



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: A 61 K 37/50
C 12 N 9/04
C 07 F 15/06
C 07 C 103/52

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

641 355

⑳ Gesuchsnummer: 6884/79

㉔ Anmeldungsdatum: 25.07.1979

㉓ Priorität(en): 26.07.1978 ES 472.034

㉒ Patent erteilt: 29.02.1984

㉑ Patentschrift
veröffentlicht: 29.02.1984

㉑ Inhaber:
Prof. Dr. Fernando Silio, Madrid (ES)

㉒ Erfinder:
Prof. Dr. Fernando Silio, Madrid (ES)

㉓ Vertreter:
Patentanwälte W.F. Schaad, V. Balass, E.E.
Sandmeier, Zürich

⑤④ **Glucosetoleranzfaktor und Verfahren zu dessen Herstellung.**

⑤⑦ Die Erfindung betrifft einen Glucosetoleranzfaktor, bestehend aus einem stöchiometrischen Komplex aus einem Teil Kobalt, zwei Teilen Nikotinamid und einem Teil Glutathion mit einem Molekulargewicht oberhalb 1500, sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung.

PATENTANSPRÜCHE

1. Glucosetoleranzfaktor, bestehend aus einem stöchiometrischen Komplex aus einem Teil Kobalt, zwei Teilen Nikotinamid und einem Teil Glutathion mit einem Molekulargewicht oberhalb 1500.

2. Verfahren zur Herstellung eines neuen Glucosetoleranzfaktors gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Kobalt(II)salz mit Nikotinamid unter Bildung eines Kobalt-Nikotinamid-Komplexes im stöchiometrischen Verhältnis von 1:2 umsetzt und in einer zweiten Stufe diesen Komplex mit reduziertem Glutathion unter Ausbildung des Glucosetoleranzfaktors umsetzt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Kobaltsalz ein anorganisches oder organisches Salz verwendet.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass der als Zwischenprodukt gebildete Kobalt-Nikotinamid-Komplex durch Neutralisieren des Kobaltsalzes mit Alkali und anschliessender Sättigung mit Nikotinamid gebildet wird, wobei das Verhältnis wenigstens zwei Äquivalente Nikotinamid pro einem Äquivalent Kobalt beträgt und der pH 5,5 bis 7,5, in Abhängigkeit von dem verwendeten Kobaltsalz, vorzugsweise 6,5, beträgt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass verschiedene Salze des Komplexes durch Ansäuern mit den entsprechenden Säuren auf einen pH zwischen 4,5 und 6,5, vorzugsweise 6, gebildet werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der als Zwischenprodukt gebildete Komplex bei Raumtemperatur bis 80 °C, vorzugsweise bei 50 °C, gebildet wird, und dass die Umsetzung des gebildeten Komplexes mit Glutathion bei einem pH-Wert zwischen 4 und 6, in Abhängigkeit von dem als Zwischenprodukt verwendeten Komplexsalz, durchgeführt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung mit Glutathion mit dem Kobalt-Nikotinamid-Komplex, der in einer beliebigen Form vorliegen kann, durchgeführt wird.

Die Erfindung betrifft einen neuen Glucosetoleranzfaktor und ein Verfahren zu dessen Herstellung.

Bei Ratten, die mit einer Mangeldiät, enthaltend Torulahefe, ernährt wurden, beobachtete Schroeder (1957), dass eine solche Diät einen Mangel an Vitamin E, Selen und einer Substanz, die erforderlich ist, um Glucose zu metabolisieren (Glucosetoleranzfaktor), und die deshalb ein Cofaktor für Insulin sein würde, aber einen exogenen Ursprung hat (Nahrung), aufweist.

Schroeder selbst fand in Schweinenieren eine Substanz mit biologischer Glucosetoleranzfaktor-Aktivität. In Zusammenarbeit mit W. Mertz untersuchte er das Vorliegen des Glucosetoleranzfaktors (GTF) in verschiedenen Nahrungsmitteln und stellte fest, dass viele Nahrungsmittel (sehr reine Kohlehydrate) eine Art von Fett-Diabetes, unabhängig von Insulin, hervorrufen, während andere (Proteine) einen Schutz gegen solche Diabetes zu verleihen schienen.

W. Mertz schloss daraus, dass eine der Komponenten von GTF ein Metall, nämlich Chrom, war und führte eine Reihe von Versuchen durch einschliesslich unter Verwendung von 3wertigem Chrom, wodurch eine deutliche Erhöhung der Atmung (nahezu 50%) bei in-vitro-Versuchen festgestellt wurde, bei denen man GTF-Extrakte oder auch relativ hohe Konzentrationen an dreiwertigem Chrom ver-

wendete. Bei den Versuchstieren und auch bei Menschen verursachte die Verabreichung von Substanzen, die reich an GTV oder Cr^{+++} waren, in einigen Fällen eine Korrektur der «Glucoseintoleranz», die Insulin allein nicht bewerkstelligen konnte. Es wurde festgestellt, dass diese Art der Diabetes aufgrund des Mangels an GTF eine Fett- oder Insulin-resistente Diabetes war, bei welcher der begrenzende Faktor der genannte GTF ist.

1974 gewann W. Mertz aus Brauereihefe eine gelbliche Substanz mit einer GTF-Aktivität, die beträchtlich höher war als die von metallischem Chrom und die, wie festgestellt wurde, dreiwertiges Chrom, Nikotinsäure und die Aminosäuren Glycin, Glutaminsäure und Cystein enthielt. Der Erfinder nimmt an, dass das Chrom nicht physiologisch ist und dass dessen Vorkommen in Hefe GTF aus dem rostfreien Stahl (18/8) den Fermentationstank, in denen die Kultivierung stattfindet, stammt, und dass im allgemeinen die Wirkung des Chroms ergänzend oder vertretend für ein anderes biologisch aktives Metall ist, wie dies bei vielen enzymatischen Systemen festgestellt wurde, bei denen eine Aktivierung durch Magnesium zum Teil auch durch Mangan bewirkt werden kann. Somit erhob sich die Frage, welches das biologisch aktive Metall in GTF ist. Der Erfinder nimmt an, dass es Kobalt⁺⁺ ist. Diese Annahme begründet sich wie folgt:

Trotz der Tatsache, dass Mertz 1969 feststellte, dass Kobalt keine biologische Aktivität aufweist, lagen doch Daten vor, die genau das Gegenteil zu bestätigen schienen, wie die biologische Aktivität von Vitamin B 12 und die antidiabetische Aktivität in dem kobaltenthaltenden medizinischen Wasser von Caldas de Malavella. In sehr alten Literaturstellen wird Kobalt als eine «hipoglucemisierende» oder antidiabetische Substanz angesehen und die sehr wichtigen Beobachtungen von Bertrand (1926, 1927, 1934) auf diesem Gebiet und die Feststellung, dass Kobalt in den Nieren vorkommt (nämlich bis zu 320 Mikrogramm pro Kilo frischer Niere) führt zu der Annahme, dass Kobalt eine natürliche Komponente des von Schroeder aus Schweinenieren gewonnenen GTF ist.

Hinsichtlich der weiteren Komponenten von Mertz GTF schloss der Erfinder, dass Nikotinamid, eine physiologische Substanz und Komponente von Coenzymen viel eher zu erwarten war als Nikotonsäure.

Hinsichtlich der dritten Komponente (Glycin, Glutarsäure und Cystein), gibt es in der Natur ein Peptid, welches diese Zusammensetzung hat (Glutathion), nämlich ein Tripeptid mit einer gewissen biologischen Aktivität, durch welche eine bessere Glucosetoleranz bei ketotischen Patienten auf Kosten einer sehr grossen Menge von Glutathion bewirkt wird.

In Wirklichkeit sind jedoch sowohl Kobalt und Nikotinamid oder Glutathion bei alleiniger Verabreichung nur als Vorläufer aktiv und sie sind weder unmittelbar wirksam noch wirken sie als Antidiabetika in solchen Dosen, bei denen GTF schon aktiv sein kann.

Im Falle von GTF ist die biologische Wirkung dieser Vorläufer ähnlich der der Komponenten von allen anderen Coenzymen, wobei die Unterschiede zu dem Endprodukt oder dem biologisch aktiven Molekül, wie einem Coenzym, die folgenden sind:

1. Die Vorläufer müssen in sehr grossen Mengen verabreicht werden und ausreichend frühzeitig, damit das gesamte Molekül gebildet werden kann;
2. sie sind gewöhnlich nicht in in-vitro-biologischen Versuchen (einschliesslich enzymatischen Versuchen) aktiv;
3. die biologische Langzeitaktivität (eine unmittelbare Aktivität liegt, wie gesagt, nicht vor) ist im Verhältnis zu den verabreichten Mengen sehr klein;

4. werden mehrere Vorläufer des gleichen Moleküls zusammen verabreicht, so ist deren Wirkung im äussersten Falle additiv, wogegen im Falle des Endproduktes eine sehr grosse Wirkungssteigerung vorliegt;

5. in einigen Fällen (gewöhnlich mit Kobalt) wird einer der Vorläufer allein verhältnismässig schlecht absorbiert.

In therapeutischen Substanzen werden tatsächlich viele Oligoelemente gewöhnlich in Form von organischen Komplexen verabreicht.

Im Gegensatz zu diesen biologischen Eigenschaften der Vorläufer wurde nun gefunden, dass die Eigenschaften eines Coenzym oder eines anderen organischen Biokatalysators (Endprodukt) wie folgt spezifiziert werden können. Ein Endprodukt oder ein Gesamtmolekül eines Coenzym oder eines organischen Biokatalysators ist dadurch gekennzeichnet, dass es 1. in sehr niedrigen Konzentrationen aktiv ist; 2. dass auch bei In-vitro-Versuchen und enzymatischen Versuchen Aktivität vorliegt; 3. dass die Wirkung direkt einsetzt und die Aktivität sehr hoch ist im Verhältnis zu den verwendeten geringen Mengen; 4. zusätzlich zu der Wirkungssteigerung bei dem Endmolekül liegt in vielen Fällen eine ausserordentlich spezifische Wirkung vor; 5. das Endprodukt kann im allgemeinen parenteral verabreicht werden und in vielen Fällen wird die Absorption einer Komponente ermöglicht, die als freies Element nicht zu beobachten ist, wobei bei einer oralen Verabreichung häufig einige Biokatalysatoren in ihre Ursprungskomponenten oder in Zwischenverbindungen aufgespalten werden.

Ein sehr deutliches Beispiel in dieser Hinsicht ist die biologische Wirkung eines Coenzym, wie Nikotinamadenin-dinucleotid (NAD, DPN oder Coenzym 1); zusammen sind diese Komponenten (Adenylsäure, Nikotinamid und Phosphat) in enzymatischen Versuchen oder anderen In-vitro-Versuchen nicht aktiv, während «in vivo» eine erhebliche Menge in Milligramm erforderlich ist (die im Falle von Nikotinamid zu einem erheblichen Masse als methyliertes Derivat ausgeschieden wird) während andererseits das Endprodukt, nämlich Coenzym 1 oder DPN (bzw. NAD) schon in Mengen von Bruchteilen eines Milligramms, die injiziert werden, eine therapeutische Wirkung aufweisen. Noch deutlicher ist dieses Phänomen bei DPN und TPN (NAD und NADP), die sich nur in einem Molekül Phosphat unterscheiden, aber selektive Aktivatoren in unterschiedlichen enzymatischen Systemen darstellen.

Das gleiche trifft auch für Flavinoenzym, FMN und FAD und noch deutlicher mit Adenosinphosphaten zu: FAD inhibiert Pyruvatcarboxylase während ATP diese aktiviert, während umgekehrt ATP Pyruvatdehydrogenase inhibiert und ADP aktiviert. Dieser Unterschied wird nur durch das in dem Molekül eingebrachte Phosphat bewirkt.

Synthese des Glucosetoleranzfaktors

Diese Synthese wird erfindungsgemäss mit den drei Komponenten des erfindungsgemässen GTF bewirkt, welche:

- a) Kobalt²⁺
- b) Glutathion
- c) Nikotinamid

sind. Die Synthese findet nicht statt, wenn man nicht ein Zwischenprodukt bildet, das hier als AC bezeichnet wird, weil es einen Kobalt-Nikotinamid-Komplex darstellt. Dieser Komplex wurde mit grosser Reinheit isoliert, er kristallisiert sehr gut und ist völlig verschieden von seinen Bestandteilen A + C. Zum Unterschied von den Kobaltsalzen (organisch oder anorganisch), die als Ausgangsprodukte dienen, und die immer eine mehr oder weniger purpurrosa Farbe haben, hat der Kobalt-Nikotinamid-Komplex eine

Lachsfarbe, die mehr oder weniger orange ist und ist deutlich unterscheidbar von den Kobaltsalzen.

Das stöchiometrische Verhältnis ist ein Teil Kobalt auf zwei Teile Nikotinamid. Wird dieser Komplex (die Zwischenverbindung AC) hydrolysiert, so entstehen wieder die Ausgangskomponenten und die rosa Färbung des Kobaltsalzes tritt wieder auf.

Es ist bemerkenswert, dass man das Endprodukt (GTF), nämlich die stabile braunfarbene Verbindung aus der Kobalt-Nikotinamid-Glutathion-Zusammensetzung nicht ohne die vorhergehende Stufe der Bildung der Kobalt-Nikotinamid-Verbindung (AC) in Form eines lachsfarbenen Komplexes als Zwischenprodukt bilden kann, und dass es nicht möglich ist, das aktive Endprodukt bzw. Kobalt GTF (braun) aus den AB (Kobalt-Glutathion) oder den BC (Nikotinamid-Glutathion)-Komponenten zu erhalten und auch nicht durch eine gemeinsame Umsetzung der drei Komponenten A + B + C (Kobalt + Glutathion + Nikotinamid). Das Verfahren zur Herstellung des Glucosetoleranzfaktors (GTF) aus Kobalt entsprechend einer Zusammensetzung Kobalt 1, Nikotinamid 2, Glutathion 1, setzt die vorhergehende Stufe der Bildung des Zwischenproduktes, nämlich der lachsfarbenen Verbindung, die als AC bezeichnet wird, und die Zusammensetzung 1 Kobalt auf 2 Nikotinamid hat, als Komplex voraus.

Es bleibt somit festzustellen, dass kein aktives Produkt erhalten wird aus Kobalt⁺⁺, Nikotinsäure oder aus oxydiertem Glutathion.

Der Komplex oder dessen Salze wird erhalten durch eine allgemeine Neutralisierungsreaktion eines Kobalt⁺⁺-Salzes, das dann durch Nikotinamid ersetzt wird. Es ist möglich, von verschiedenen Kobaltsalzen (organischen, wie Acetaten, oder anorganischen, wie Sulfaten, Chloriden, Nitraten und dergleichen) auszugehen und dies wird in der Praxis auch durchgeführt, je nach dem Preis, der Zugängigkeit und dergleichen. Die Bedingungen sind nicht identisch aber sehr ähnlich und als allgemeine Regel gilt, dass ein Gewichtsteil Kobaltsalz in einer kleinen Menge Wasser gelöst wird, dass diese Lösung mit Alkali, z. B. in Form von konzentriertem Natriumhydroxid zu Beginn und mit verdünntem Ammoniak zum Schluss neutralisiert wird. Das Nikotinamid wird beim Neutralisieren des Kobaltsalzes zugegeben, wodurch das Kobalt mit Nikotinamid abgesättigt wird. Das optimale Verhältnis ist zwei Äquivalente Nikotinamid auf 1 Äquivalent Kobalt, um das stöchiometrische Verhältnis von 1:2 zu erzielen. Der pH liegt dabei vorzugsweise zwischen 5,5 und 7,5, insbesondere bei 6,5.

Die unterschiedlichen Salze des Komplexes werden aus dem so gebildeten Komplex erhalten, was man durch die Farbänderung von dunkelrosa des Kobaltsalzes zum lachsfarbenen Rosa des Komplexes feststellen kann. Die Salze werden durch sorgfältiges Ansäuern (je nach dem gewünschten Anion) bis zu einem pH zwischen 4,5 und 6,5 gebildet.

Man erhält so orangefarbene Kristalle, die in ihrer Farbe sehr unterschiedlich sind von der Originalfarbe des ionischen Kobaltsalzes, entsprechend dem Salz des 1:2 Kobalt-Nikotinamid-Komplexes. Diese Verbindung kann jetzt mit einer Lösung von reduziertem Glutathion im Verhältnis 1:1 umgesetzt werden, wobei man darauf achten muss, dass die Umsetzung langsam stattfindet, um dadurch die Stabilität des Komplexes zu erhöhen. Je nach der Art des Komplexes wird durch die Umsetzung der pH erheblich verändert. In dem Masse, wie die Umsetzung stattfindet, bildet sich die braune Farbe des Endproduktes, die sich deutlich von der Orangefarbe des Zwischenproduktes unterscheidet. Die Umsetzung wird fortgesetzt, bis die braune Farbe überwiegt, und man kann dann daraus schliessen, dass die Umsetzung vollständig verlaufen ist. Aus der braunen Lösung kann man

das Endprodukt in fester Form entweder durch Gefrier-trocknung oder durch Ausfällen mit verschiedenen Volumi-na (wenigstens 2) Äthylalkohol gewinnen.

Das braunfarbene Endprodukt ist verhältnismässig stabil, und zwar sowohl in Lösung als auch in fester Form im Bereich von physiologischen pH-Werten. Das Produkt ist vollständig in Wasser löslich.

Aktivität des synthetischen GTF

Das Produkt ist biologisch aktiv, sowohl in «in-vitro»-Systemen, wobei die Aktivität durch die Freigabe von radioaktivem CO_2 bestimmt wird, welches aus ^{14}C -Glucose, die mit Fettzellen von Ratten Epididymis inkubiert wurde, bestimmt wird, sowie auch in Gegenwart von Insulin. Das neue Produkt ist auch im menschlichen Körper (in vivo) aktiv.

Die Aktivität des neuen GTF ist proportional der Konzentration am Insulin bei einer optimalen Konzentration und ist nicht aktiv in Abwesenheit von Insulin.

In der nachfolgenden Tabelle wird die Zusammensetzung des erfindungsgemäss durch chemische Synthese erhaltenen neuen GTF-Produktes mit dem Produkt, das von W. Mertz aus Brauereihefe erhalten wurde, verglichen.

Kobalt ²⁺ G.T.F. (gemäss der Erfindung)	Chrom ³⁺ G.T.F. (W. Mertz)
1) Kobalt ²⁺	1') Chrom ³⁺
2) Glutathion	2') Glycin Cystein Glutaminsäure
3) Nikotinamid	3') Nikotinsäure

Das Chrom GTF gemäss Mertz scheint ein Kunstgriff zu sein, denn seine Wirkung ist bei sehr hohen Konzentrationen verhältnismässig schwach und seine biologische Wirkung ist immer proportional der Konzentration. Seine Wirkung erinnert an die hipoglucemierende Wirkung, die man mit sehr hohen Konzentrationen von Chrom, Kobalt, Nickel oder auch anorganischem Kupfer erzielt und sein Mechanismus ist indirekt (enzymatische Inhibierung) möglicherweise durch eine Übertragungswirkung des biologisch aktiven Produktes (Kobalt).

Das erfindungsgemässe GTF (Kobalt) ist aktiv in vitro bei derartig niedrigen Konzentrationen, wie $4\text{m} \times 10^{-8}$, wobei das Optimum (bei sehr hohen Insulinkonzentrationen) etwas höher liegt; bei etwas höheren Konzentrationen inhibiert es und seine Wirkung ist proportional der Insulinkonzentration, wobei das GTF in Abwesenheit dieses Hormons inaktiv ist.

Das Molekulargewicht der aktiven Verbindung, bestimmt durch Gel-Teilung (Polyacrylamid) entspricht einem Molekulargewicht oberhalb 1500, woraus man schliessen kann, dass es nicht eine einfache Verbindung aus einem Teil Kobalt, zwei Teilen Nikotinamid und einem Teil Glutathion ist, sondern aus wenigstens zwei Molekülen besteht, oder sogar ein Tetrameres darstellt. Es hat daher eine sehr komplizierte Struktur, aber es ist eine genau definierte Verbindung mit einer sehr spezifischen biologischen Aktivität.

Trotz der Tatsache, dass die Nikotinamid-Kobalt-Komplexe einiger sowjetischer Autoren erhebliche Unterschiede zu dem als Zwischenprodukt auftretenden Nikotinamid-Kobalt-Komplex der Erfindung zeigen, weil die Herstellung, die Farbe, die Stabilität und die Löslichkeit verschieden sind, liegt keine ausreichende Sicherheit vor, dass der als Zwischenprodukt gebildete Nikotinamid-Kobalt-Komplex neu ist. Dagegen kann mit Bestimmtheit gesagt werden, dass der Endkomplex aus Glutathion, Kobalt und Nikotinamid original und neu ist.

Herstellungsbeispiel

300 g Kobaltacetat wurden in 200 ml destilliertem Wasser bei 35 °C gelöst und mit dieser Lösung wurden bei 35 °C 250 g Nikotinamid umgesetzt. Der pH der Lösung wurde durch Zugabe von 2m einer KOH-Lösung bis zur Einstellung eines pH von nahe 6,5 reguliert, wobei die dunkelrosa Färbung in eine helle lachsrosa Färbung überging. Die Umsetzung wurde durch Erhitzen auf 80 °C weitergeführt. Die hellrosa Suspension wurde mit 1n HCl angesäuert bis zu einem pH von 4,4 und die entstehenden Kristalle mit einer hellorangenen Farbe wurden langsam abgetrennt. Diese Kristalle wurden langsam mit 300 g reduziertem Glutathion bei einem pH von 4,7 umgesetzt, wobei die Mischung allmählich eine braune Farbe annahm, die an Intensität zunahm, bis zu einer sehr intensiven Braunfärbung. Eine Überwachung der Beendigung der Umsetzung war möglich einerseits durch die Stabilität der erwähnten intensiven braunen Färbung und andererseits durch das Fortfallen des charakteristischen unangenehmen Geruches von Glutathion (ein Geruch, der an Küken erinnert). Nach dem Ausfrieren wurde das Endprodukt durch Lyophilisierung gewonnen.

Biologischer Test

Die trockene GTF-Verbindung wurde nach der Robdell-Methode getestet: Fettzellen der Epididymides von Sprague-Ratten wurden in Gegenwart von Insulin mit ^{14}C -Glukose bei einer Konzentration in der Nähe von $5\text{m} \times 10^{-7}$ GTF inokuliert. Die Entwicklung von $^{14}\text{CO}_2$ wurde mit einem β -Zähler gemessen. Es wurde festgestellt, dass die durch GTF gebildete Stimulierung eine Erhöhung von nahezu 450% der Insulinwirkung ergab. Weiterhin wurde festgestellt, dass GTF nicht aktiv war, wenn Insulin nicht vorhanden ist.