser; Glu und Ser; Asp und Thr; Glu und Thr; Asp und Cys; und Glu und Cys ein. Andere Paare von Aminosäuren, die verwendet werden können, um das Peptid zu cyclisieren, werden Fachleuten offensichtlich sein.

[0043] Es wird ebenfalls anerkannt, dass die Reste Z_n, die verwendet werden, um ein Peptid zu cyclisieren, keine Aminosäuren sein müssen. Somit kann Z_n jedes beliebige Molekül mit drei funktionellen Gruppen sein – eine funktionelle Gruppe, die zur Bildung einer kovalenten Bindung mit einem Ende des Peptids in der Lage ist, eine zweite funktionelle Gruppe, die zur Bildung einer kovalenten Bindung mit der zweiten funktionellen Gruppe eines anderen Z_n in der Lage ist, und eine dritte funktionelle Gruppe, die zur Bildung einer kovalenten Bindung mit hydrophoben Einheiten B_n in der Lage ist. Moleküle mit geeigneten funktionellen Gruppen werden für Fachleute auf dem Fachgebiet offensichtlich sein. Beispiele für funktionelle Gruppen, die zur Bildung einer kovalenten Bindung mit dem Aminoende des Peptids in der Lage sind, schließen Carbonsäuren und Ester ein. Beispiele für funktionelle Gruppen, die zur Bildung einer kovalenten Bindung mit dem Carboxylende eines Pep-

tids in der Lage sind, schließen -OH, -SH, -NH₂ und -NHR ein, wobei es sich bei R um (C₁-C₆)-Alkyl, (C₁-C₆)-Alkenyl und (C₁-C₆)-Alkynyl handelt.

[0044] Eine Vielfalt von Zwischenbindungen, die zum Cyclisieren eines Peptids nützlich sind, kann durch eine Reaktion zwischen zwei Z_n hergestellt werden. Z_n mit funktionellen Gruppen, die zur Bildung derartiger Zwischenbindungen geeignet sind, sowie Reaktionsbedingungen, die zum Bilden derartiger Zwischenbindungen geeignet sind, werden für Fachleute offensichtlich sein. Vorzugsweise sind die zum Zyklisieren der Peptide verwendeten Reaktionsbedingungen ausreichen mild, um das Peptid nicht abzubauen oder auf eine andere Weise zu zerstören. Gegebenenfalls sind geeignete Gruppen zum Schützen der verschiedenen Funktionalitäten auf dem Fachgebiet wohlbekannt (siehe z. B. Greene & Wuts, 1991, 2. Aufl., John Wiley & Sons, NY), wie auch verschiedene Reaktionsschemen zum Herstellen derartiger geschützter Moleküle.

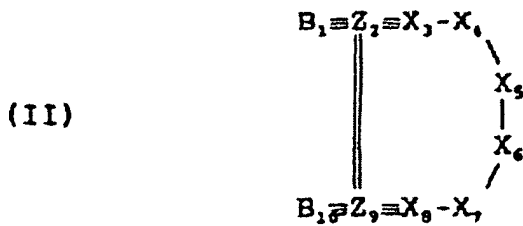
[0045] Die Benennung B_n stellt in jedem Fall eine hydrophobe Einheit dar. Während es nicht beabsichtigt ist, an irgendeine bestimmte Theorie gebunden zu sein, wird geglaubt, dass diese hydrophoben Einheiten wechselwirken, wenn sie in eine wässrige Lösung platziert werden, um dem Peptid strukturelle Stabilität zu verleihen. Von einer signifikanten hydrophoben Wechselwirkung zum Verleihen von struktureller Stabilität wird gedacht, dass es sich um die Stapelung aromatischer Ringe handelt. Somit benennt bei einer bevorzugten Ausführungsform jedes beliebige B_n ein Peptid von 1–6 Aminosäuren, wobei mindestens eines davon eine aromatische Aminosäure oder eine aromatische oder heteroaromatische Einheit ist. B_n kann als X₃₂-X₃₃-X₃₄-X₃₅-X₃₆-X₃₇ veranschaulicht werden, wobei X_n eine Aminosäure ist, wobei mindestens eine davon eine aromatische Aminosäure ist. Vorzugsweise fehlen X₃₂-X₃₃-X₃₄ und X₃₇ ist eine aromatische Aminosäure. Stärker bevorzugt fehlen X₃₂-X₃₃-X₃₄-X₃₅-X₃₆ und X₃₇ ist eine aromatische Aminosäure. Geeignete aromatische Aminosäuren schließen Tyr, Phe und Trp ein, wobei Tyr und Phe bevorzugt sind. Geeignete aromatische oder heteroaromatische Einheiten schließen Phenyl, Naphthyl, Purin, Pyrimidin und ähnliche ein.

[0046] In den Peptiden der Formeln (II)–(IV) benennt das Symbol "-" zwischen den Aminosäureresten X_n im Allgemeinen eine Zwischenbindung mit dem Gerüst. Somit benennt das Symbol "-" normalerweise eine Amidbindung (-C(O)-NH). Es soll allerdings selbstverständlich sein, dass bei allen hierin in den spezifischen Offenbarungen beschriebenen Peptiden eine oder mehrere Amidbindungen gegebenenfalls mit einer Bindung, die sich von einem Amid unterscheidet, vorzugsweise einem substituierten Amid oder einem Isoster einer Amidbindung, substituiert sein kann/können. Somit wird ein Fachmann erkennen, dass, während die verschiedenen X_n im Allgemeinen hinsichtlich Aminosäuren beschrieben worden sind, bei Ausführungsformen mit nicht-Amidbindungen der Begriff "Aminosäure" andere bifunktionale Einheiten mit Seitenkettenresten benennt, die ähnlich zu den Seitenketten der Aminosäuren sind. Zum Beispiel bezeichnet bei Ausführungsformen mit nicht-Amidbindungen der Ausdruck "saure Aminosäure" ein bifunktionelles Molekül, das zur Bildung der gewünschten Zwischenbindungen des Gerüsts in der Lage ist, und welches einen Seitenkettenrest aufweist, der ähnlich zu der Seitenkette einer sauren Aminosäure ist. Substituierte Amide schließen im Allgemeinen Reste der Formel -C(O)-NR ein, wobei R (C₁-C₆)-Alkyl, (C₁-C₆)-Alkenyl, (C₁-C₆)-Alkynyl, substituiertes (C₁-C₆)-Alkyl, substituiertes (C₁-C₆)-Alkenyl oder substituiertes (C₁-C₆)-Alkynyl ist. Isostere von Amididen schließen im Allgemeinen, -CH₂NH-, -CH₂S-, CH₂CH₂-, -CH=CH- (cis und trans), -C(O)CH₂-, -CH(OH)CH₂- und CH₂SO- ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0047] Verbindungen mit derartigen Bindungen und Verfahren zum Herstellen derartiger Verbindungen sind auf dem Fachgebiet wohlbekannt (siehe z. B. Spatola, 1983, Vega Data 1(3) für einen allgemeinen Überblick); Spatola, 1983, "Peptid Backbone Modifications" In: Chemistry and Biochemistry of Amino acids, Peptides and Proteins (Weinstein, Hrsg.), Marcel Dekker, New York, S. 267 (allgemeiner Überblick); Morley, 1980, Trends Pharm. Sci. 1: 463–468; Hudson et al., 1979, Int. J. Prot. Res. 14: 177–185 (-CH₂NH-, -CH₂CH₂-); Spatola et al., 1986, Life Sci. 38: 1243–1249 (-CH₂S-); Hann, 1982, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1: 307 – 314 (-CH=CH-, cis und trans); Almquist et al., 1980, J. Med. Chem. 23: 1392–1398 (-COCH₂-); Jennings-White et al., Tetrahedron. Lett. 23: 2533 (-COCH₂-); Europäische Patentanmeldung EP 45665 (1982) CA: 97: 39405 (-CH(OH)CH₂-); Holladay et al., 1983, Tetrahedron Lett. 24: 4401–4404 (-C(OH)CH₂-); und Hruby, 1982, Life Sci. 31: 189–199 (-CH₂S-).

[0048] Wie nachstehend detaillierter beschrieben werden wird, kann es sich bei der Zwischenbindung, die mit "≡" benannt wird, zwischen den Resten B_n und/oder Z_n und/oder X_n in den Verbindungen der Formeln (II)–(IV) ebenfalls um einen Linker handeln. Typischerweise handelt es sich bei einem Linker um ein bifunktionelles Molekül, das eine Einheit in einem Abstand von einer anderen anordnet. Derartige Linker, welche flexibel, halb-starr oder starr sein können, sind auf dem Fachgebiet wohlbekannt und schließen Polypeptide, wie poly-Gly und poly-Pro, bifunktionelle Kohlenwasserstoffe, wie Aminocaprinsäure, δ-Aminovaleriansäure und β-Alanin, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren und ähnliche ein.

[0049] Die Verbindungen der Formel (II) können wie folgt definiert werden:



worin:

B₁ und B₁₀ jeweils unabhängig voneinander ein Peptid von 1–6 Aminosäuren, wovon mindestens eine eine hydrophobe Aminosäure, eine aromatische Einheit oder eine heteroaromatische Einheit ist, sind;

Z₂ eine Einheit ist, die zur Bildung einer kovalenten Bindung mit B₁, X₃ und Z₉ in der Lage ist;

Z₉ eine Einheit ist, die zur Bildung einer kovalenten Bindung mit B₁₀, X₈ und Z₂ in der Lage ist;

X₃ fehlt oder ist eine hydrophile Aminosäure;

X₄ ist eine hydrophobe Aminosäure;

X₅ ist eine hydrophile Aminosäure;

X₆ ist eine hydrophile Aminosäure;

X₇ ist eine hydrophobe oder hydrophile Aminosäure;

X₈ ist eine hydrophobe oder hydrophile Aminosäure;

"-" ist ein Amid, ein substituiertes Amid oder ein Isoster eines Amids davon;

"=" ist eine kovalente Bindung; and

"≡" ist eine kovalente Bindung.

[0050] Die Verbindungen der Erfindung sind jene der Formel (II), worin:

B₁ und B₁₀ jeweils unabhängig voneinander ein Peptid von 1–3 Aminosäuren, wovon mindestens eine eine aromatische Aminosäure ist, sind;

Z₂ und Z₉ jeweils unabhängig voneinander eine Cys-ähnliche Aminosäure sind;

X₃ fehlt oder ist eine saure Aminosäure;

X₄ ist eine aromatische oder apolare Aminosäure;

X₅ ist eine polare Aminosäure;

X₆ ist eine polare Aminosäure;

X₇ ist eine aromatische oder polare Aminosäure;

X₈ ist eine aromatische, apolare oder polare Aminosäure

"-" ist eine Amidbrücke;

"=" ist eine Disulfidbrücke; und

"≡" ist eine Amidbrücke.

[0051] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Verbindungen der Erfindung jene der Formel (II), worin:

B₁ und B₁₀ jeweils unabhängig voneinander Tyr oder Phe sind;

Z₂ und Z₉ jeweils Cys sind;

X₃ fehlt oder Glu ist;

X₄ Trp oder Leu ist;

X₅ Ser ist;

X₆ Gln ist;

X₇ Tyr oder Asn ist;

X₈ Tyr oder Leu ist;

"-" ist eine Amidbrücke;

"=" ist eine Disulfidbrücke; und

"≡" ist eine Amidbrücke.

[0052] Besonders bevorzugte Peptide der Erfindung schließen die folgenden ein:

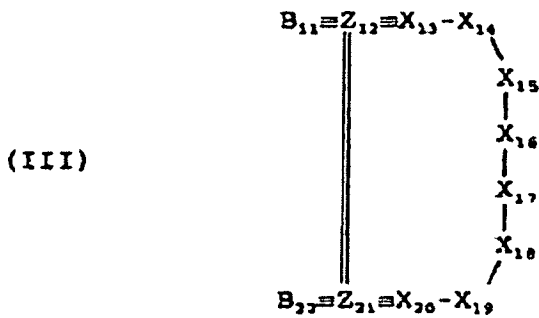
YCELSQYLCY (SEQ ID NO: 12)

YC WSQNLCY (SEQ ID NO: 13)

YC WSQNYCY (SEQ ID NO: 14)

YC WSQYLCY (SEQ ID NO: 15)

[0053] Die Verbindungen der Formel (III) können wie folgt definiert werden:



worin:

B_{11} und B_{22} jeweils unabhängig voneinander ein Peptid von 1–6 Aminosäuren, wovon mindestens eine eine hydrophobe Aminosäure, eine aromatische Einheit oder eine heteroaromatische Einheit ist, sind;

Z_{12} eine Einheit ist, die zur Bildung einer kovalenten Bindung mit B_{11} , X_{13} und Z_{21} in der Lage ist;

Z_{21} eine Einheit ist, die zur Bildung einer kovalenten Bindung mit B_{22} , X_{20} und Z_{12} in der Lage ist;

X_{13} fehlt oder ist eine hydrophobe Aminosäure;

X_{14} fehlt oder ist eine hydrophile Aminosäure;

X_{15} ist eine hydrophile oder hydrophobe Aminosäure;

X_{16} ist eine hydrophile Aminosäure;

X_{17} fehlt oder ist eine hydrophobe Aminosäure;

X_{18} ist eine hydrophile Aminosäure;

X_{19} ist eine hydrophile Aminosäure;

X_{20} ist eine hydrophile Aminosäure;

"-" ist ein Amid, ein substituiertes Amid oder ein Isoster eines Amids davon;

"=" ist eine kovalente Bindung; and

"≡" ist eine kovalente Bindung.

[0054] Die Verbindungen der Erfindung sind jene der Formel (III), worin:

B_{11} und B_{22} jeweils unabhängig voneinander ein Peptid von 1–3 Aminosäuren, wovon mindestens eine eine aromatische Aminosäure ist, sind;

Z_{12} und Z_{21} jeweils unabhängig voneinander eine Cys-ähnliche Aminosäure sind;

X_{13} fehlt oder ist eine aromatische Aminosäure;

X_{14} fehlt oder ist eine polare Aminosäure;

X_{15} ist eine basische, polare oder apolare Aminosäure;

X_{16} ist eine polare Aminosäure;

X_{17} fehlt oder ist eine apolare Aminosäure;

X_{18} ist eine saure Aminosäure;

X_{19} ist eine polare Aminosäure;

X_{20} ist eine basische Aminosäure;

"-" ist eine Amidbrücke;

"=" ist eine Disulfidbrücke; und

"≡" ist eine Amidbrücke.

[0055] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die Verbindungen der Erfindung jene der Formel (III), worin:

B_{11} und B_{22} jeweils unabhängig voneinander Tyr oder Phe sind;

Z_{12} und Z_{21} jeweils Cys sind;

X_{13} fehlt oder Phe ist;

X_{14} fehlt oder Thr ist;

X_{15} ist Ala, Asn oder Arg;

X_{16} ist Ser;

X_{17} fehlt oder ist Val;

X_{18} ist Glu;

X_{19} ist Asn;

X_{20} ist Arg oder His;

"-" ist eine Amidbrücke;

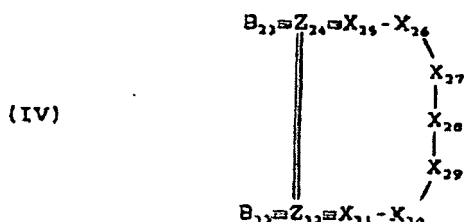
"=" ist eine Disulfidbrücke; und

"≡" ist eine Amidbrücke.

[0056] Besonders bevorzugte Peptide der Erfindung schließen die folgenden ein:

YC FTASENH CY (SEQ. ID NO: 16)
 YC FTNSENH CY (SEQ. ID NO: 17)
 YC FTRSENH CY (SEQ. ID NO: 18)
 FC ASENH CY (SEQ. ID NO: 19)
 YC ASENH CY (SEQ. ID NO: 20)
 FC NSENH CY (SEQ. ID NO: 21)
 FC NSENH CY (SEQ. ID NO: 22)
 FC NSVENR CY (SEQ. ID NO: 23)

[0057] Die Verbindungen der Formel (IV) können wie folgt definiert werden:



worin:

B₂₃ und B₃₃ jeweils unabhängig voneinander ein Peptid von 1–6 Aminosäuren, wovon mindestens eine eine hydrophobe Aminosäure, eine aromatische Einheit oder eine heteroaromatische Einheit ist, sind;
 Z₂₄ eine Einheit ist, die zur Bildung einer kovalenten Bindung mit B₂₃, X₂₅ und Z₃₂ in der Lage ist;
 Z₃₂ eine Einheit ist, die zur Bildung einer kovalenten Bindung mit B₃₃, X₃₁ und Z₂₄ in der Lage ist;
 X₂₅ fehlt oder ist eine hydrophile Aminosäure;
 X₂₆ ist eine hydrophile Aminosäure;
 X₂₇ ist eine hydrophile Aminosäure;
 X₂₈ ist eine hydrophobe Aminosäure;
 X₂₉ ist eine hydrophobe Aminosäure;
 X₃₀ fehlt oder ist eine hydrophile Aminosäure;
 X₃₁ fehlt oder ist eine hydrophobe Aminosäure;
 "-" ist ein Amid, ein substituiertes Amid oder ein Isoster eines Amids davon;
 "=" ist eine kovalente Bindung; and
 "≡" ist eine kovalente Bindung.

[0058] Die Verbindungen der Erfindung sind jene der Formel (IV), worin:

B₂₃ und B₃₃ unabhängig voneinander ein Peptid von 1–3 Aminosäuren sind, wovon mindestens eine eine aromatische Aminosäure ist;
 Z₂₄ und Z₃₂ jeweils unabhängig voneinander eine Cys-ähnliche Aminosäure sind;
 X₂₅ fehlt oder ist eine basische Aminosäure;
 X₂₆ ist eine basische Aminosäure;
 X₂₇ ist eine saure Aminosäure;
 X₂₈ ist eine apolare Aminosäure;
 X₂₉ ist eine apolare Aminosäure;
 X₃₀ fehlt oder ist eine polare Aminosäure;
 X₃₁ fehlt oder ist eine apolare Aminosäure;
 "-" ist eine Amidbrücke;
 "=" ist eine Disulfidbrücke; und
 "≡" ist eine Amidbrücke.

[0059] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Verbindungen der Erfindung oder Analoga davon jene der Formel (IV), worin

B₂₃ und B₃₃ unabhängig voneinander Tyr oder Phe sind;
 Z₂₄ und Z₃₂ jeweils Cys sind;
 X₂₅ fehlt oder ist Arg;
 X₂₆ ist Lys;
 X₂₇ ist Glu;
 X₂₈ ist Leu, Pro oder Met;
 X₂₉ ist Gly
 X₃₀ fehlt oder ist Gln;
 X₃₁ fehlt oder ist Val;

"-" ist eine Amidbrücke;
 "=" ist eine Disulfidbrücke; und
 "≡" ist eine Amidbrücke.

[0060] Besonders bevorzugte Peptide der Erfindung schließen die folgenden ein:

YC RKELGQV CY (SEQ. ID NO: 24)

YC KEPGQ CY (SEQ. ID NO: 25)

YC RKEMG CY (SEQ. ID NO: 26)

FC RKEMG CY (SEQ. ID NO: 27)

[0061] In allen der vorstehend erwähnten Ausführungsformen der Erfindung soll selbstverständlich sein, dass der Ausdruck "Aminosäure" ebenfalls bifunktionelle Einheiten mit Aminosäure-ähnlichen Seitenketten, wie zuvor beschrieben, bezeichnet.

[0062] Im Allgemeinen sind aktive Peptide oder Peptidanaloga der Erfindung jene, welche mindestens etwa 15 % Hemmung von TNF-R:TNF-Wechselwirkungen zeigen, wie jene nachstehend in Abschnitt 6 in in vitro Assays gemessenen. Vorzugsweise werden aktive Peptide oder Peptidanaloga der Erfindung mindestens etwa 20 % bis 50 % oder sogar 80 % oder mehr Hemmung der TNF-R:TNF-bindenden Wechselwirkungen zeigen.

5.3. HERSTELLUNG VON PEPTIDEN UND PEPTIDANALOGA

5.3.1. CHEMISCHE SYNTHESE

[0063] Die Peptide der Erfindung oder Analoga davon können unter Verwendung von nahezu allen auf dem Fachgebiet bekannten Techniken zur Herstellung von Peptiden und Peptidanaloga hergestellt werden. Zum Beispiel können die Peptide in linearer oder nicht cyclisierter Form unter Verwendung von gewöhnlicher Lösungsphasen- oder Festphasen-Peptidsynthesen hergestellt werden und unter Verwendung von Standardchemie cyclisiert werden. Vorzugsweise wird die zum Cyclisieren des Peptids verwendete Chemie ausreichend mild sein, um wesentliches Abbauen des Peptids zu vermeiden. Geeignete Verfahren zum Synthetisieren der hierin beschriebenen Peptide, sowie geeignete Chemie zum Cyclisieren der Peptide sind auf dem Fachgebiet wohlbekannt.

[0064] Bildung von Disulfidbrücken, wird, falls gewünscht, im Allgemeinen in Anwesenheit von milden Oxidationsmitteln durchgeführt. Chemische, enzymatische oder photolytische Oxidationsmittel können verwendet werden. Verschiedene Verfahren sind auf dem Fachgebiet bekannt, einschließlich jener zum Beispiel von Tam, J. S. et al., 1979, Synthesis 955–957; Stewart et al., 1984, Solid Phase Peptide Synthesis, 2. Aufl., Pierce Chemical Company Rockford, IL; Ahmed et al., 1975, J. Biol. Chem. 250: 8477–8482; und Pennington et al., 1991 Peptides 1990 164–166, Giralt und Andreu, Hrsg., ESCOM Leiden, The Netherlands beschriebenen. Eine zusätzliche Alternative wird von Kamber et al., 1980, Helv Chim Acta 63: 899–915 beschrieben. Ein Verfahren, das auf festen Trägern durchgeführt wird, ist von Albericio, 1985, Int. J. Peptid Protein Res. 26: 92–97 beschrieben. Jedes beliebige dieser Verfahren kann verwendet werden, um Sulfidbrücken in den Peptiden der Erfindung zu bilden. Bevorzugte Verfahren zum Bewirken der Bildung von Disulfidbrücken für die hierin beschriebenen Peptide werden in den Beispielen bereitgestellt.

5.3.2. REKOMBINANTE SYNTHESE

[0065] Falls das Peptid zur Gänze aus Gen-kodierten Aminosäuren zusammengesetzt ist, oder ein Anteil davon so zusammengesetzt ist, kann das Peptid oder der relevante Anteil ebenfalls unter Verwendung gewöhnlicher rekombinanter Techniken der Gentechnik synthetisiert werden. Die isolierten Peptide oder Segmente davon werden dann wie zuvor beschrieben kondensiert und oxidiert, um ein cyclisches Peptid zu ergeben.

[0066] Für die rekombinante Erzeugung wird eine Polynukleotidsequenz, die eine lineare Form des Peptids kodiert, in ein geeignetes Expressionsvehikel eingefügt, d. h. ein Vektor, welcher die für die Transkription und Translation der eingefügten kodierenden Sequenz erforderlichen Elemente enthält, oder in dem Fall eines viralen RNA-Vektors die für Replikation und Translation erforderlichen Elemente. Das Expressionsvehikel wird dann in eine geeignete Zielzelle transfiziert, welche die lineare Form des cyclischen Peptids exprimieren wird. Abhängig von dem verwendeten Expressionssystem wird das exprimierte Peptid dann mit auf dem Fachgebiet gut etablierten Verfahren isoliert. Auf dem Fachgebiet sind Verfahren für die rekombinante Protein- und Peptiderzeugung wohlbekannt (siehe z. B. Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring

Harbor Laboratory, N.Y.; und Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates und Wiley Interscience, N.Y.).

[0067] Eine Vielfalt von Wirts-Vektorsystemen zur Expression kann benutzt werden, um die hier beschriebenen Peptide zu exprimieren. Diese schließen Mikroorganismen, wie Bakterien, die mit Expressionsvektoren von rekombinanter Bakteriophagen DNA oder Plasmid DNA, die eine passende kodierende Sequenz enthalten, transformiert sind; Hefe oder filamentöse Pilze, die mit rekombinanten Hefe oder Pilz Expressionsvektoren, die eine passende kodierende Sequenz enthalten, transformiert sind; Insektenzellsysteme, die mit rekombinanten viralen Expressionsvektoren (z. B. Baculovirus), die eine passende kodierende Sequenz enthalten, infiziert sind; Pflanzenzellsysteme, die mit rekombinanten viralen Expressionsvektoren (z. B. Blumenkohl-Mosaikvirus oder Tabak-Mosaikvirus) infiziert oder mit rekombinanten Plasmidexpressionsvektoren (z. B. Ti-Plasmid), die eine passende kodierende Sequenz enthalten, transformiert sind; oder tierische Zellsysteme ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0068] Die Expressionselemente der Expressionssysteme variieren in ihrer Stärke und ihren Spezifitäten. Abhängig vom benutzten Wirts/Vektor-System kann jedes aus einer Anzahl von geeigneten Transkriptions- und Translationselementen, einschließlich konstitutive und induzierbare Promotoren, in dem Expressionsvektor verwendet werden. Beim Klonieren in bakteriellen Systemen, können induzierbare Promotoren, wie pL des Bakteriophagen λ , plac, ptrp, ptac (ptrp-lac-Hybridpromotor) und ähnliche, verwendet werden; beim Klonieren in Insektenzellsystemen, können Promotoren, wie der Polyeder-Promotor von Baculovirus verwendet werden; beim Klonieren in Pflanzenzellsystemen, können Promotoren, abgeleitet aus dem Genom von Pflanzenzellen (z. B. Hitzeschock-Promotoren; der Promotor für die kleine Untereinheit von RUBISCO; der Promotor für das Chlorophyll a/b Bindeprotein) oder Pflanzenviren (z. B. der Promotor für die 35S RNA vom CaMV; der Promotor des Hüllproteins vom TMV), verwendet werden; beim Klonieren in Säugerzellen, können Promotoren, abgeleitet aus dem Genom von Säugerzellen (z. B. Metallothionein-Promoter) oder aus Säugerviren (z. B. der späte Promotor von Adenovirus, der 7.5 K Promotor von Vaccinavirus) verwendet werden; wenn man Zelllinien erzeugt, die mehrere Kopien des Expressionsproduktes enthalten, können auf SV40, BPV und EBV beruhende Vektoren mit einem passenden selektierbaren Marker verwendet werden. In Fällen wo Pflanzenexpressionsvektoren verwendet werden, kann die Expression der Sequenzen, die Peptide der Erfindung kodieren, durch jeden aus einer Anzahl von Promotoren angetrieben werden. Zum Beispiel können virale Promotoren, wie die Promotoren der 35S RNA und 19S RNA vom CaMV (Brisson et al., 1984, Nature 310: 511–514) oder der Promotor des Hüllproteins vom TMV (Takamatsu et al., 1987, EMBO J. 6: 307–311) verwendet werden; alternativ dazu können Pflanzenpromotoren verwendet werden, wie der Promotor der kleinen Untereinheit von RUBISCO (Coruzzi et al., 1984, EMBO J. 3: 1671–1680; Broglie et al., 1984, Science 224: 838–843) oder Hitzeschock-Promotoren, z. B. hsp17.5-E oder hsp17.3-B aus Sojabohne (Gurley et al., 1986, Mol. Cell. Biol. 6: 559–565). Diese Konstrukte können in Pflanzenzellen unter Verwendung von Ti-Plasmiden, Ri-Plasmiden, Pflanzen-Virusvektoren, direkter DNA Transformation, Mikroinjektion, Elektroporation, usw. eingeführt werden. Für Überblicke derartiger Techniken siehe z. B. Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Abschnitt VIII, S. 421–463; und Grierson & Corey, 1988, Plant Molecular Biology, 2. Aus., Blackie, London, Kap. 7–9.

[0069] In einem Expressionssystem für Insekten, welches verwendet werden kann, um die Peptide der Erfindung herzustellen, wird Autographa californica Kernpolyedervirus (AcNPV) als ein Vektor verwendet, um die fremden Gene zu exprimieren. Das Virus wächst in Spodoptera frugiperda Zellen. Eine kodierende Sequenz kann in nicht essentielle Regionen des Virus (zum Beispiel das Polyedergen) kloniert werden und unter Kontrolle eines AcNPV-Promotors (zum Beispiel den Polyeder-Promotor) platziert werden. Erfolgreiche Insertion einer kodierenden Sequenz wird zur Inaktivierung des Polyedergens und zur Erzeugung von nicht verdecktem Virus führen (d. h. Virus, dem die proteinöse Hülle fehlt, die durch das Polyedergen kodiert wird). Diese rekombinanten Viren werden dann verwendet, um Spodoptera frugiperda Zellen zu infizieren, in denen das eingefügte Gen exprimiert wird. (Siehe z. B. Smith et al., 1983, J. Virol. 46: 584; Smith, U.S. Patent Nr. 4.215.051). Weitere Beispiele für dieses Expressionssystem können in Current Protocols in Molecular Biology Vol. 2, Ausubel et al., Hrsg., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, gefunden werden.

[0070] In Säugerwirtszellen können etliche auf viraler Expression beruhende Systeme benutzt werden. In Fällen wo ein Adenovirus als ein Expressionsvektor verwendet wird, kann eine kodierende Sequenz an einen Kontrollkomplex der Transkription/Translation von Adenovirus ligiert werden, z. B. den späten Promotor und die dreiteilige Leadersequenz. Dieses chimäre Gen kann dann durch Rekombination in vitro oder in vivo in das Adenovirusgenom eingefügt werden. Insertion in eine nicht essentielle Region des viralen Genomes (z. B. der Region E1 oder E3) wird zu einem rekombinanten Virus führen, der lebensfähig und in der Lage ist, das Peptid in infizierten Wirten zu exprimieren. (Siehe z. B. Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 81:

3655–3659). Alternativ dazu kann der 7.5 K Promotor von *Vaccinia* verwendet werden (siehe z. B. Mackett et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 7415–7419; Mackett et al., 1984, J. Virol. 49: 857–864; Panicali et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 4927–4931).

[0071] Andere Expressionssysteme für das Erzeugen linearer oder nicht cyclisierter Formen der cyclischen Peptide der Erfindung werden Fachleuten offensichtlich werden.

5.3.3. REINIGUNG DER PEPTIDE UND PEPTIDANALOGA

[0072] Die Peptide und Peptidanaloga der Erfindung können durch auf dem Fachgebiet bekannte Techniken, wie Hochdruckflüssigchromatographie, Ionenaustauscherchromatographie, Gelelektrophorese, Affinitätschromatographie und ähnliches, gereinigt werden. Die aktuellen Bedingungen, um ein bestimmtes Peptid oder Analogon zu reinigen, wird zum Teil von Faktoren, wie Gesamtladung, Hydrophobizität, Hydrophilität, usw. abhängen, und wird Fachleuten offensichtlich werden.

[0073] Zur Reinigung durch Affinitätschromatographie kann jeder Antikörper verwendet werden, der speziell die Peptide und Peptidanaloga bindet. Für die Produktion von Antikörpern können verschiedene Wirtstiere, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Kaninchen, Mäuse, Ratten, usw., durch Injektion mit einem linearen oder cyclischen Peptid immunisiert werden. Das Peptid kann an einen geeigneten Träger, wie BSA, mit Hilfe einer funktionellen Seitenkettengruppe oder Linkern, angelagert an eine funktionelle Seitenkettengruppe, angelagert werden. Verschiedene Adjuvantien, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Freundesches (vollständig oder unvollständig), Mineralgele, wie Aluminiumhydroxid, oberflächenaktive Substanzen, wie Lysolecithin, Pluronic Polyole, Polyanione, Peptide, Ölemulsionen, Hämocyanin der Schlüsseloch-Napfschnecke, Dinitrophenol und potentiell nützliche humane Adjuvantien, wie BCG (Bacilli Calmette-Guerin) und *Corynebacterium parvum*, können, abhängig von der Wirtsspezies, verwendet werden, um die immunologische Reaktion zu steigern.

[0074] Monoklonale Antikörper für ein Peptid können unter Verwendung jeder Technik hergestellt werden, welche für die Erzeugung von Antikörpermolekülen durch kontinuierliche Zelllinien in Kultur sorgt. Diese schließen die ursprünglich von Koehlen und Milstein, 1975, Nature 256: 495–497, beschriebene Hybridoma-Technik, die menschliche B-Zell Hybridoma-Technik, Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4: 72; Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 2026–2030, und die EBV-Hybridoma-Technik (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., S. 77–96 (1985)) ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Zusätzlich können Techniken verwendet werden, die für die Erzeugung von "chimären Antikörpern" entwickelt wurden (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851–6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604608; Takeda et al., 1985, Nature 314: 452–454), wobei Gene eines Antikörpermoleküls aus der Maus mit passender Antigenspezifität zusammen mit Genen aus einem menschlichen Antikörpermolekül mit passender biologischer Aktivität gespleißt werden. Alternativ dazu können für die Erzeugung von Einkettenantikörpern beschriebene Techniken (U.S. Patent Nr. 4.946.778) angepasst werden, um Einkettenantikörper herzustellen, die für cyclisches Peptid spezifisch sind.

[0075] Antikörperfragmente, die Deletionen spezifischer Bindungsstellen enthalten, können durch bekannte Techniken erzeugt werden. Zum Beispiel schließen derartige Fragmente $F(ab')_2$ -Fragmente ein, sind aber nicht darauf beschränkt, die durch Pepsinverdau des Antikörpermoleküls hergestellt werden, und Fab-Fragmente, die durch Reduzierung der Disulfidbrücken der $F(ab')_2$ -Fragmente erzeugt werden können. Alternativ dazu können Fab-Expressionsbanken konstruiert werden (Huse et al., 1989, Science 246: 1275–1281), um eine schnelle und einfache Identifizierung monoklonaler Fab-Fragmente mit der gewünschten Spezifität für das cyclische Peptid von Interesse zu ermöglichen.

[0076] Der Antikörper oder das Antikörperfragment, spezifisch für das gewünschte cyclische Peptid, kann zum Beispiel an Agarose angelagert werden und der Antikörper-Agarosekomplex wird in der Immunchromatographie verwendet, um cyclische Peptide der Erfindung zu reinigen. Siehe Scopes, 1984, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag New York, Inc., NY, Livingstone, 1974, Methods Enzymology: Immunoaffinity Chromatography of Proteins 34: 723–731.

5.4. VERWENDUNGEN DER PEPTIDE UND PEPTIDANALOGA, GESTALTET NACH EINEM MITGLIED DER TNF-R SUPERFAMILIE

[0077] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind für das Hemmen der biologischen Aktivitäten von Liganden für Mitglieder der TNF-R Superfamilie nützlich. Liganden für alle Mitglieder der TNF-R Superfamilie

sind identifiziert und isoliert worden, und sie werden, beruhend auf ihren strukturellen Ähnlichkeiten, ebenfalls in eine Superfamilie klassifiziert. Alle Mitglieder dieser Ligandenfamilie sind in der Lage diverse zelluläre Reaktionen, einschließlich Proliferation, Aktivierung, Differenzierung und selbst Zelltod durch Apoptose oder Cytotoxizität, zu regulieren. Da alle Mitglieder der TNF-R Superfamilie auf Lymphocyten, besonders T-Zellen, exprimiert werden, sind ihre entsprechenden Liganden in der Lage, Immunreaktionen zu regulieren. Ein zweites gewöhnlich gemeinsames Merkmal aller Mitglieder der TNF-Liganden Superfamilie ist ihre Fähigkeit, Zelltod zu induzieren.

[0078] Zur Veranschaulichung: CD40 wird auf B-Zellen exprimiert und das Vernetzen dieses Rezeptors durch seinen Liganden induziert eine B-Zell Aktivierung, einschließlich IgE-Sekretion. Folglich reguliert die Hemmung der CD40 Wechselwirkungen mit seinem Liganden B-Zellreaktionen herunter, und kann verwendet werden, um Autoimmunität und Hypersensitivität zu behandeln. Dagegen vernetzt der Fas-Ligand Fas-Antigen (CD95), exprimiert auf aktivierten T-Zellen und B-Zellen, und induziert Zelltod. Die Hemmung der Wechselwirkungen von Fas-Ligand und Fas-Antigen ist verwendet worden, um Transplantatabstossungen zu verhindern. Der Fas-Ligand ist als ein potientes immunsuppressives Mittel vorgeschlagen worden, beruhend auf der Beobachtung, dass die Expression des Fas-Liganden durch Sertoli Zellen die immunprivilegierte Natur der Testis durch Induzieren der Apoptose von Fas exprimierenden T-Zellen bedingt (Bellgrau et al., 1995, Nature 377: 360). Folglich können Verbindungen der Erfindung, die das Binden von Fas mit seinem Liganden hemmen, verwendet werden, um Immunreaktionen bei bestimmten Einstellungen hinzuzufügen.

[0079] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung hemmt eine Verbindung der Erfindung TNF-Bindung an seine Rezeptoren. Da TNF- α und TNF- β an die gleichen Rezeptoren binden, wird von derartigen Verbindungen erwartet, dass sie die Aktivitäten von sowohl TNF- α als auch TNF- β hemmen. Derartige Verbindungen können für die Behandlung pathologischer Zustände verwendet werden, bei denen die biologischen Aktivitäten von TNF eine aktive Rolle spielen. Derartige Zustände schließen akute und chronische Entzündung, Kachexie, septischen Schock, Graft-versus-Host Erkrankung, Transplantationsabstossung, Hypersensitivität, Immunkomplex Erkrankung, Malaria und Autoimmunität, wie multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, periodontale Erkrankung und nicht-Insulin abhängige Diabetes ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

5.4.1. FORMULIERUNG UND VERABREICHUNGSWEG

[0080] Die Verbindungen der Erfindung können an einen Probanden per se oder in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung verabreicht werden. Pharmazeutische Zusammensetzungen, welche die Verbindungen der Erfindung umfassen, können mit Hilfe von herkömmlichen Mischungs-, Lösungs-, Granulierungs-, Dragee-Herstellungs-, Verreibungs-, Emulgierungs-, Einkapselungs-, Einschluss- und Lyophilisierungsvorgängen hergestellt werden. Pharmazeutische Zusammensetzungen können auf herkömmliche Weise unter Verwendung eines oder mehrerer physiologisch verträglicher Träger, Verdünnungsmittel, Hilfsstoffe und Hilfsmittel, die das Prozessieren der aktiven Peptide oder Peptidanaloga zu Präparationen, die pharmazeutisch verwendet werden können, erleichtern. Die angemessene Formulierung ist vom gewählten Verabreichungsweg abhängig.

[0081] Zur topischen Verabreichung können die Verbindungen der Erfindung als Lösungen, Gele, Salben, Cremes, Suspensionen, usw., wie auf dem Fachgebiet wohlbekannt, formuliert werden.

[0082] Systemische Formulierungen schließen jene ein, die zur Verabreichung durch Injektion, z. B. subkutan, intravenöse, intramuskuläre, intrathekale oder intraperitoneale Injektion gestaltet sind, sowie jene, die für transdermale, transmukosale, orale oder pulmonale Verabreichung gestaltet sind.

[0083] Zur Injektion können die Verbindungen der Erfindung in wässrigen Lösungen, vorzugsweise physiologisch kompatiblen Puffern, wie Hanks-Lösung, Ringer-Lösung oder Puffer aus physiologischer Salzlösung, formuliert werden. Die Lösung kann formulatorische Mittel, wie Suspensions- Stabilisierungs- und/oder Dispergiermittel enthalten.

[0084] Alternativ dazu können die Verbindungen in Pulverform vorliegen, zur Konstitution vor der Verwendung mit einem geeigneten Vehikel, z. B. sterilem pyrogenfreien Wasser.

[0085] Zur transmukosalen Verabreichung werden in der Formulierung für die zu durchdringende Grenze geeignete Durchdringungsmittel verwendet. Derartige Durchdringungsmittel sind im Allgemeinen auf dem Fachgebiet bekannt.

[0086] Zur oralen Verabreichung können die Verbindungen durch das Vereinigen der aktiven Peptide oder Peptidanaloga mit auf dem Fachgebiet wohlbekannten pharmazeutisch verträglichen Trägern leicht formuliert werden. Derartige Träger machen es möglich, die Verbindungen der Erfindung als Tabletten, Pillen, Dragees, Kapseln, Flüssigkeiten, Gele, Sirupe, Aufschlämungen, Suspensionen und ähnliche zur oralen Aufnahme durch einen zu behandelnden Patienten zu formulieren. Für feste orale Formulierungen, wie zum Beispiel Pulver, Kapseln und Tabletten, schließen geeignete Hilfsstoffe Füllmittel, wie Zucker, wie Lactose, Saccharose, Mannitol und Sorbit; Cellulosepräparationen, wie Maisstärke, Weizenstärke, Reisstärke, Kartoffelstärke, Gelatine, Tragacanth-Gummi, Methylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Natrium-Carboxymethylcellulose und/oder Polyvinylpyrrolidon (PVP); Granulierungsmittel; und Bindemittel ein. Falls gewünscht, können Sprengmittel zugegeben werden, wie das vernetzte Polyvinylpyrrolidon, Agar oder Alginsäure oder ein Salz davon, wie Natriumalginat.

[0087] Falls gewünscht, können die festen Dosierungsformen unter Verwendung von Standardtechniken mit Zucker überzogen oder magensaftresistent überzogen werden.

[0088] Für flüssige orale Präparationen, wie zum Beispiel Suspensionen, Elixiere und Lösungen, schließen geeignete Träger, Hilfsstoffe oder Verdünnungsmittel Wasser, Glykole, Öle, Alkohole, usw. ein. Zusätzlich können Aromastoffe, Konservierungsmittel, Farbmittel und ähnliche zugegeben werden.

[0089] Zur buccalen Verabreichung können die Verbindungen die Form von auf herkömmliche Weise formulierten Tabletten, Pastillen, usw. einnehmen.

[0090] Zur Verabreichung durch Inhalation werden die Verbindungen zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung herkömmlich in Form eines Aerosolsprays aus unter Druck stehenden Packungen oder einem Vernebler mit einem geeigneten Treibmittel, z. B. Dichlordifluormethan, Trichlorfluormethan, Dichlortetrafluorethan, Kohlendioxid oder einem anderen geeigneten Gas, abgegeben. Im Fall eines unter Druck stehenden Aerosols kann die Einheit der Dosierung durch das Bereitstellen eines Ventils, um eine festgelegte Menge abzugeben, bestimmt werden. Kapseln und Patronen aus z. B. Gelatine zur Verwendung in einem Inhalationsgerät oder Insufflationsgerät, die eine Pulvermischung der Verbindung und eine geeignete Pulvergrundlage, wie Laktose oder Stärke, enthalten, können formuliert werden.

[0091] Die Verbindungen können ebenfalls in rektalen oder vaginalen Zusammensetzungen, wie Zäpfchen oder Retentionseinläufe, die z. B. herkömmliche Zäpfchengrundlagen, wie Kakaobutter oder andere Glyceride enthalten, formuliert werden.

[0092] Zusätzlich zu den vorher beschriebenen Formulierungen können die Verbindungen ebenfalls als eine Depotpräparation formuliert werden. Derartig lang wirkende Formulierungen können durch Implantation (zum Beispiel subkutan oder intramuskulär) oder durch intramuskuläre Injektion verabreicht werden. Somit können die Verbindungen zum Beispiel mit geeigneten polymeren oder hydrophoben Materialien (zum Beispiel als eine Emulsion in einem verträglichen Öl) oder als Ionenaustauscherharze oder als schwer lösliche Derivate, zum Beispiel als ein schwer lösliches Salz, formuliert werden.

[0093] Alternativ dazu können andere pharmazeutische Abgabesysteme eingesetzt werden. Liposome und Emulsionen sind wohlbekannte Beispiele für Abgabevehikel, die verwendet werden können, um Peptide und Peptidanaloga der Erfindung abzugeben. Bestimmte organische Lösungsmittel wie Dimethylsulfoxid können ebenfalls eingesetzt werden, wenngleich üblicherweise auf Kosten von größerer Toxizität. Zusätzlich können die Verbindungen unter Verwendung eines Systems zur verlängerten Freisetzung, wie semipermeablen Matrizen aus festen Polymeren, die das therapeutische Mittel enthalten, abgegeben werden. Verschiedene Materialien zur verlängerten Freisetzung sind etabliert worden und sind Fachleuten wohlbekannt. Kapseln zur verlängerten Freisetzung können, abhängig von ihrer chemischen Beschaffenheit, die Verbindungen ein paar Wochen lang bis zu über 100 Tage freisetzen. Abhängig von der chemischen Beschaffenheit und der biologischen Stabilität des therapeutischen Reagenz können zusätzliche Strategien zur Protein stabilisierung eingesetzt werden.

[0094] Da die Verbindungen der Erfindung geladene Seitenketten oder Enden enthalten können, können sie in jeder der vorstehend beschriebenen Formulierungen als freie Säuren oder Basen oder als pharmazeutisch verträgliche Salze eingeschlossen werden. Pharmazeutisch verträgliche Salze sind jene Salze, die im Wesentlichen die antimikrobielle Aktivität der freien Basen behalten, und die durch Reaktion mit anorganischen Säuren hergestellt werden. Pharmazeutische Salze neigen dazu, in wässrigen oder anderen protischen Lösungsmitteln löslicher zu sein als die entsprechenden freien Basenformen.

5.4.2. WIRKSAME DOSIERUNGEN

[0095] Die Verbindungen der Erfindung werden im Allgemeinen in einer Menge verwendet, die wirksam ist, um den beabsichtigten Zweck zu erreichen. Für die Verwendung, um mit TNF-assoziierte Störungen zu behandeln oder zu verhindern, werden die Verbindungen der Erfindung oder pharmazeutische Zusammensetzungen davon in einer therapeutisch wirksamen Menge verabreicht oder angewendet. Mit therapeutisch wirksamer Menge ist eine Menge gemeint, welche die Symptome verbessert oder verhindert, oder das Überleben des Patienten, der behandelt wird, verlängert. Bestimmung der therapeutisch wirksamen Menge liegt völlig innerhalb der Fähigkeiten von Fachleuten, besonders angesichts der hier bereitgestellten detaillierten Offenbarung.

[0096] Zur systemischen Verabreichung kann eine therapeutisch wirksame Dosis zunächst aus in vitro Assays abgeschätzt werden. Eine Dosis kann zum Beispiel in Tiermodellen formuliert werden, um einen zirkulierenden Konzentrationsbereich zu erreichen, der die IC_{50} , wie in einer Zellkultur bestimmt, einschließt (d. h. die Konzentration einer Testverbindung, die 50 % der TNF-R:TNF-Bindungswechselwirkungen hemmt). Eine derartige Information kann verwendet werden, um nützliche Dosen bei Menschen genauer zu bestimmen.

[0097] Anfangsdosierungen können ebenfalls aus in vivo Daten, z. B. Tiermodellen, unter Verwendung von Techniken, abgeschätzt werden, die auf dem Fachgebiet wohlbekannt sind. Einer mit normalem Fachwissen könnte die Verabreichung an Menschen, beruhend auf Tierdaten, leicht optimieren.

[0098] Dosierungsmenge und -abstand kann individuell eingestellt werden, um Plasmaspiegel der Verbindungen bereitzustellen, die ausreichend sind, um eine therapeutische Wirkung aufrechtzuerhalten. Übliche Dosierungen für einen Patienten zur Verabreichung durch Injektion reichen von etwa 0,1 bis 5 mg/kg/Tag, vorzugsweise von etwa 0,5 bis 1 mg/kg/Tag. Therapeutisch wirksame Serumspiegel können durch das Verabreichen mehrerer Dosen jeden Tag erreicht werden.

[0099] In Fällen von lokaler Verabreichung oder selektiver Aufnahme kann die wirksame lokale Konzentration der Verbindungen der Plasmakonzentration nicht entsprechen. Ein Fachmann wird in der Lage sein, therapeutisch wirksame lokale Dosierungen ohne übermäßiges Experimentieren zu optimieren.

[0100] Die Menge der verabreichten Verbindung wird natürlich abhängig sein von dem Probanden, der behandelt wird, dem Gewicht des Probanden, dem Schweregrad des Leidens, der Verarbeitungsweise und dem Urteil des behandelnden Arztes. Die Therapie kann mit Unterbrechungen wiederholt werden, solange Symptome nachweisbar oder sogar wenn sie nicht nachweisbar sind.

[0101] Die Therapie kann allein oder in Kombination mit anderen Arzneistoffen bereitgestellt werden. Im Fall von mit TNF-assoziierten Störungen können die Arzneistoffe, die in Kombination mit den Verbindungen der Erfindung verwendet werden, steriode und nicht steriode entzündungshemmende Mittel einschließen, sind aber nicht darauf beschränkt.

5.4.3. TOXIZITÄT

[0102] Vorzugsweise wird eine therapeutisch wirksame Dosis der hier beschriebenen Verbindungen einen therapeutischen Vorteil ohne erhebliche Toxizität zu verursachen bereitstellen.

[0103] Eine Toxizität der hier beschriebenen Verbindungen kann mit pharmazeutischen Standardverfahren in Zellkulturen oder Versuchstieren, z. B. durch das Bestimmen der LD_{50} (die Dosis, die für 50 % der Population letal ist) oder der LD_{100} (die Dosis, die für 100 % der Population letal ist) bestimmt werden. Das Dosisverhältnis zwischen toxischer und therapeutischer Wirkung ist der therapeutische Index. Verbindungen, die hohe therapeutische Indizes zeigen werden bevorzugt. Die aus diesen Zellkulturassays und Studien mit Versuchstieren erhaltenen Daten können beim Formulieren eines Dosisbereichs, der für die Verwendung bei Menschen nicht toxisch ist, verwendet werden. Die Dosierungen der hier beschriebenen Verbindungen liegen vorzugsweise innerhalb eines Bereichs zirkulierender Konzentrationen, der die wirksame Dosis mit geringer oder keiner Toxizität einschließt. Die Dosierung kann innerhalb dieses Bereichs abhängig von der angewandten Dosierungsform und dem Verabreichungsweg variieren. Die genaue Formulierung, Verabreichungsweg und -dosierung kann durch den einzelnen Arzt angesichts des Zustands des Patienten gewählt werden. (Siehe z. B. Fingl et al., 1975, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Kap. 1, S.1).

[0104] Nachdem die Erfindung beschrieben worden ist, werden die folgenden Beispiele als Veranschaulichung und nicht zur Beschränkung angeführt.

6. BEISPIEL: EXOCYCLISCHE PEPTIDE, ABGELEITET VON TNF-R, DIE FÜR DIE TNF- α AKTIVITÄTEN ANTAGONISTISCH SIND

6.1. MATERIALEN UND VERFAHREN

6.1.1. REAGENZIEN

[0105] Rekombinantes menschliches TNF- α und das ^{125} I-markierte TNF- α wurden von Amersham Life Science, Inc. (Arlington Heights, IL) erhalten. TNF-R(I) oder das chimäre Protein aus extrazellulärer Domäne p55-IgG schwere Kette wurde durch Expression eines cDNA Konstrukts (Peppel et al., 1991, J. Exp. Med. 174: 1483; Williams et al., 1995, Immunol. 84: 433) hergestellt. Monoklonaler anti-TNF- α Antikörper wurde gemäß Doring et al. (1994, Molecular Immunol. 31: 1059) hergestellt und monoklonaler anti-TNF-R(I) Antikörper (htr-9) wurde von BMA Biomedicals AG (Augst, Schweiz) erhalten.

6.1.2. MOLEKULARES MODELLING

[0106] Computermodellierung wurde unter Verwendung von Quanta 4,0 (Molecular Simulation Inc., MA) durchgeführt. Die Modellpeptide wurden nach ihren Sequenzen konstruiert und unter Verwendung von CHARMM gefaltet. Die Seitenketten von Aminosäureresten wurden zuerst in einer erlaubten Konformation positioniert, unter Verwendung der in QUANTA bereitgestellten Ponders Rotamer (Ponder et al., 1987, J. Mol. Biol. 193: 775–791) Datenbank. Dann wurden die gefalteten Peptide in Konvergenz mit einer auf 80 gesetzten dielektrischen Konstante verkleinert. Die Kristallstruktur des TNF- β /TNF-R(I)-Komplex (Banner et al., 1993, Cell 73: 431) wurde benutzt, um die Bindungsstellen von TNF-R für TNF- α zu bestimmen. Die erste (56–73) und zweite (76–83) Schleife der Domäne 2 und die erste Schleife (107–114) der Domäne 3 des TNF-R wurden für die Verwendung beim Gestalten von Peptiden erforscht. Die wesentlichen Aminosäuresequenzen von TNF-R Bindungswechselwirkungen mit TNF- α wurden als strukturelle Matrizen durch Übereinanderlegen von TNF- α auf TNF- β , der mit seinem zugehörigen Rezeptor komplexiert war, identifiziert. Dann wurden von TNF-R abgeleitete 5–8 Aminosäuren lange Peptide, wie in Tabelle 2 gezeigt, als Matrizen für die Gestaltung exocyclischer Peptide verwendet. Zusätzliche Peptide wurden von CDR Sequenzen einer leichten Kette eines neutralisierenden anti-TNF- α Antikörpers, CDR1L von Di62 (Doring et al., 1994, Mol. Immunol. 31: 1059) abgeleitet. Exocyclische Modifikationen, wie Peptidcyclisierung und Addition aromatischer Aminosäuren, wie Phe und Tyr, an die Enden von jedem Peptid wurden, wie beschrieben, durchgeführt (Zhang et al., 1996, Nature Biotech. 14: 472; Zhang et al., 1997, Nature Biotech. 15: 150).

6.1.3. PEPTIDSYNTHESE, CYCLISIERUNG UND REINIGUNG

[0107] Lineare Peptide wurden durch Festphasen-Verfahren synthetisiert, geschützt und aus dem Harz freigesetzt, wobei Standardmethodologie benutzt wird. Peptide wurden präzipitiert und durch Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) unter Benutzung einer C18-Säule gereinigt und dann lyophilisiert. Der Reinheitsgrad derartiger Peptide war, wie durch HPLC Analyse gemessen, größer als 95 %.

[0108] Die Peptide, die interne Cys-Reste enthalten, wurden oxidiert, indem sie bei 100 μ g/ml in destilliertem Wasser, das auf pH 8,0–8,5 eingestellt oder durch zum Beispiel $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, gepuffert war, unter Rühren und der Luft aussetzen bei 4°C für < 10 Tage gelöst wurden, bis eine 95 %ige Bildung intramolekularer Disulfidbrücken durch DTNB (Sigma, St. Louis, MO), welches freie Sulfhydryle in Peptiden bestimmte, bestätigt worden war (Habeeb, 1973, Anal. Bioch. 56: 60; Angeletti et al., 1996, In: Techniques in Protein Chemistry VII, Hrsg. Marsak, Academic Press, San Diego, CA, S. 81–91). Kurz gesagt: Peptide (100 μ g/ml, 50 μ l) und DTNB (10 mM, 50 μ l) wurden in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 8,0, 1 ml) gegeben, im Dunkeln 30 Minuten lang inkubiert und die Absorption wurde bei 420 nm bestimmt und mit den linearen nicht oxidierten Peptiden verglichen.

[0109] Die cyclisierten Peptide wurden lyophilisiert, durch HPLC unter Benutzung einer präparativen C18-Säule und einer Größenausschluss-Protein-Pak 60 Säule (Waters, Milford, MA) gereinigt. Vom Reinheitsgrad der Peptide wurde gezeigt, dass er laut HPLC Analyse größer als 95 % war. Die Konzentration jedes cyclisierten Peptids wurde beruhend auf der UV Intensität, im Vergleich zu dem entsprechenden linearen Peptid laut HPLC Analyse berechnet.

6.1.4. KOMPETITIVER RADIOREZEPTOR-ASSAY

[0110] Chimäres TNF-R-IgG Protein (100 ng/ml), verdünnt in 100 μ l mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS), wurde auf MicroTest III flexiblen Assay-Platten (Becton Dickinson, San Jose, CA) durch Inkubation bei

4°C über Nacht immobilisiert. Nach 2 Std. langem Blockieren mit PBS, das 1 % Rinderserumalbumin (BSA) enthält, bei Raumtemperatur und anschließendem Waschen mit PBS, das 0,1 % Tween 20 (PBS-Tw) enthält, wurde ^{125}I -markiertes TNF- α (1 ng) mit der Peptidlösung (100 μl) in PBS 1 Std. lang bei 37°C vorinkubiert, und zu den mit TNF-R beschichteten Vertiefungen gegeben. Nach 2 Std. langer Inkubation bei 37°C wurden die Platten mit PBS-Tw gewaschen, und gebundene Radioaktivität wurde mit einem Cobra Gamma-Zählgerät (Packard Instruments, Meriden, CT) gemessen.

6.1.5. DURCHFLOSS-CYTOMETRIE

[0111] Eine menschliche Leukämie-Zelllinie, U937, wurde in RPMI-1640 Medium, angereichert mit 10 % FCS, aufrechterhalten. Um die Bindung von TNF- α an seinen zugehörigen auf U937-Zellen exprimierten Rezeptor zu quantifizieren, wurden 1×10^5 Zellen in PBS, das 0,5 % BSA und 0,05 % NaN_3 enthält (Bindepuffer), wieder aufgenommen. TNF- α (2,5 ng) wurde mit einer Peptidlösung (50 μl) in PBS 1 Std. lang bei 37°C vorinkubiert und wurde dann 1 Std. lang bei 4°C bei einer TNF- α -Endkonzentration von 50 ng/ml zu den Zellen gegeben. Dann wurden 50 μl eines anti-TNF-Rezeptor Antikörpers mit 3 $\mu\text{g/ml}$ in Bindepuffer 1 Std. lang bei 4°C zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden in Bindepuffer gewaschen und mit 50 μl (10 $\mu\text{g/ml}$) mit Fluorescein-konjugiertem sekundären Ziege anti-Maus Antikörper (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) 30 min. lang bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen in Bindepuffer wurden die Zellen unter Verwendung eines FACScan Durchflussscytometers (Becton Dickinson) analysiert. Die Gates wurden auf die lebende Zellpopulation eingestellt, und der Hemmungsgrad TNF- α /Zellbindung durch Peptide wurde auf Grundlage von Mittelwerten von jedem Histogramm berechnet.

6.1.6. CYTOTOXIZITÄTSASSAY

[0112] Eine Fibroblasten-Zelllinie aus der Maus, L929, wurde in Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium, angereichert mit 10 % FCS, aufrechterhalten, und das Medium wurde mit serumfreiem AIM-V Medium (GIBCO BRL) kurz bevor die Zellen für den Cytotoxizitäts-Assay verwendet wurden, ersetzt. L929-Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen angeimpft, und 20 Std. lang bei 37°C unter 5 % CO_2 in der Luft inkubiert. TNF- α (7 pg) wurde 1 Std. lang bei 37°C mit einer Peptidlösung (80 μl) in PBS vorinkubiert, und wurde zu den Zellen gegeben, die 2 Std. lang mit Actinomycin D (ACT-D) mit 1 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert worden waren. Die Zellen wurden mit auf eine Endkonzentration von 50 pg/ml eingestelltem TNF- α 7 Std. lang bei 37°C unter 5 % CO_2 inkubiert, und mit MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyltetrazoliumbromid) (Sigma) (Hansen et al., 1989, J. Immunol. Methods 119: 203) gefärbt. Kurz gesagt: 10 μl einer 10 mg/ml Lösung MTT wurde zu jeder Vertiefung für 2 Std. bei 37°C gegeben, und die Farbe des Produktes Formazan wurde durch eine Inkubation über Nacht bei 37°C mit 100 μl Extraktionspuffer (20 % SDS in 50 % DMF, pH 4,7) entwickelt. Die optische Dichte des farbigen Formazan wurde bei 600 nm gemessen.

6.1.7. PHOSPHORYLIERUNG VON IRS-1 IN ADIPOCYTEN

[0113] Man ließ 3T3-L1-Zellen wachsen und zu Adipocyten differenzieren, wie vorher beschrieben (Garcia de Herreros et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 19994). Nach maximaler Differenzierung (mindestens 90 % der Zellen differenzierten), ließ man die Zellen in 0,2 % BSA 1 Tag lang hungern, und dann wurden sie 4 Std. lang bei 37°C ohne CO_2 mit TNF- α bei einer Konzentration von 50 ng/ml in Leibovitz L-15 Medium/PBS (2 ml/2 ml) behandelt. Bei bestimmten Proben wurden Peptide 1 Std. lang bei 37°C mit TNF- α in PBS vorinkubiert, bevor das Gemisch zu den hungernden Adipocyten gegeben wurde. Die Zellen wurden dann 3 min. lang mit Insulin (100 nM) stimuliert, in eiskaltem PBS gewaschen und dann in Lysepuffer solubilisiert (50 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 mM Na_3VO_4 , 100 mM NaF, 1 % Triton X-100 (Vol./Vol.), 10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid). IRS-1 wurde aus den Zellextrakten (1 ml) mit einem anti-IRS-1 Antiserum (5 μl , über Nacht bei 4°C) und Protein A Sepharose (Sigma) mit 20 μl Bettvolumen 1 Std. lang bei 4°C immunpräzipitiert. Nach drei Waschungen in 50 mM Hepes Puffer (pH 7,4), der 1 % Triton X-100 (Vol./Vol.), 0,1 % SDS und 150 mM NaCl einschließt, wurden die immunpräzipitierten Proteine in Laemmli Probenpuffer 3 min. lang gekocht, und auf 6 % SDS-PAGE aufgetrennt. Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, und eine Westernblotanalyse wurde unter Verwendung des ECL Westernblot-Kit (Amersham) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Membran wurde zuerst mit einem anti-phosphorylierten Tyr Antikörper (1: 20.000), gekoppelt an einen markierten sekundären Antikörper, untersucht, dann abgestreift und mit einem anti-IRS-1 Antiserum (1: 1.000) erneut untersucht. Die Intensität jeder Bande wurde mit einem Image Quanta Densitometer (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) analysiert, und die Reduktion der TNF- α induzierten Insulinresistenz durch Peptide wurde nach Abziehen der Hintergrundintensität von jeder Bande berechnet.

6.2. ERGEBNISSE

[0114] Aminosäuresequenzen, die den drei TNF- α Bindungsschleifen entsprechen, wurden als Matrizen für die Synthese etlicher Peptide verwendet. Cys-Reste wurden in die linearen Peptide eingeschlossen, um ihre Cyclisierung zu ermöglichen. Ihre Identität wurde durch Massenspektrometrie nachgewiesen.

[0115] Verschiedene in Tabelle 2 aufgelistete exocyclische Peptide wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die Bindung von radiomarkiertem TNF- α an chimäres TNF-R Protein zu hemmen. [Abb. 2](#) zeigt, dass, obwohl Peptide, die nach drei getrennten Schleifenbereichen von TNF-R gestaltet waren, bei einer Konzentration von 25 μ M, TNF- α Bindung an TNF-R hemmten, Peptide, die nach Schleife 1 der Domäne 3 (WP9 Serie) von TNF-R gestaltet waren, stärker hemmende Wirkungen aufwiesen als es die Peptide taten, die aus Schleife 1 der Domäne 2 (WP5 Serie) und Schleife 2 der Domäne 2 (WP8 Serie) gestaltet waren. Die WP5 Peptidserie wurde durch das Vergleichen der Strukturen der Schleifen von TNF-R- und CDR1 eines anti-TNF-Antikörpers entwickelt. Modifikationen der WP5 Peptide von Ala zu Asn, steigerten ihre hemmenden Aktivitäten, allerdings führten ähnliche Modifikationen der WP8 Peptide nicht zu derartigen Wirkungen.

[0116] Schleife 1 der Domäne 3 von TNF-R wurde als eine Matrize verwendet, um ein Peptid zu gestalten, welches Gln anstelle eines geladenen Restes Glu (WP9Q) enthielt. Wenn das Peptid WP9Q im kompetitiven Radiorezeptor-Assay getestet wurde, zeigte es eine 2-fach höhere Aktivität als die besten WP5 Peptide. Weiter modifizierte WP9 Peptide wurden in einer Dosis-Wirkungsstudie verglichen, und von dem Peptid WP9QY wurde gezeigt, dass es die stärksten hemmenden Aktivitäten mit einer IC_{50} bei 5 μ M zeigt ([Abb. 3](#)). Das Peptid WP9QY wurde aus WP9Q durch das Ersetzen von Asn in WP9Q mit Tyr modifiziert, was Rezeptorwechselwirkungen mit TNF- α mittels Trp und Gln, bei denen es sich um entscheidende Reste für seine Bindung an den Rezeptor handelt, verbesserte. Eine kompaktere Gestalt von WP9QY als die von anderen WP Peptiden schien auch die Wechselwirkungen von WP9QY mit TNF- α zu steigern, wie durch seine langsamere Elution von einer Größenausschluss-Säule an HPLC ([Abb. 4](#)) nahe gelegt wird.

Tabelle 2

Aminosäuresequenzen von TNF- α Bindungsstellen in TNF-R und exocyclische Peptide, abgeleitet von diesen Stellen.

TNF- α Bindungsstellen im Rezeptor	Exocyclische Peptide*
Bindungsstelle - 5	

TNF- α	WP5 YC FTASENH CY
53E 82R 85VSY87 125Q 127E	WP5N YC FTNSENH CY
	WP5R YC FTRSENH CY
Rezeptor (Schleife 1 der Domäne 2)	WP5J FC ASENH CY
60 FTASENH 66	WP5JY YC ASENH CY
	WP5JN FC NSENH CY
	WP5JR FC NSENR CY
	WP5VR FC NSVENR CY
	WP1** YC SQSVSND CF
	WP1R** FC VSNDR CY

Bindungsstelle - 8

TNF- α	
65K 67Q 113P 115Y 143L 145A	WP8L YC RKELGQV CY
Rezeptor (Schleife 2 der Domäne 2)	WP8JP YC KEPGQ CY
76 CRKEMGQV 83	WP8J YC RKEMG CY
	WP8JF FC RKEMG CY

Bindungsstelle - 9

TNF- α	
72THVL75 77T 97I 137 N	WP9Q YC WSQNL CY
Rezeptor (Schleife 1 der Domäne 3)	WP9ELY YCELSQYL CY
107 WSENL 111	WP9Y YC WSQNY CY
	WP9QY YC WSQYL CY

* Peptide wurden mit Cystein-Disulfidbrücken cyclisiert

** WP1 und WP1R wurden von einem anti-TNF- α Antikörper (Di62,

CDR1L) abgeleitet und bei der Sequenz der Matrize handelt es sich um

QSVSNDV.

[0117] U937 Zellen, die hohe Spiegel an TNF-R p55 exprimieren, wurden mit TNF- α mit oder ohne Peptide inkubiert. Die Bindung von TNF- α an die Zellen wurde mit einem anti-TNF-R Antikörper quantifiziert, gefolgt von einer FACS-Analyse. [Abb. 5](#) demonstriert, dass obwohl signifikante Bindung des anti-Rezeptor Antikörpers an U937 Zellen beobachtet wurde, es eine 70 % Reduktion dieser Bindung durch Vorbehandlung der Zellen mit TNF- α gab. Die Zugabe des Peptids WP9QY verursachte, dass die anti-Rezeptorfärbung auf einen Spiegel zurückgeht, der dem mit anti-Rezeptor Antikörper allein ähnelt. Wenn ein ähnliches Experiment in einem Dosis-Wirkungs-Assay durchgeführt wurde, zeigte das Peptid WP9QY wieder die höchste hemmende Aktivität im Vergleich zu den Peptiden WP9Q und WP5JY ([Abb. 6](#)). Das Peptid WP9QY hemmte die Bindung von TNF- α an seinen zellulären Rezeptor mit einer IC_{50} bei 75 μ M.

[0118] Zusätzlich wurden die Peptide auf ihre Fähigkeit getestet, die biologischen Wirkungen zu hemmen, die durch TNF- α in TNF empfindlichen L929 Zellen (Hennet et al., 1993, Biochem. J. 289: 587–592) induziert werden. TNF- α induzierte Apoptose/Cytotoxizität von L929 Zellen, und das Peptid WP9QY schützte bei einer Konzentration von 75 μ M fast 90 % der Zellen gegen derartige TNF- α Wirkungen (Abbildung 7). WP9Q zeigte eben-

falls eine Dosis abhängige hemmende Aktivität, die etwa der Hälfte der Wirkungen von WP9QY entsprach.

[0119] Vorherige Studien haben gezeigt, dass die Fibroblasten Zelllinie 3T3-L1 unter geeigneten Kulturbedingungen eine Differenzierung zu Adipocyten durchmacht, und dass differenzierte Zellen eine gesteigerte Sensitivität gegen Insulin entwickeln (Garcia de Herreros et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 19994). Die Reaktion auf Insulinstimulierung in diesen Zellen kann in geeigneter Weise durch Tyrosinphosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrats 1 (IRS-1) gemessen werden. Es ist gezeigt worden, dass die Zugabe von TNF- α die Insulin induzierte Phosphorylierung dieses Substrats verringert, was nahe legt, dass TNF- α eine Rolle bei der durch Obesitas induzierten Insulinresistenz spielen kann (Kanety et al., 1995, J. Biol. Chem. 270: 23780).

[0120] Das Peptid WP9QY wurde auf seine Fähigkeit getestet TNF- α induzierte Insulinresistenz zu hemmen. 3T3-L1-Zellen wurden induziert, um zu Adipocyten zu differenzieren, mit Insulin stimuliert, und die Tyr-Phosphorylierung von IRS-1 wurde durch Immunpräzipitation der Zellextrakte mit anti-IRS-1 Antiserum, gefolgt von einer Westernblotanalyse mit einem anti-phosphorylierten Tyr Antikörper, analysiert. [Abb. 8A](#) zeigt, dass phosphoryliertes IRS-1 in Zellen nachgewiesen wurde, die mit 100 nM Insulin stimuliert waren. Wenn dagegen TNF- α (50 ng/ml) vor dem Insulin zu den Zellen gegeben wurde, war die gleiche IRS-1 Bande nicht nachweisbar, was bestätigt, dass TNF- α die Insulinstimulierung der Tyr-Phosphorylierung von IRS-1 hemmte. Wenn jedoch das Peptid WP9QY mit TNF- α vorinkubiert wurde, dann ist es in einer dosis abhängigen Weise für die TNF- α -Wirkungen antagonistisch, wie durch das Wiedererscheinen der phosphorylierten IRS-1 Bande, als die Konzentrationen des Peptids stiegen, bewiesen wurde. [Abb. 8B](#) demonstriert, dass IRS-1 in allen getesteten Proben vorlag.

[0121] Zum Schluss: Peptide, die von bestimmten Schleifenstrukturen von TNF-R abgeleitet sind, hemmen die Bindung von TNF- α auf Zelloberflächen an TNF-R, was anzeigt, dass diese Schleifen den Bindungsstellen von TNF-R an seine Liganden entsprechen. Die Peptide sind ebenfalls beim Verhindern der Induktion von Apoptose/Cytotoxizität und Insulinresistenz in Zielzellen antagonistisch für die biologischen Wirkungen von TNF- α . Bedeutend ist, dass das wirksamste Peptid von Schleife 1 der Domäne 3 von TNF-R abgeleitet ist, was eine kritische Bindungsstelle zwischen TNF-R und TNF- α Wechselwirkungen darstellen kann. [Abb. 9](#) legt ein dreidimensionales Modell der Wechselwirkungen von TNF- α (rechte Seite) und TNF-R (linke Seite) vor. Der in dunkler Farbe dargestellte Anteil der Schleifenstruktur in TNF-R stellt die Lage der Schleife 1 der Domäne 3 dar.

[0122] Die vorliegende Offenbarung soll durch die beispielhaften Ausführungsformen, die zur Veranschaulichung einzelner Aspekte der Offenbarung gedacht sind, nicht im Geltungsbereich beschränkt werden und jedwede Sequenzen, die funktionell gleichwertig sind, sind innerhalb des Geltungsbereichs. Gewiss werden verschiedene Modifikationen zusätzlich zu den hierin gezeigten und beschriebenen Fachleuten aus der vorhergehenden Beschreibung und den begleitenden Abbildungen deutlich werden.

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE INFORMATION

(i) ANTRAGSTELLER: Greene, Mark I. Murali, Ramachandran Takasaki, Wataru

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: PEPTIDE UND PEPTIDANALOGA, GESTALTET
NACH BINDUNGSSTELLEN DER TUMORNEKOSE-FAKTOR-REZEPTOR
SUPERFAMILIE, UND DEREN VERWENDUNGEN

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 27

(iv) ADRESSE FÜR DEN SCHRIFTVERKEHR:

(A) ADRESSE: Pennie & Edmonds LLP

(B) STRASSE: 1155 Avenue of the Americas

(C) STADT: New York

(D) STAAT: NY

(E) LAND: USA

(F) PLZ: 10036-2811

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

- (A) MEDIUM: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: DOS
- (D) COMPUTERPROGRAMM: FastSEQ Version 2.0

(vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

- (A) NUMMER DER ANMELDUNG: 08/866,545
- (B) DATUM DER ANMELDUNG: 30. MAI 1997
- (C) KLASSIFIKATION:

(vii) DATEN DER VORANMELDUNG:

- (A) ANTRAGSNUMMER:
- (B) ANTRAGSDATUM:

(viii) INFORMATION ZUM ANWALT/AGENT:

- (A) NAME: Coruzzi, Laura A
- (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 30,742
- (C) REFERENZ/REGISTER-NUMMER: 009113-0004-999

(ix) INFORMATION ZUR TELEKOMMUNIKATION:

- (A) TELEPHON: 650-493-4935
- (B) TELEFAX: 650-493-5556
- (C) TELEX: 66141 PENNIE

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 74 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

```

Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His
 1           5           10           15
Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln
                20           25           30
Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys
                35           40           45
Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys
    50           55           60
Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr
65           70

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 77 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäuren
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

```

Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp
 1           5           10           15
Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val
                20           25           30
Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg
                35           40           45
Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys
    50           55           60
Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
65           70           75

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 77 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

```

Val Cys Ala Thr Cys Ala Glu Asn Ser Tyr Asn Glu His Trp Asn Tyr
 1      5      10      15
Leu Thr Ile Cys Gln Leu Cys Arg Pro Cys Asp Pro Val Met Gly Leu
      20      25      30
Glu Glu Ile Ala Pro Cys Thr Ser Lys Arg Lys Thr Gln Cys Arg Cys
      35      40      45
Gln Pro Gly Met Phe Cys Ala Trp Ala Leu Glu Cys Thr His Cys
      50      55      60
Glu Leu Leu Ser Asp Cys Pro Pro Gly Thr Glu Ala Glu
65      70      75

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 76 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

```

Cys Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala
 1      5      10      15
Thr Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met
      20      25      30
Ser Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr
      35      40      45
Gly Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val
      50      55      60
Cys Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln
65      70      75

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 53 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

```

Gln Cys Asp Pro Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His
 1      5      10
Thr Arg Pro His Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu
      20      25      30
Val Arg Asn Cys Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn
      35      40      45
Gly Trp Gln Cys Arg
    50

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 74 Aminosäuren
- (A) ART: Aminosäure
- (B) STRANGFORM: Einzelstrang
- (C) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

```

Cys Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Asp Arg
 1      5      10      15
Cys Thr Ala Cys Val Thr Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr
      20      25      30
Pro Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Val Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met
      35      40      45
Phe Cys Ser Thr Ser Ala Val Asn Ser Cys Ala Arg Cys Phe Phe His
      50      55      60
Ser Val Cys Pro Ala Gly Met Ile Val Lys
    65      70

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 74 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

```

Cys Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Gly Arg
1      5      10      15
Cys Thr Ala Cys Val Ser Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr
20      25      30
Pro Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Thr Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met
35      40      45
Ile Cys Ala Thr Ser Ala Thr Asn Ser Cys Ala Arg Cys Val Pro Tyr
50      55      60
Pro Ile Cys Ala Ala Glu Thr Val Thr Lys
65      70

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 75 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

```

Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg
1      5      10      15
Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu
20      25      30
Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys
35      40      45
Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu
50      55      60
His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys
65      70      75

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

```

Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
 1      5      10      15
Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
 20      25      30
Leu Glu

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 56 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

```

Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys
 1      5      10      15
Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg
 20      25      30
Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala
 35      40      45
Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr
 50      55

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 69 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

Cys 1	Ser	Pro	Cys 5	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser 10	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln 15	Arg
Thr	Cys	Asp	Ile 20	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys 25	Gly	Val	Phe	Arg	Thr 30	Arg	Lys
Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala 40	Glu	Cys	Asp	Cys	Thr 45	Pro	Gly	Phe
His	Cys 50	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys 55	Ser	Met	Cys	Glu	Gln 60	Asp	Cys	Lys	Gln
Gly 65	Gln	Glu	Leu	Thr											

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

Tyr 1	Cys	Glu	Leu	Ser 5	Gln	Tyr	Leu	Cys	Tyr 10
----------	-----	-----	-----	----------	-----	-----	-----	-----	-----------

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

Tyr 1	Cys	Trp	Ser	Gln 5	Asn	Leu	Cys	Tyr
----------	-----	-----	-----	----------	-----	-----	-----	-----

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

Tyr Cys Trp Ser Gln Asn Tyr Cys Tyr
 1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

Tyr Cys Trp Ser Gln Tyr Leu Cys Tyr
 1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

Tyr Cys Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

Tyr Cys Phe Thr Asn Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:

Tyr Cys Phe Thr Arg Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:19:

Phe Cys Ala Ser Glu Asn His Cys Tyr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:20:

Tyr Cys Ala Ser Glu Asn His Cys Tyr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:21:

Phe Cys Asn Ser Glu Asn His Cys Tyr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:22:

Phe Cys Asn Ser Glu Asn Arg Cys Tyr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:23:

Phe Cys Asn Ser Val Glu Asn Arg Cys Tyr
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:24:

Tyr Cys Arg Lys Glu Leu Gly Gln Val Cys Tyr
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:25:

Tyr Cys Lys Glu Pro Gly Gln Cys Tyr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:26:

Tyr Cys Arg Lys Glu Met Gly Cys Tyr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:27:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:27:

Phe Cys Arg Lys Glu Met Gly Cys Tyr
1 5

SEQUENZLISTE

<110> THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

<120> PEPTIDANALOGA, ABGELEITET VOM TUMORNEKROSE-FAKTOR-REZEPTOR

<130> P023476EP

<140> EP 98923839.9

<141> 29.05.1998

<150> US 08/866545

<151> 30.05.1997

<160> 30

<170> SeqWin99, Version 1.02

<210> 1

<211> 74

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His
 1           5           10
Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln
          20           25           30
Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys
          35           40           45
Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys
 50           55           60
Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr
65           70

```

<210> 2

<211> 77

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp
 1           5           10           15
Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val
          20           25           30
Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg
          35           40           45
Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys
 50           55           60
Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
65           70           75

```

<210> 3

<211> 77

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Val Cys Ala Thr Cys Ala Glu Asn Ser Tyr Asn Glu His Trp Asn Tyr
 1      5      10      15
Leu Thr Ile Cys Gln Leu Cys Arg Pro Cys Asp Pro Val Met Gly Leu
      20      25      30
Glu Glu Ile Ala Pro Cys Thr Ser Lys Arg Lys Thr Gln Cys Arg Cys
      35      40      45
Gln Pro Gly Met Phe Cys Ala Ala Trp Ala Leu Glu Cys Thr His Cys
      50      55      60
Glu Leu Leu Ser Asp Cys Pro Pro Gly Thr Glu Ala Glu
65      70      75

```

<210> 4

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Cys Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala
 1      5      10      15
Thr Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met
      20      25      30
Ser Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr
      35      40      45
Gly Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val
      50      55      60
Cys Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln
65      70      75

```

<210> 5

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

Gln Cys Asp Pro Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His
 1      5      10      15
Thr Arg Pro His Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu
      20      25      30
Val Arg Asn Cys Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn
      35      40      45
Gly Trp Gln Cys Arg
      50

```

<210> 6

<211> 74

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

Cys Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Asp Arg
 1      5      10      15
Cys Thr Ala Cys Val Thr Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr
 20      25      30
Pro Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Val Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met
 35      40      45
Phe Cys Ser Thr Ser Ala Val Asn Ser Cys Ala Arg Cys Phe Phe His
 50      55      60
Ser Val Cys Pro Ala Gly Met Ile Val Lys
65      70

```

<210> 7
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

```

Cys Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Gly Arg
 1      5      10      15
Cys Thr Ala Cys Val Ser Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr
 20      25      30
Pro Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Thr Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met
 35      40      45
Ile Cys Ala Thr Ser Ala Thr Asn Ser Cys Ala Arg Cys Val Pro Tyr
 50      55      60
Pro Ile Cys Ala Ala Glu Thr Val Thr Lys
65      70

```

<210> 8
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

```

Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg
 1      5      10      15
Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu
 20      25      30
Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys
 35      40      45
Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu
 50      55      60
His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys
65      70      75

```

<210> 9
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

```

Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
 1           5           10           15
Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
          20           25           30
Leu Glu

```

<210> 10

<211> 56

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys
 1           5           10           15
Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg
          20           25           30
Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala
          35           40           45
Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr
          50           55

```

<210> 11

<211> 69

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg
 1           5           10           15
Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys
          20           25           30
Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe
          35           40           45
His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln
          50           55           60
Gly Gln Glu Leu Thr
          65

```

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 12

Tyr Cys Glu Leu Ser Gln Tyr Leu Cys Tyr
 1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 13

Tyr Cys Trp Ser Gln Asn Leu Cys Tyr
 1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 14

Tyr Cys Trp Ser Gln Asn Tyr Cys Tyr
 1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 15

Tyr Cys Trp Ser Gln Tyr Leu Cys Tyr
 1 5

<210> 16

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 16

Tyr Cys Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 17

Tyr Cys Phe Thr Asn Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 18

Tyr Cys Phe Thr Arg Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5 10

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 19

Phe Cys Ala Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 20

Tyr Cys Ala Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 21

Phe Cys Asn Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 22

Phe Cys Asn Ser Glu Asn Arg Cys Tyr
 1 5

<210> 23
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 23

Phe Cys Asn Ser Val Glu Asn Arg Cys Tyr
 1 5 10

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 24

Tyr Cys Arg Lys Glu Leu Gly Gln Val Cys Tyr
 1 5 10

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 25

Tyr Cys Lys Glu Pro Gly Gln Cys Tyr
 1 5

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 26

Tyr Cys Arg Lys Glu Met Gly Cys Tyr
 1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 27

Phe Cys Arg Lys Glu Met Gly Cys Tyr
 1 5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid WP1

<220>

<223> Peptidsequenz, abgeleitet vom anti-TNF-alpha Antikörper (Di62, CDR1L).

<400> 28

Tyr Cys Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Cys Phe
 1 5 10

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid WP1R

<220>

<223> Peptidsequenz, abgeleitet vom anti-TNF-alpha Antikörper (Di62, CDR1L).

<400> 29

Phe Cys Val Ser Asn Asp Arg Cys Tyr
1 5

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Artifizielle Sequenz

<220>
<223> Matrizensequenz

<220>
<223> Sequenz der TNF-alpha Bindungsstelle des anti-TNF-alpha Antikörpers (Di62, CDR1L).

<400> 30

Gln Ser Val Ser Asn Asp Val
1 5

SEQUENZLISTE

<110> THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA
<120> PEPTIDANALOGA, ABGELEITET VOM TUMORNEKROSE-FAKTOR-REZEPTOR
<130> P023476EP
<140> EP 98923839.9
<141> 29.05.1998
<150> US 08/866545
<151> 30.05.1997
<160> 30
<170> SeqWin99, Version 1.02
<210> 1
<211> 74
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

```

Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His
 1      5      10      15
Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln
      20      25      30
Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys
      35      40      45
Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys
      50      55      60
Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr
65      70

```

<210> 2
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp
 1      5      10      15
Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val
      20      25      30
Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg
      35      40      45
Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys
      50      55      60
Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
65      70      75

```

<210> 3
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

Val Cys Ala Thr Cys Ala Glu Asn Ser Tyr Asn Glu His Trp Asn Tyr
 1      5      10      15
Leu Thr Ile Cys Gln Leu Cys Arg Pro Cys Asp Pro Val Met Gly Leu
      20      25      30
Glu Glu Ile Ala Pro Cys Thr Ser Lys Arg Lys Thr Gln Cys Arg Cys
      35      40      45
Gln Pro Gly Met Phe Cys Ala Ala Trp Ala Leu Glu Cys Thr His Cys
      50      55      60
Glu Leu Leu Ser Asp Cys Pro Pro Gly Thr Glu Ala Glu
65      70      75

```

<210> 4
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

```

Cys Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala
 1      5      10      15
Thr Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met
      20      25      30
Ser Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr
      35      40      45
Gly Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val
      50      55      60
Cys Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln
65      70      75

```

<210> 5
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

```

Gln Cys Asp Pro Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His
 1      5      10      15
Thr Arg Pro His Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu
      20      25      30
Val Arg Asn Cys Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn
      35      40      45
Gly Trp Gln Cys Arg
      50

```

<210> 6
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

```

Cys Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Asp Arg
 1      5      10      15
Cys Thr Ala Cys Val Thr Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr
      20      25      30
Pro Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Val Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met
      35      40      45
Phe Cys Ser Thr Ser Ala Val Asn Ser Cys Ala Arg Cys Phe Phe His
      50      55      60
Ser Val Cys Pro Ala Gly Met Ile Val Lys
65      70

```

<210> 7
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

```

Cys Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Gly Arg
 1      5      10
Cys Thr Ala Cys Val Ser Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr
      20      25      30
Pro Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Thr Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met
      35      40      45
Ile Cys Ala Thr Ser Ala Thr Asn Ser Cys Ala Arg Cys Val Pro Tyr
      50      55      60
Pro Ile Cys Ala Ala Glu Thr Val Thr Lys
65      70

```

<210> 8
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

```

Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg
 1      5      10
Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu
      20      25      30
Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys
      35      40      45
Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu
      50      55      60
His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys
65      70      75

```

<210> 9
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

```

Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
 1      5      10
Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
      20      25      30
Leu Glu

```

<210> 10
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

```

Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys
 1      5      10      15

```

```

Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg
      20      25
Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala
      35      40      45
Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr
      50      55

```

<210> 11
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

```

Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg
  1      5      10      15
Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys
      20      25      30
Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe
      35      40      45
His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln
      50      55      60
Gly Gln Glu Leu Thr
  65

```

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 12

```

Tyr Cys Glu Leu Ser Gln Tyr Leu Cys Tyr
  1      5      10

```

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 13

```

Tyr Cys Trp Ser Gln Asn Leu Cys Tyr
  1      5

```

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 14

Tyr Cys Trp Ser Gln Asn Tyr Cys Tyr
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 15

Tyr Cys Trp Ser Gln Tyr Leu Cys Tyr
 1 5

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 16

Tyr Cys Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 17

Tyr Cys Phe Thr Asn Ser Glu Asn His Cys Tyr
1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 18

Tyr Cys Phe Thr Arg Ser Glu Asn His Cys Tyr
1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 19

Phe Cys Ala Ser Glu Asn His Cys Tyr
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 20

Tyr Cys Ala Ser Glu Asn His Cys Tyr
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificielle Sequenz

<220>
<223> Synthetisches Peptid

<400> 21

Phe Cys Asn Ser Glu Asn His Cys Tyr
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificielle Sequenz

<220>
<223> Synthetisches Peptid

<400> 22

Phe Cys Asn Ser Glu Asn Arg Cys Tyr
1 5

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificielle Sequenz

<220>
<223> Synthetisches Peptid

<400> 23

Phe Cys Asn Ser Val Glu Asn Arg Cys Tyr
1 5 10

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 24

Tyr Cys Arg Lys Glu Leu Gly Gln Val Cys Tyr
 1 5 10

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 25

Tyr Cys Lys Glu Pro Gly Gln Cys Tyr
 1 5

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 26

Tyr Cys Arg Lys Glu Met Gly Cys Tyr
 1 5

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 27

Phe Cys Arg Lys Glu Met Gly Cys Tyr
 1 5

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid WP1

<220>
 <223> Peptidsequenz, abgeleitet vom anti-TNF-alpha Antikörper (Di62, CDR1L).

<400> 28

Tyr Cys Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Cys Phe
 1 5 10

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid WP1R

<220>
 <223> Peptidsequenz, abgeleitet vom anti-TNF-alpha Antikörper (Di62, CDR1L).

<400> 29

Phe Cys Val Ser Asn Asp Arg Cys Tyr
 1 5

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Matrizensequenz

<220>
 <223> Sequenz der TNF-alpha Bindungsstelle des anti-TNF-alpha Antikörpers (Di62, CDR1L).

<400> 30

Gln Ser Val Ser Asn Asp Val
 1 5

SEQUENZLISTE

<110> THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA
 <120> PEPTIDANALOGA, ABGELEITET VOM TUMORNEKROSE-FAKTOR-
 REZEPTOR
 <130> P023476EP
 <140> EP 98923839.9
 <141> 29.05.1998
 <150> US 08/866545
 <151> 30.05.1997
 <160> 30
 <170> SeqWin99, Version 1.02
 <210> 1
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

```

Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His
 1           5           10           15
Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln
          20           25           30
Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys
          35           40           45
Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys
 50           55           60
Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr
65           70

```

<210> 2
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

```

Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp
 1           5           10           15
Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val
          20           25           30
Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg
          35           40           45
Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys
 50           55           60
Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
65           70           75

```

<210> 3

<211> 77
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

Val Cys Ala Thr Cys Ala Glu Asn Ser Tyr Asn Glu His Trp Asn Tyr
 1          5          10          15
Leu Thr Ile Cys Gln Leu Cys Arg Pro Cys Asp Pro Val Met Gly Leu
          20          25          30
Glu Glu Ile Ala Pro Cys Thr Ser Lys Arg Lys Thr Gln Cys Arg Cys
          35          40          45
Gln Pro Gly Met Phe Cys Ala Ala Trp Ala Leu Glu Cys Thr His Cys
          50          55          60
Glu Leu Leu Ser Asp Cys Pro Pro Gly Thr Glu Ala Glu
65          70          75

```

<210> 4
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

```

Cys Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala
 1          5          10          15
Thr Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met
          20          25          30
Ser Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr
          35          40          45
Gly Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val
          50          55          60
Cys Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln
65          70          75

```

<210> 5
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

```

Gln Cys Asp Pro Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His
 1          5          10          15
Thr Arg Pro His Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu
          20          25          30
Val Arg Asn Cys Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn
          35          40          45
Gly Trp Gln Cys Arg
          50

```

<210> 6
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

```

Cys Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Asp Arg
 1      5      10
Cys Thr Ala Cys Val Thr Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr
      20      25      30
Pro Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Val Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met
      35      40      45
Phe Cys Ser Thr Ser Ala Val Asn Ser Cys Ala Arg Cys Phe Phe His
      50      55      60
Ser Val Cys Pro Ala Gly Met Ile Val Lys
65      70

```

<210> 7

<211> 74

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

Cys Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Gly Arg
 1      5      10
Cys Thr Ala Cys Val Ser Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr
      20      25      30
Pro Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Thr Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met
      35      40      45
Ile Cys Ala Thr Ser Ala Thr Asn Ser Cys Ala Arg Cys Val Pro Tyr
      50      55      60
Pro Ile Cys Ala Ala Glu Thr Val Thr Lys
65      70

```

<210> 8

<211> 75

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg
 1      5      10
Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu
      20      25      30
Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys
      35      40      45
Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu
      50      55      60
His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys
65      70      75

```

<210> 9

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

9

```

Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
 1      5      10      15
Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
      20      25      30
Leu Glu

```

<210>

10

<211>

56

<212>

PRT

<213>

Homo sapiens

<400>

10

```

Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys
 1      5      10      15
Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg
      20      25      30
Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala
      35      40      45
Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr
      50      55

```

<210>

11

<211>

69

<212>

PRT

<213>

Homo sapiens

<400>

11

```

Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg
 1      5      10      15
Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys
      20      25      30
Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe
      35      40      45
His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln
      50      55      60
Gly Gln Glu Leu Thr
      65

```

<210>

12

<211>

10

<212>

PRT

<213>

Artifizielle Sequenz

<220>

<223>

Synthetisches Peptid

<400> 12

Tyr Cys Glu Leu Ser Gln Tyr Leu Cys Tyr
 1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 13

Tyr Cys Trp Ser Gln Asn Leu Cys Tyr
 1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 14

Tyr Cys Trp Ser Gln Asn Tyr Cys Tyr
 1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 15

Tyr Cys Trp Ser Gln Tyr Leu Cys Tyr
 1 5

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 16

Tyr Cys Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 17

Tyr Cys Phe Thr Asn Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 18

Tyr Cys Phe Thr Arg Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5 10

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 19

Phe Cys Ala Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 20

Tyr Cys Ala Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 21

Phe Cys Asn Ser Glu Asn His Cys Tyr
 1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 22

Phe Cys Asn Ser Glu Asn Arg Cys Tyr
 1 5

<210> 23

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 23

Phe Cys Asn Ser Val Glu Asn Arg Cys Tyr
 1 5 10

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 24

Tyr Cys Arg Lys Glu Leu Gly Gln Val Cys Tyr
 1 5 10

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 25

Tyr Cys Lys Glu Pro Gly Gln Cys Tyr
 1 5 10

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 26

Tyr Cys Arg Lys Glu Met Gly Cys Tyr
 1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 27

Phe Cys Arg Lys Glu Met Gly Cys Tyr
 1 5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid WP1

<220>

<223> Peptidsequenz, abgeleitet vom anti-TNF-alpha Antikörper (Di62, CDR1L).

<400> 28

Tyr Cys Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Cys Phe
 1 5 10

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid WP1R

<220>

<223> Peptidsequenz, abgeleitet vom anti-TNF-alpha Antikörper (Di62, CDR1L).

<400> 29

Phe Cys Val Ser Asn Asp Arg Cys Tyr
 1 5

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Matrizensequenz

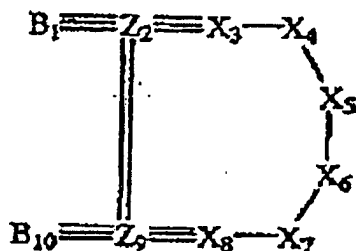
<220>
 <223> Sequenz der TNF-alpha Bindungsstelle des anti-TNF-alpha Antikörpers (Di62, CDR1L).

<400> 30

Gln Ser Val Ser Asn Asp Val
 1 5

Patentansprüche

1. Verbindung, die die Formel:



aufweist, worin:

B₁ und B₁₀ jeweils unabhängig voneinander ein Peptid von 1–3 Aminosäuren, wovon mindestens eine eine aromatische Aminosäure ist, sind;
 Z₂ und Z₉ jeweils unabhängig voneinander eine Cys-ähnliche Aminosäure sind;
 X₃ fehlt oder ist eine saure Aminosäure;
 X₄ ist eine aromatische oder apolare Aminosäure;
 X₅ ist eine polare Aminosäure;
 X₆ ist eine polare Aminosäure;
 X₇ ist eine aromatische oder polare Aminosäure;
 X₈ ist eine aromatische, apolare oder polare Aminosäure ausgewählt;
 "-" ist eine Amidbrücke;
 "=" ist eine Disulfidbrücke; und
 "≡" ist eine Amidbrücke.

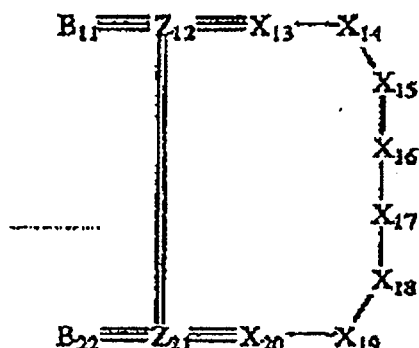
2. Verbindung nach Anspruch 1, worin:

B₁ und B₁₀ jeweils unabhängig voneinander Tyr oder Phe sind;
 Z₂ und Z₉ jeweils Cys sind;
 X₃ fehlt oder Glu ist;
 X₄ Trp oder Leu ist;
 X₅ Ser ist;
 X₆ Gln ist;
 X₇ Tyr oder Asn ist;
 X₈ Tyr oder Leu ist;
 "-" ist eine Amidbrücke;
 "=" ist eine Disulfidbrücke; und
 "≡" ist eine Amidbrücke.

3. Verbindung nach Anspruch 2, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

Tyr-Cys-Glu-Leu-Ser-Gln-Tyr-Leu-Cys-Tyr (WP9ELY, SEQ ID NO: 12);
 Tyr-Cys-Trp-Ser-Gln-Asn-Leu-Cys-Tyr (WP9Q, SEQ ID NO: 13);
 Tyr-Cys-Trp-Ser-Gln-Asn-Tyr-Cys-Tyr (WP9Y, SEQ ID NO: 14); und
 Tyr-Cys-Trp-Ser-Gln-Tyr-Leu-Cys-Tyr (WP9QY, SEQ ID NO: 15).

4. Verbindung, der die Formel:



aufweist, worin:

B₁₁ und B₂₂ jeweils unabhängig voneinander ein Peptid von 1–3 Aminosäuren, wovon mindestens eine eine aromatische Aminosäure ist, sind;

Z₁₂ und Z₂₁ jeweils unabhängig voneinander eine Cys-ähnliche Aminosäure sind;

X₁₃ fehlt oder ist eine aromatische Aminosäure;

X₁₄ fehlt oder ist eine polare Aminosäure;

X₁₅ ist eine basische, polare oder apolare Aminosäure;

X₁₆ ist eine polare Aminosäure;

X₁₇ fehlt oder ist eine apolare Aminosäure;

X₁₈ ist eine saure Aminosäure;

X₁₉ ist eine polare Aminosäure;

X₂₀ ist eine basische Aminosäure;

"-" ist eine Amidbrücke;

"=" ist eine Disulfidbrücke; und

"≡" ist eine Amidbrücke.

5. Verbindung nach Anspruch 4, worin:

B₁₁ und B₂₂ jeweils unabhängig voneinander Tyr oder Phe sind;

Z₁₂ und Z₂₁ jeweils Cys sind;

X₁₃ fehlt oder Phe ist;

X₁₄ fehlt oder Thr ist;

X₁₅ ist Ala, Asn oder Arg;

X₁₆ ist Ser;

X₁₇ fehlt oder ist Val;

X₁₈ ist Glu;

X₁₉ ist Asn;

X₂₀ ist Arg oder His;

"-" ist eine Amidbrücke;

"=" ist eine Disulfidbrücke; und

"≡" ist eine Amidbrücke.

6. Verbindung nach Anspruch 5, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

Tyr-Cys-Phe-Thr-Ala-Ser-Glu-Asn-His-Cys-Tyr (WP5, SEQ ID NO: 16);

Tyr-Cys-Phe-Thr-Asn-Ser-Glu-Asn-His-Cys-Tyr (WP5N, SEQ ID NO: 17);

Tyr-Cys-Phe-Thr-Arg-Ser-Glu-Asn-His-Cys-Tyr (WP5R, SEQ ID NO: 18);

Phe-Cys-Ala-Ser-Glu-Asn-His-Cys-Tyr (WP5J, SEQ ID NO: 19);

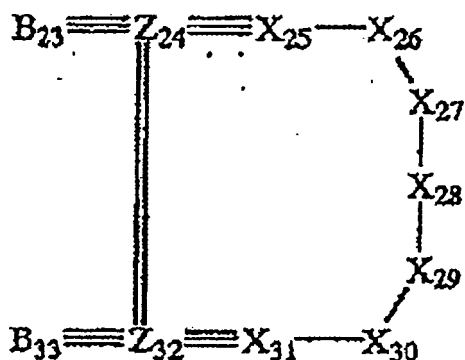
Tyr-Cys-Ala-Ser-Glu-Asn-His-Cys-Tyr (WP5JY, SEQ ID NO: 20); 1;

Phe-Cys-Asn-Ser-Glu-Asn-His-Cys-Tyr (WP5JN, SEQ ID NO: 21); I

Phe-Cys-Asn-Ser-Glu-Asn-Arg-Cys-Tyr (WP5JR, SEQ ID NO: 22); und

Phe-Cys-Asn-Ser-Val-Glu-Asn-Arg-Cys-Tyr (WP5VR, SEQ ID NO: 23).

7. Verbindung, die die Formel:



aufweist, worin:

B₂₃ und B₃₃ unabhängig voneinander ein Peptid von 1–3 Aminosäuren, wovon mindestens eine eine aromatische Aminosäure ist;

Z₂₄ and Z₃₂ jeweils unabhängig voneinander eine Cys-ähnliche Aminosäure sind;

X₂₅ fehlt oder ist eine basische Aminosäure;

X₂₆ ist eine basische Aminosäure;

X₂₇ ist eine saure Aminosäure;

X₂₈ ist eine apolare Aminosäure;

X₂₉ ist eine apolare Aminosäure;

X₃₀ fehlt oder ist eine polare Aminosäure;

X₃₁ fehlt oder ist eine apolare Aminosäure;

"-" ist eine Amidbrücke;

"=" ist eine Disulfidbrücke; und

"≡" ist eine Amidbrücke.

8. Verbindung nach Anspruch 7, worin:

B₂₃ und B₃₃ unabhängig voneinander Tyr oder Phe sind;

Z₂₄ and Z₃₂ jeweils Cys sind;

X₂₅ fehlt oder ist Arg;

X₂₆ ist Lys;

X₂₇ ist Glu;

X₂₈ ist Leu, Pro oder Met;

X₂₉ ist Gly;

X₃₀ fehlt oder ist Gln;

X₃₁ fehlt oder ist Val;

"-" ist eine Amidbrücke;

"=" ist eine Disulfidbrücke; und

"≡" ist eine Amidbrücke.

9. Verbindung nach Anspruch 8, worin die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

Tyr-Cys-Arg-Lys-Glu-Leu-Gly-Gln-Val-Cys-Tyr (WPSL, SEQ ID NO: 24);

Tyr-Cys-Lys-Glu-Pro-Gly-Gln-Cys-Tyr (WSJP, SEQ ID NO: 25);

Tyr-Cys-Arg-Lys-Glu-Met-Gly-Cys-Tyr (WPSJ, SEQ ID NO: 26); und

Phe-Cys-Arg-Lys-Glu-Met-Gly-Cys-Tyr (WPSJF, SEQ ID NO: 27).

10. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend die Verbindung nach einem der voranstehenden Ansprüche und einen pharmazeutischen Hilfsstoff-Träger oder einen Hilfsstoff.

11. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Verwendung in der Therapie.

12. Verwendung der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines TNF-assoziierten pathologischen Zustands, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus akuter und chronischer Entzündung, Kachexie, septischem Schock, Graft-versus-Host Erkrankung, Transplantat-Abstoßung, Hypersensitivität, Immunkomplex Erkrankung, Malaria, multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, periodontale Erkrankung, nicht-Insulin abhängige Diabetes und Lungenfibrose.

13. Verfahren zur Selektion eines Mittels, das antagonistisch für TNF Aktivitäten ist, umfassend: Inkubieren

von TNF mit der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 in der Anwesenheit eines Testmittels, und Messen einer Abnahme in der TNF Bindung an die Verbindung.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

	70	80	90	100	110	120	130	140																																	
<i>TNF-α p55</i>	D	C	R	E	C	S	G	S	F	T	A	S	E	N	H	R	C	L	S	C	S	K	..	C	R	K	E	M	G	Q	V	E	I	S							
<i>TNF-α p75</i>	V	C	D	S	C	E	D	S	T	Y	T	Q	L	W	N	W	P	E	C	L	S	C	G	S	R	C	S	S	D	Q	V	E	..	T	Q	A					
<i>TNF-α-<i>rp</i></i>	V	C	A	T	C	A	E	N	S	Y	N	E	H	W	N	Y	..	T	I	C	Q	L	C	R	P	C	D	P	V	M	G	L	E	E	I	A	P				
<i>NGF-α p75</i>	.	C	E	P	C	L	D	S	V	T	F	S	D	V	S	A	T	E	P	C	K	P	C	T	E	C	V	G	L	Q	S	M	S	A	P	...					
<i>CD27</i>	Q	C	D	P	C	I	P	G	V	S	F	S	...	P	D	H	T	R	P	H	C	E	S	C	R	H	C	N	S	G	L	L	V	R	N	..					
<i>CD30 (proximal)</i>	C	R	K	Q	C	E	P	D	Y	V	L	D	E	A	D	R	C	T	A	C	V	T	C	S	R	D	...	D	L	V	E	K	T	P							
<i>CD30 (distal)</i>	C	R	K	Q	C	E	P	D	Y	V	L	D	E	A	G	R	C	T	A	C	V	S	C	S	R	D	...	D	L	V	E	K	T	P							
<i>CD40</i>	E	C	L	P	C	G	E	S	E	F	L	D	T	W	N	R	..	E	T	H	C	H	Q	H	K	Y	C	D	P	N	L	G	L	R	V	Q	Q	K			
<i>Fas</i>	D	C	V	P	C	Q	E	G	E	Y	T	D	K	A	H	F	...	S	S	K	..	C	R	R	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...					
<i>OX40</i>	.	C	R	P	C	.	G	P	G	F	N	D	V	V	S	..	K	P	C	K	P	C	T	W	C	.	N	L	R	S	G	S	E	R	K	Q	L				
<i>4-1BB</i>	.	C	S	P	C	P	P	N	S	F	...	S	S	A	G	Q	R	T	C	D	I	C	R	Q	K	G	V	F	R	T	R	K	E								
	C	T	V	D	R	D	T	V	C	G	R	K	N	Q	Y	R	H	Y	W	S	E	N	L	F	Q	.	C	F	N	C	S	L	C	L	N	G	...	T			
	C	T	R	E	Q	N	R	I	C	T	C	R	P	G	W	Y	C	A	L	S	K	Q	E	G	C	R	L	C	A	P	L	R	K	C	R	P	G	F	G	V	A
	C	T	S	K	R	K	T	Q	C	R	C	Q	P	G	M	F	C	A	A	W	A	L	E	.	C	T	H	C	E	L	L	S	D	C	P	P	G	T	E	A	E
	C	V	E	A	D	D	A	V	C	R	C	A	Y	G	Y	Q	D	E	T	T	G	R	C	E	A	C	R	V	C	E	A	G	S	G	L	V	F	S	C	Q	
	C	T	I	T	A	N	A	E	C	A	C	R	N	G	W	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
	C	A	W	N	S	S	R	V	C	E	C	R	P	G	M	F	C	S	T	S	A	V	N	S	C	A	R	C	F	F	H	S	V	C	P	A	G	M	I	V	K
	C	A	W	N	S	S	R	T	C	E	C	R	P	G	M	I	C	A	T	S	A	T	N	S	C	A	R	C	V	P	Y	P	I	C	A	A	E	T	V	T	K
	C	T	C	E	E	G	W	H	C	T	...	S	E	A	C	E	S	C											V	L	H	R	S	C	S	P	G	F	G	V	K
	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
	C	T	A	T	Q	D	T	V	C	R	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
	C	S	S	T	S	N	A	E	C	D	C	T	P	G	F	H	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
	C	L	G	A	G	C	S	M	C	E	Q	D	C	K	Q	Q	E	L	T																						

Abbildung 1

Abbildung 2

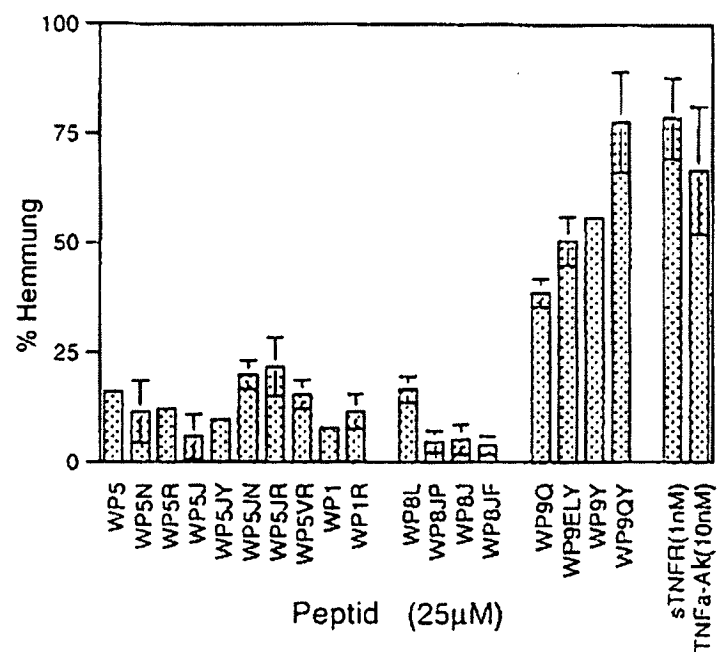


Abbildung 3

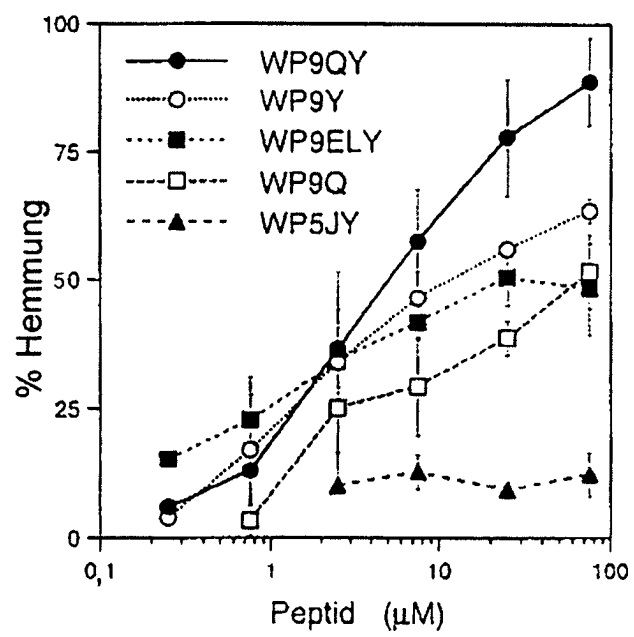


Abbildung 4

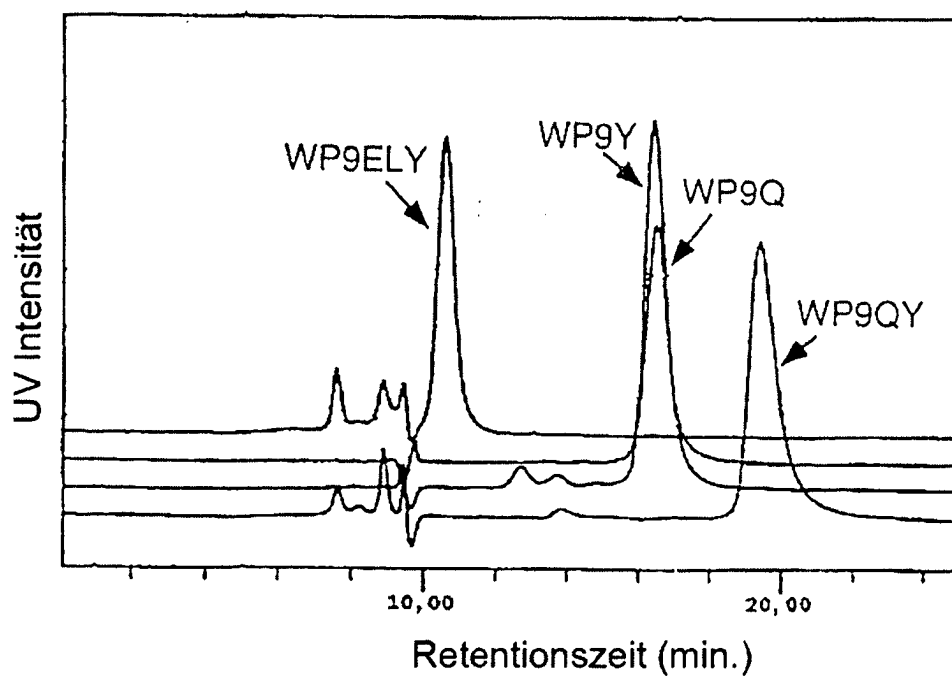


Abbildung 5

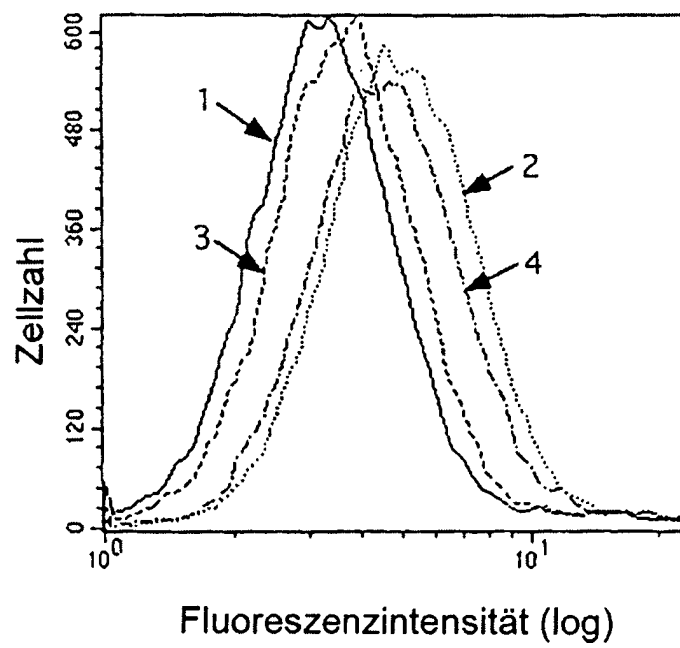


Abbildung 6

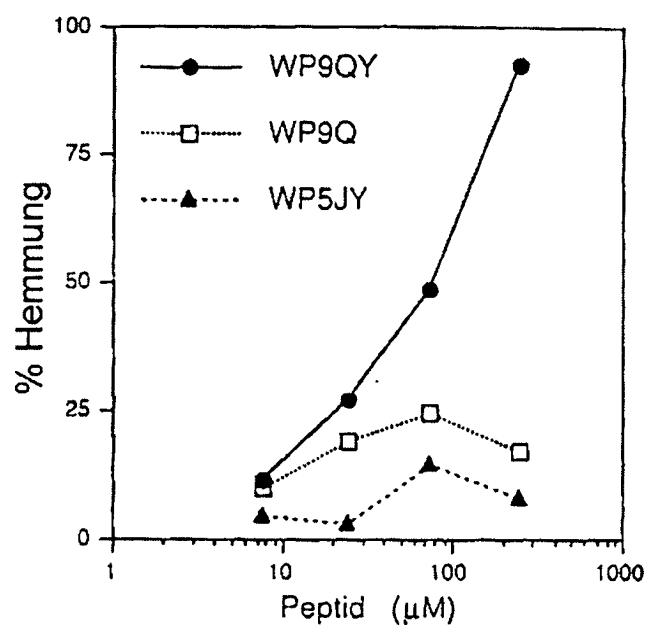


Abbildung 7

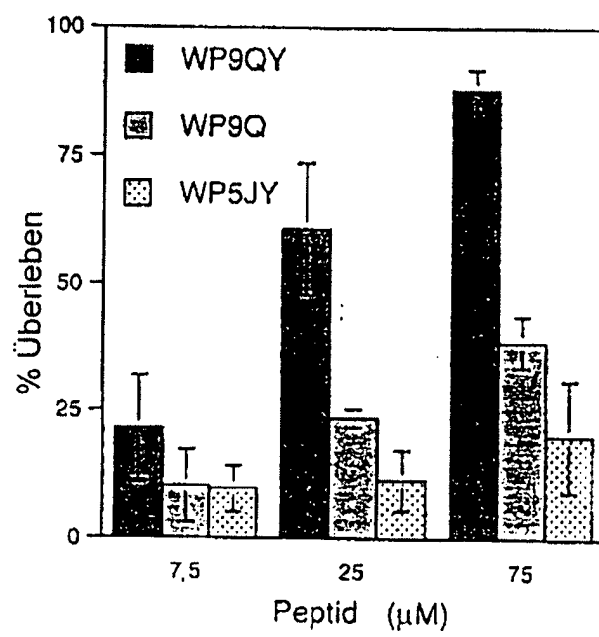


Abbildung 8A und 8B

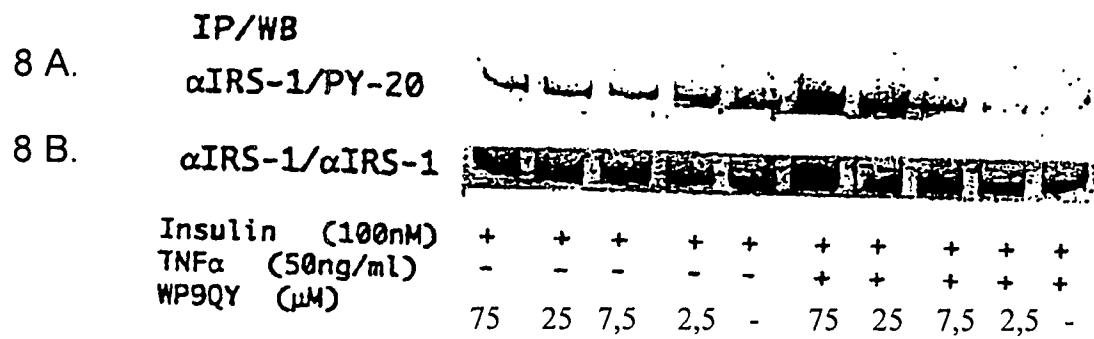


Abbildung 9

