



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 33 654 T2 2009.06.04**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 309 613 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 33 654.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IL01/00724**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 958 334.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/012269**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.08.2001**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **14.02.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.05.2003**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **16.04.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.06.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 14/00 (2006.01)**

**C07K 7/08 (2006.01)**

**G01N 33/68 (2006.01)**

**C12N 15/10 (2006.01)**

**C12Q 1/68 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**13782000 10.08.2000 IL**

(73) Patentinhaber:

**S.I.S. Shulov Institute for Science Ltd., Rehovot, IL**

(74) Vertreter:

**Vossius & Partner, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**SHULOV, Aharon, deceased, IL; PRIMOR, Naftali,  
91017 Jerusalem, IL**

(54) Bezeichnung: **ARZNEIMITTEL ENTHALTEND ANALGETISCHE PEPTIDE**

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

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

**Beschreibung**

## Gebiet der Erfindung

**[0001]** Diese Erfindung betrifft analgetische Peptide und deren Derivate.

## Hintergrund der Erfindung

**[0002]** Obwohl Schmerz eine extrem wichtige physiologische Reaktion ist, führt er auch zu unnötigem Leiden und Qualen. Die Kontrolle und die Linderung von Schmerz ist ein wichtiges Teilgebiet der Medizin. Schmerz kann sowohl als Resultat einer Krankheit entstehen als auch als Ergebnis einer medizinischen Behandlung wie z. B. einer Chemotherapie. In jedem Fall ist es wichtig, den Schmerz so weit wie möglich zu lindern, um es dem Leidenden zu ermöglichen, normal zu arbeiten.

**[0003]** Zwei Nervenbahnen, die mit Schmerz in Zusammenhang stehen, wirken gleichzeitig im Körper: (1) eine sensorische Bahn, die Gewebeschädigungen erfasst und anschließend ein Schmerzgefühl erzeugt; (2) eine analgetische Bahn, die das Schmerzgefühl vermindert und den Informationsfluss über den Schmerz an das zentrale Nervensystem (ZNS) verhindert, was es dem Organismus ermöglicht, seine normale Aktivität trotz einer Verletzung aufrechtzuerhalten. Anästhesie lässt sich entweder durch die Verwendung eines Arzneistoffes herbeiführen, der die peripheren Nerven hemmt, die als Schmerzsensoren fungieren, oder durch die Verstärkung des natürlichen analgetischen Systems. Da es sich bei diesen um verschiedene Bahnen handelt, werden sie von verschiedenen Substanzen beeinflusst. Zum Beispiel wirken Aspirin und Lidocain auf die periphere sensorische Leitungsbahn, wohingegen Morphin und verwandte Substanzen auf das analgetische System wirken.

**[0004]** Die wirksamsten, derzeit verwendeten Analgetika sind Morphin-ähnliche Substanzen von Opiaturprung. Es ist wohlbekannt, dass das Gehirn eine Vielzahl von endogenen Opiaten herstellt, und dies erklärt die starke Wirkung dieser Substanzen. Deren Wirkung auf Neuronen wird durch spezialisierte Rezeptoren vermittelt. Signale, die von diesen Rezeptoren reguliert werden, verhindern den Informationsfluss von den peripheren Schmerzneuronen zum ZNS. Diese ZNS-Neuronen sind auch gegenüber einer Vielzahl von anderen chemischen Substanzen empfindlich, wozu Catecholamine (Serotonin, Noradrenalin etc.), neuroaktive Peptide (Neurotensin) und inhibitorische Aminosäuren (Glycin und GABA) gehören.

**[0005]** US 4,619,916 an Di Stazio offenbart 13 neue Tripeptide der Formel pGlu-X-Trp, wobei pGlu zyklisierte Glutaminsäure (Pyroglutaminsäure) ist und X Gly, Val, Glu, Asp, Ser, Ala, Asn, Gln, Ile, Leu, Pro, Lys und Arg sein können. Ebenfalls offenbart sind ein Prozess für deren Herstellung, pharmazeutische Formulierungen, welche diese für orale oder parenterale Verabreichung enthalten, sowie deren Verwendung als hypotensive und analgetische Mittel. Ferner sind niedere Alkylester des Tryptophanrests, insbesondere Methyl- oder Ethylester, zur Verwendung als Schutzgruppen bei der Herstellung der Peptide offenbart. Die Schutzgruppen werden bei Beendigung des Syntheseprozesses entfernt. Es gibt keine Offenbarung einer topischen Formulierung.

**[0006]** WO 92/19254 offenbart  $\alpha$ -substituierte Mono-, Di-, Tri-, Tetra- und Pentapeptide, die nützlich sind, Fettleibigkeit, Angstzustände, Magen-Darm-Geschwüre, Schmerz, Schlaganfall und Entzündung zu behandeln. Peptide mit der Formel pGlu-X-Trp werden nicht offenbart.

**[0007]** Die folgenden Tetrapeptide mit der Formel pGlu-X-Trp-Z sind in der Literatur zu finden:  
 X = L-Ala; Z = L-LeuOH, L-LeuOCH<sub>3</sub>, L-LeuNH<sub>2</sub>, L-MetOH, L-MetOCH<sub>3</sub> oder L-MetNH<sub>2</sub> (DE 3,340,208);  
 X = Lys; Z = AlaOH oder L-ProOH (Freer, R. J. und Stewart, J. M. Cienc. Cult. 23 (4): 539–42 (1971); Francis, B. und Kaiser, I. I. Toxicol 31 (7): 889–899 (1993));  
 X = L-Pro; Z = L-ValNH<sub>2</sub>, L-MetOH, L-MetOCH<sub>3</sub>, L-MetNH<sub>2</sub>, L-MetsulfoxidOH, L-MetsulfoxidOCH<sub>3</sub> oder L-MetsulfoxidNH<sub>2</sub> (DE 3,340,208).

**[0008]** EP A 0 148 133 offenbart Tripeptid-Verbindungen, die Pyroglutaminsäure und Tryptophan enthalten, einen Prozess für deren Herstellung und deren therapeutische Anwendung.

## Zusammenfassung der Erfindung

**[0009]** Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein analgetisches Arzneimittel zur topischen Anwendung bereitzustellen.

**[0010]** Es ist ferner eine Aufgabe der Erfindung neue Peptidderivate bereitzustellen.

**[0011]** In einer ersten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Arzneimittel zur topischen Anwendung bereit, umfassend eine analgetisch wirksame Menge eines Peptids, das L-Aminosäuren der Formel (I) umfasst:

pGlu-X-Y-Z (I)

, wobei X eine Aminosäure, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Gly, Val, Glu, Asp, Ser, Ala, Asn, Gln, Ile, Leu, Pro, Lys und Arg ist,

Y Trp oder Thr ist,

und Z eine beliebige L-Aminosäure ist, oder Z nicht vorhanden ist,

und wobei eines, jedoch nicht beide, von Y und Z Trp ist, wenn Z eine beliebige L-Aminosäure ist, und Y = Trp ist, wenn Z nicht vorhanden ist,

oder eine analgetisch wirksame Menge eines Peptidderivats, in dem ein C<sub>4</sub>-C<sub>30</sub>-Alkylrest an eine Aminosäure des Peptids angehängt ist, sowie einen pharmazeutisch verträglichen Exciptienten.

**[0012]** Es ist nun entdeckt worden, dass bestimmte Peptide als ein aktiver Inhaltsstoff in topischen analgetischen Zusammensetzungen eingesetzt werden können.

**[0013]** Der aktive Inhaltsstoff der Zusammensetzung der Erfindung ist ein Peptid mit der Formel (I). Beispiele von Peptiden gemäß der Erfindung sind Tripeptide und Tetrapeptide, in denen pGlu die NH<sub>2</sub>-terminale Aminosäure ist und Trp an der dritten (Y) oder vierten (Z) Aminosäureposition ist. Beispiele bevorzugter Peptide sind pGlu-Asn-Trp-OH (pENW), pGlu-Glu-Trp-OH (pEEW), pGlu-Asn-Trp-Thr-OH (pENWT), pGlu-Asn-Thr-Trp-OH (pENTW) und pGlu-Asn-Trp-Lys-OH (pENWK).

**[0014]** Ein Peptidderivat gemäß der Erfindung ist eines, in dem eine Alkylkette an das Peptid angehängt worden ist. Dies lässt sich bewerkstelligen, indem man eine Fettsäure an eine Aminogruppe anhängt, zum Beispiel an die ε-Aminogruppe eines Lysin- oder Argininrests, wodurch man ein Alkylamid des Peptids erhält, oder an eine Hydroxylgruppe, wodurch man einen Alkylester des Peptids erhält. Die Alkylkette kann an eine beliebige der Aminosäuren des Peptids angehängt werden, die in der Lage ist, mit der Alkylkette zu reagieren, wie es einem Fachmann auf dem Gebiet wohlbekannt ist. Die Alkylkette kann eine beliebige Länge aufweisen, hat aber bevorzugt eine mittlere bis lange Kettenlänge, z. B. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 oder 30 Kohlenstoffatome. Beispiele für Peptidderivate sind pGlu-Asn-Trp-Lys(octanoyl)-OH (pENWK-C8) und pGlu-Asn-Trp-O-octyl (pENW-C8).

**[0015]** Eine „analgetisch wirksame Menge“ ist eine Menge des aktiven Bestandteils, die in der Lage ist, die gewünschte pharmakologische Wirkung hervorzurufen, d. h. die Verminderung oder die Vorbeugung von Schmerz. Diese Menge hängt von einer Anzahl von Parametern ab, wie z. B. der genauen Zusammensetzung des aktiven Inhaltsstoffs und des Trägers, des Anwendungsorts, der Quelle des Schmerzes etc. Die Menge lässt sich von einem durchschnittlich gebildeten Fachmann leicht durch Durchführen einer begrenzten Zahl von Dosis-Wirkungs-Experimenten bestimmen, z. B. indem man eine Konzentrationsreihe einer gegebenen Formulierung auf eine genau definierte Stelle auf dem Körper aufbringt. Beispiele für Konzentrationen, von denen man festgestellt hat, dass sie wirksam sind, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf 0,0015–0,02 mg/g Träger.

**[0016]** Das Arzneimittel der Erfindung ist für topische Anwendung formuliert. Eine solche Zusammensetzung würde auch einen oder mehrere pharmazeutisch verträgliche Träger oder Exciptienten umfassen, wie z. B. ein Gemisch aus Lanolin und Vaseline zur topischen Anwendung in einer Salbe, einer Creme oder einer Wundsalbe. Andere Träger für topische Anwendung sind dem Fachmann auf dem Gebiet wohlbekannt und sind im Geltungsbereich der Erfindung eingeschlossen. In der Zusammensetzung können Duftstoff abgebende Substanzen, Stabilisatoren, Farbstoffe, Verdickungsmittel und andere herkömmliche Substanzen enthalten sein.

**[0017]** Die Erfindung stellt auch die Verwendung einer analgetisch wirksamen Menge eines Peptids bereit, das L-Aminosäuren der Formel (I) umfasst:

pGlu-X-Y-Z (I)

, wobei X eine Aminosäure, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Gly, Val, Glu, Asp, Ser, Ala, Asn, Gln, Ile, Leu, Pro, Lys und Arg, ist,

Y Trp oder Thr ist,  
 und Z eine beliebige L-Aminosäure ist, oder Z nicht vorhanden ist,  
 und wobei eines, jedoch nicht beide, von Y und Z Trp ist, wenn Z eine beliebige L-Aminosäure ist, und Y = Trp ist, wenn Z nicht vorhanden ist,  
 oder einer analgetisch wirksamen Menge eines Peptidderivats, in dem ein Alkylrest an eine Aminosäure des Peptids angehängt ist, zur Herstellung eines topischen Arzneimittels zur Behandlung und Vorbeugung von Schmerz.

**[0018]** Die topische Anwendung des Peptids kann für topische Zusammensetzungen auf herkömmliche Art erfolgen.

**[0019]** Da die Zusammensetzung der Erfindung manchmal nach einer zeitlichen Verzögerung wirkt, ist es zu erwarten, dass sie in Bezug auf chronische Schmerzen besonders wirksam ist, obwohl sie dazu verwendet werden kann, jede beliebige Art von Schmerz zu behandeln.

**[0020]** In einer noch weiteren Ausführungsform wird ein Peptid bereitgestellt, das L-Aminosäuren der Formel (I) enthält:

pGlu-X-Y-Z (I)

, wobei X eine Aminosäure, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Gly, Val, Glu, Asp, Ser, Ala, Asn, Gln, Ile, Leu, Pro, Lys und Arg ist,  
 Y Trp oder Thr ist,  
 und Z eine beliebige L-Aminosäure ist, oder Z nicht vorhanden ist,  
 und wobei eines, jedoch nicht beide, von Y und Z Trp ist, wenn Z eine beliebige L-Aminosäure ist, und Y = Trp ist, wenn Z nicht vorhanden ist,  
 oder ein Derivat des Peptids, in dem ein Alkylrest an eine Aminosäure angehängt ist, wobei die Länge des Alkyls C5-C30 ist,  
 mit der Maßgabe, dass, wenn Z eine beliebige L-Aminosäure ist, Z nicht Leu oder Met ist, falls X = Ala ist, Z nicht Ala oder Pro ist, falls X = Lys und Z nicht Val oder Met ist, falls X = Pro ist,  
 und mit der weiteren Maßgabe, dass, wenn Z nicht vorhanden ist, das Peptid den Alkylrest angehängt an eine Aminosäure davon hat.

**[0021]** Diese Peptide sind in der Literatur unbekannt.

**[0022]** Eine weitere Ausführungsform dieses Aspekts der Erfindung ist ein Arzneimittel zur Behandlung oder zur Vorbeugung von Schmerz, umfassend eine analgetisch wirksame Menge des Peptids der Erfindung oder eines Alkylesters oder Amids davon. Das Arzneimittel kann oral, parenteral oder topisch verabreicht werden.

## AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER AUSFÜHRUNGSFORMEN

### METHODEN UND MATERIAL

#### Herstellung von Peptiden und Derivaten

##### 1. Synthese von pGlu-Asn-Trp-Lys(Octanoyl)-OH

**[0023]** In einer Ausführungsform der Erfindung wurde die Synthese des Peptids mittels einer schrittweisen 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Festphasensynthese (SPPS)-Prozedur manuell auf einem Fmoc-Lys(Mtt)-Wang-Harz durchgeführt (indem man 0,25 mMol auf 1 g vorbeladenes Harz lud).

**[0024]** Beim ersten Schritt wurde die Mtt(4-Methyltrityl)-Schutzgruppe selektiv durch Behandlung mit 1% TFA in DCM entfernt. Octansäure wurde mit Hilfe der normalen Kopplungsprozedur (über eine Amidbindung) an die freie Aminogruppe angehängt, indem man 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU)-Reagenz in Gegenwart von N-Hydroxybenzotriazol (HOBt) zuführt. Dasselbe Kopplungsverfahren wurde auch für die Anhängung von anderen Aminosäuren angewandt. Die Vervollständigung des Kopplungsschritts wurde mit dem Kaiser-Test nachgewiesen (einige wenige Harzkügelchen aus der Reaktion wurden mit Ethanol gewaschen und in ein kleines Glasröhrchen überführt; es wurden 2 Tropfen der folgenden Lösungen zugegeben: 5% Ninhydrin in Ethanol, 80% Phenol in Ethanol, 0,00002 M Kaliumcyanid in Pyridin; die Probe wird gemischt und 4–6 Minuten lang auf 120°C erhitzt. Ein positiver Test wird durch blaue Harzkügelchen

angezeigt). Die Fmoc-Gruppe wurde dann mit 20% Piperidin entfernt und nach dem Waschen des Harzes wurde die zweite Aminosäure (Fmoc-Trp(Boc)) eingeführt, um einen anderen Kopplungsschritt neu zu starten.

**[0025]** Diese Schritte wurden gemäß der Peptidsequenz jedesmal mit einer zusätzlichen Aminosäure wiederholt. Die eingesetzten Aminosäuren waren Fmoc-N<sup>o</sup>-geschützt. Die Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren waren wie folgt geschützt: Trp (Boc), Asn (Trt). Jedes Fmoc-Amino wurde in situ aktiviert, indem man HBTU/HOBt verwendete, und anschließend für 50 Minuten an das Harz gekoppelt. Während der Kopplung verwendete man Diisopropylethylamin (DIEA) als organische Base. Die Fmoc-Schutzgruppe auf dem  $\alpha$ -Amin wurde dann durch eine 20-minütige Behandlung mit 20% Piperidin in N-Methylpyrrolidon (NMP) entfernt. Drei Äquivalente der aktivierten Aminosäuren wurden in den Kopplungsreaktionen eingesetzt. Die Schritte der Entfernung der Schutzgruppe und die Kopplungsschritte wurden mit der Zugabe jeder folgenden Aminosäure wiederholt, bis die Peptidsynthese vollständig war. Das Peptidharz wurde mit NMP gewaschen, gefolgt von DCM und unter Vakuum getrocknet.

**[0026]** Dieses Peptid, das, wie vorstehend beschrieben, hergestellt worden war, wurde von dem Harz abgespalten, indem man eine Lösung (TIS) aus 95% TFA, 5% Triisopropylsilan für 2 Stunden bei Raumtemperatur einsetzte. Das Produkt wurde durch Zugabe von 10 Volumina Ether präzipitiert, gefiltert und unter Vakuum getrocknet. Normalerweise erhielt man 150 mg des Peptids aus 1 g des Peptidharzes. Es wurde mittels IC/MS identifiziert ( $M^{+1} = 648,7$ ).

### Reinigung

**[0027]** Das Rohpeptid wurde auf einer präparativen RP-HPLC-Säule (C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ m Phenomenex Luna – Säule, 10 mm i. D.  $\times$  25 cm) gereinigt. Die Chromatographie wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: A = 0,05% H<sub>2</sub>O/TFA; B = 0,05% ACN/TFA;  $\lambda = 214$  nm; Flussrate = 5 ml/min. 50 mg Peptid wurden auf die Säule geladen. Es wurde ein Gradient von 15% bis 50% B verwendet. Fraktionen des Haupt-Peaks wurden aufgefangen und mittels analytischer HPLC charakterisiert. Die besten Fraktionen wurden miteinander vereinigt und lyophilisiert, um das erforderliche Produkt zu erhalten, das >95% rein war.

## 2. Herstellung von pGlu-Asn-Trp-O-Octyl

**[0028]** Die Herstellung dieses Peptids kann auch über ein Protokoll zur Synthese in Lösung durchgeführt werden, welches die folgenden Schritte enthält:

### a. Herstellung von Boc-Trp-O-Octyl (Octylester von Boc-Trp)

**[0029]** Boc-Trp (6,1 nMol), Octanol (6,8 nMol), DMAP (0,74 g, 6,1 nMol) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (1,4 g, 6,8 mMol) werden bei 0°C in DCM (40 ml) eingebracht. Das Gemisch wird gerührt und das Kühlbad wird entfernt, so dass die Temperatur langsam auf Raumtemperatur steigt. Die Reaktion wird über Nacht gerührt und dann gefiltert, um den Dicyclohexylharnstoff (DCU) zu entfernen. Der Feststoff wird mit DCM gewaschen und die vereinigte Mutterlauge wird auf einen pH-Wert von 4–5 eingestellt (0,1 N HCl). Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen (3  $\times$  30 ml), über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, gefiltert und eingedampft, um ein Rohprodukt zu erhalten.

### b. Entfernung der Boc-Gruppe

**[0030]** Boc-Trp-O-Octyl wird bei Raumtemperatur in Ether gelöst. HCl (4 N) in Dioxan wird eingeführt (molarer Überschuss 4:1) und das Reaktionsgemisch wird für etwa 1 Stunde gerührt. Ungeschütztes Produkt präzipitiert als das HCl-Salz. Es wird gefiltert, mit Ether gewaschen und getrocknet.

### c. DCC/HOBt-Kopplungsprozedur

**[0031]** Boc-geschützte Aminosäure (14,2 mMol) in DCM (35 ml) wird auf 0°C gekühlt. HOBt-H<sub>2</sub>O (12,9 mMol, 1,75 g) und DCC (15,5 mMol, 3,2 g) werden zu einem Reaktionsgemisch hinzugegeben und für 1 Stunde auf hoher Stufe gerührt. Von Schutzgruppen befreites Peptid (nach Entfernung der Boc-Gruppe), das in DCM (20 ml) und TEA (18,1 mMol) gelöst ist, wird hinzugefügt und das Gemisch für weitere 30 Min. bei 0°C gerührt. Das Kühlbad wird entfernt und die Reaktion wird über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

**[0032]** Das Produkt-Gemisch wird unter vermindertem Druck bis zur Trockenheit eingedampft und es wird EtOAc (150 ml) hinzugefügt. Unlösliche Partikel (DCU) werden durch Filtration entfernt und die Mutterlauge

wird mit Salzlösung (2 × 35 ml), NaHCO<sub>3</sub> (5%; 2 × 35 ml) und Wasser (2 × 35 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck eingedampft.

**[0033]** Am Schluss der Peptidsynthese (wobei die letzte Phase die Kopplung von pGlu ist) erhält man ein Peptid als ein Rohprodukt. Es wird mittels IC/MS identifiziert und auf ähnliche Weise wie das erste Peptid (pGlu-Asn-Trp-Lys(octanoyl)-OH) aufgereinigt.

### 3. Aufreinigung aus Schlangengift

**[0034]** Einige der Peptide der Erfindung können auch aus Schlangengift isoliert werden, wozu Schlangengift gehört, das aus Schlangen der Familien Viperidae, Elapidae und Crotalidae gewonnen wird. Zum Beispiel kann pENW aus Naja melanoleuca-Gift mit 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,0 auf einer Mono Q-Säule aufgereinigt werden. Die Fraktion, die bei 12 – 18 Minuten von der Mono Q-Säule eluiert (mit einem Peak bei 14,3 Minuten) wird wie folgt weiter auf einer HPLC aufgereinigt. Die Fraktion wird auf eine Spherisorb 5 HPLC-Säule, 5 µ, 250 × 4,6 mm, Phasentrennung S/N 142110 geladen und mit einem Gradienten von 20 mM NH<sub>4</sub>Ac (pH 5,5) und AcN eluiert. In einer alternativen Aufreinigung kann das Gift auf der Mono Q-Säule mit 20 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6,9 aufgereinigt werden. Die Fraktion mit einem Peak bei 17 Minuten wird, wie vorstehend beschrieben, weiter auf einer HPLC aufgereinigt. NMR-, HPLC- und LC/MS-Untersuchungen zeigten die Identität der synthetischen und natürlichen Peptide.

**[0035]** Auf ähnliche Weise sind pENW, pEEW und pENTW oder pENWT aus dem Gift von Crotalus adamanteus aufgereinigt worden, und pENW ist aus dem Gift von V. palestinae aufgereinigt worden.

## Assays

### 1. Analgesie-Assay

**[0036]** Bei jedem Test wurden einige zehn Hamster mit ähnlichem Gewicht und Alter eingesetzt. Die Hamster wurden nach der Zahl der zu testenden Proben in Gruppen aufgeteilt. Eine Salbe (50% Lanolin und 50% Vaseline), die die getestete Substanz enthielt, wurde auf den Pelz der Tiere in der Rückenregion aufgetragen. Der Pelz wurde nicht entfernt, um zu gewährleisten, dass keine Schädigung der Haut auftrat. Eine Kontrollgruppe von Hamstern wurde mit Salbe ohne die erfindungsgemäße Fraktion behandelt. Die Hamster wurden durch topische Anwendung für 6, 14, 21 oder 28 aufeinanderfolgende Tage behandelt. Der Test auf Analgesie wurde nach der letzten Verabreichung der Salbe durchgeführt. In einem anderen Protokoll wurde Analgesie nach einer einzigen Verabreichung der Salbe getestet.

**[0037]** Anschließend an die Verabreichung der Salbe „säubern“ sich die Hamster selbst, indem sie die Salbe mit ihrer Zunge und ihren Hinterläufen über ihren gesamten Körper verteilen. Somit wird ein Teil der Salbe in die Mundhöhle und möglicherweise auch in den Darm der Hamster eingeführt.

**[0038]** In einem typischen Test wird jedem Tier für eine vorbestimmte Zeit von einem oder mehreren Tagen eine konstante Menge an Salbe mit oder ohne einer analgetischen Substanz verabreicht. Nach dieser Periode induziert man Schmerz in der Oberschenkelregion durch eine subkutane Injektion von 0,5 ml 1 N HCl/0,1 kg Körpergewicht. Die Hamster reagieren auf die HCl-Injektion durch Berühren der Injektionsfläche mit der Zunge, was man einen „Leckvorgang“ nennt. 20 Minuten nach der Injektion wird der Hamster für 60 Minuten beobachtet und die Anzahl der „Leckvorgänge“ wird gezählt. Die Anzahl der Leckvorgänge dient als eine quantitative Angabe des durch HCl induzierten Schmerzes.

**[0039]** Der analgetische Effekt wird durch Vergleichen der mittleren Anzahl der „Leckvorgänge“ in Kontrolltieren mit der Anzahl bei behandeln Tieren bestimmt. Die Signifikanz des Unterschieds wurde mit einer t-Test-Statistik bestimmt.

### Beispiel 1

**[0040]** 0,6 mg von pENW, pENWK-C8 oder pENWGAT (einem Dimer von pENW) wurden in 5 ml DDW gelöst, mit einem Ultraschallmischer für 2 Minuten gemischt und dann in 315 g Salbe aufgelöst. Die Endkonzentration des Peptids betrug 0,002 mg/gr.

**[0041]** Über eine Zeitspanne von 4 Wochen wurden 6 Verabreichungen durchgeführt. Der Test auf Analgesie wurde 10 Tage nach der letzten Verabreichung der Salbe durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden

Tabelle zusammengefasst:

Aktiver Inhaltsstoff	Zahl der Tiere	Mittlere Anzahl Leckvorgänge	Std. Abw.	SEM	p*
Kontrolle	25	113.9	69.1	118	–
pENW	27	59.7	58.9	11.3	0.0017
pENWK-C8	28	37.9	34.8	6.6	< 0.0001
pENWGAT	32	117.0	81.2	14.4	0.9872

\* Mann-Whitney-Rangsummen-Test

**[0042]** Es ist klar zu sehen, dass die topische Verabreichung des Tripeptids einen signifikanten Effekt auf die Verminderung des Schmerzes der Tiere hatte und dass das Tetrapeptid-Derivat sogar noch wirksamer war. Das Hinzufügen von 3 Aminosäuren zu dem C-Terminus des Tripeptids hob dessen Aktivität vollständig auf.

#### Beispiel 2

**[0043]** Zusammensetzungen mit einer Konzentration von 0,020 mg/g wurden wie in Beispiel 1 hergestellt, die die folgenden aktiven Inhaltsstoffe enthielten: pENW, pEEW oder pENTW oder pENWT. Es wurden 6 Verabreichungen über eine Zeitspanne von 5 Wochen durchgeführt. Die Ergebnisse sind nachstehend zusammengefasst:

Aktiver Inhaltsstoff	Zahl der Tiere	Mittlere Anzahl Leckvorgänge	SEM	p*
Kontrolle	24	117	6	–
pENW	25	44	31	< 0.05
pEEW	26	35	30	< 0.05
pENTW or pENWT	25	39	26	< 0.05

\* Methode nach Dunn

**[0044]** Man kann sehen, dass alle der getesteten Peptide signifikante analgetische Aktivität aufweisen.

#### Beispiel 3

**[0045]** Eine Zusammensetzung, die pENW-C8 in einer Konzentration von 0,002 mg/g enthält, wurde wie in Beispiel 1 hergestellt. Man gab den Tieren eine einzige Verabreichung und Analgesie wurde 11, 23 und 48 Tage nach Anwendung getestet.

**[0046]** Den Kontrolltieren wurde Salbe ohne eine aktive Substanz verabreicht.

**[0047]** Die Ergebnisse sind nachstehend zusammengefasst:

Aktiver Inhaltsstoff	Zahl der Tiere	Mittlere Anzahl Leckvorgänge	SEM	p*
Kontrolle	26	106	11.2	–
11	28	66	10	< 0.05
23	27	35.7	6.5	< 0.05
48	21	62.4	11	< 0.05

\* Methode nach Dunn

**[0048]** Die Ergebnisse zeigen, dass sich die analgetische Wirkung mit der Zeit aufbaut, einen Peak nach etwa 23 Tagen erreicht und anschließend abnimmt.

### Patentansprüche

1. Arzneimittel für topische Anwendung, umfassend eine analgetische wirksame Menge eines Peptids, das L-Aminosäuren der Formel (I) umfasst:

pGLU-X-Y-Z (I)

wobei X eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN, GLN, ILE, LEU, PRO, LYS und ARG ist,  
 Y TRP oder THR ist,  
 und Z eine beliebige L-Aminosäure ist oder Z nicht vorhanden ist,  
 und wobei eines jedoch nicht beide von Y und Z TRP ist, wenn Z eine beliebige L-Aminosäure ist, und Y = TRP ist, wenn Z nicht vorhanden ist,  
 oder eine analgetische wirksame Menge eines Peptidderivats, in dem ein Alkylrest an eine Aminosäure des Peptides angehängt ist, wobei das Alkyl ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus C4-C30,  
 und einen pharmazeutisch verträglichen Exzipienten.

2. Arzneimittel gemäß Anspruch 1, wobei der Alkylrest durch eine Amidbindung angehängt ist.
3. Arzneimittel gemäß Anspruch 1, wobei der Alkylrest durch eine Esterbindung angehängt ist.
4. Arzneimittel gemäß Anspruch 1, wobei X ASN ist.
5. Arzneimittel gemäß Anspruch 1, wobei das Alkyl ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus C4-C30.
6. Arzneimittel gemäß Anspruch 5, wobei das Alkyl eine Octylgruppe (C8) ist.
7. Arzneimittel gemäß Anspruch 1, wobei das Peptid ein Tetrapeptid ist.
8. Arzneimittel gemäß Anspruch 1, wobei das Peptid ein Tripeptid ist und Z nicht vorhanden ist.

9. Verwendung einer analgetischen wirksamen Menge eines Peptids, umfassend L-Aminosäuren der Formel (I):

pGLU-X-Y-Z (I)

wobei X eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN, GLN, ILE, LEU, PRO, LYS und ARG ist,  
 Y TRP oder THR ist,  
 und Z eine beliebige L-Aminosäure ist oder Z nicht vorhanden ist,  
 und wobei eines jedoch nicht beide von Y und Z TRP ist, wenn Z eine beliebige L-Aminosäure ist, und Y = TRP ist, wenn Z nicht vorhanden ist,  
 oder einer analgetischen wirksamen Menge eines Peptidderivats, in dem ein Alkylrest an eine Aminosäure des Peptides angehängt ist,  
 zur Herstellung eines topischen Arzneimittels für die Behandlung oder Vorbeugung von Schmerz.

10. Verwendung gemäß Anspruch 9, wobei der Alkylrest durch eine Amidbindung angehängt ist.
11. Verwendung gemäß Anspruch 9, wobei der Alkylrest durch eine Esterbindung angehängt ist.
12. Verwendung gemäß Anspruch 9, wobei X ASN ist.
13. Verwendung gemäß Anspruch 9, wobei das Alkyl ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus C4-C30.
14. Verwendung gemäß Anspruch 13, wobei das Alkyl eine Octylgruppe (C8) ist.
15. Verwendung gemäß Anspruch 9, wobei das Peptid ein Tetrapeptid ist.
16. Verwendung gemäß Anspruch 9, wobei das Peptid ein Tripeptid ist und Z nicht vorhanden ist.

17. Peptid, umfassend L-Aminosäuren der Formel (I):

pGLU-X-Y-Z

(I)

, wobei X eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN, GLN, ILE, LEU, PRO, LYS und ARG ist,  
 Y TRP oder THR ist,  
 und Z eine beliebige L-Aminosäure ist oder Z nicht vorhanden ist,  
 und wobei eines jedoch nicht beide von Y und Z TRP ist, wenn Z eine beliebige L-Aminosäure ist, und Y = TRP ist, wenn Z nicht vorhanden ist,  
 oder ein Derivat des Peptids, in dem ein Alkylrest an eine Aminosäure angehängt ist,  
 wobei die Länge des Alkyls C5-C30 ist,  
 mit der Maßgabe, dass, wenn Z eine beliebige L-Aminosäure ist, Z nicht LEU oder MET ist, falls X = ALA ist, Z nicht ALA oder PRO ist, falls X = LYS und Z nicht VAL oder MET ist, falls X = PRO ist,  
 und mit der weiteren Maßgabe, dass, wenn Z nicht vorhanden ist, das Peptid den Alkylrest angehängt an eine Aminosäure davon hat.

18. Alkylester gemäß Anspruch 17, wobei das Alkyl eine Octylgruppe (C8) ist.

19. Tetrapeptid gemäß einem der Ansprüche 17 bis 18.

20. Tripeptid gemäß einem der Ansprüche 17 bis 18.

21. Arzneimittel zur Behandlung oder Vorbeugung von Schmerz, umfassend eine analgetische wirksame Menge eines Peptides gemäß Anspruch 17.

22. Arzneimittel zur Behandlung oder Vorbeugung von Schmerz, umfassend eine analgetische wirksame Menge eines Alkylesters oder -amids eines Peptids gemäß Anspruch 17.

23. Verwendung gemäß Anspruch 9, wobei das Peptid pGlu-Asn-Trp-Thr, pGlu-Asn-Thr-Trp oder pGlu-Asn-Trp-Lys-C8 ist.

24. Arzneimittel gemäß Anspruch 1, wobei das Peptid pGlu-Asn-Trp-Thr, pGlu-Asn-Thr-Trp oder pGlu-Asn-Trp-Lys-C8 ist.

25. Peptid gemäß Anspruch 17, welches pGlu-Asn-Trp-Thr, pGlu-Asn-Thr-Trp oder pGlu-Asn-Trp-Lys-C8 ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen