

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 238**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

C12P 7/66 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 27/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2012** **PCT/JP2012/065303**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012** **WO12173217**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012** **E 12800143 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017** **EP 2722331**

54 Título: **Cristal de sal disódica de pirroloquinolina quinona y procedimiento para su fabricación**

30 Prioridad:

16.06.2011 JP 2011134279

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.01.2018

73 Titular/es:

MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.
(100.0%)

5-2, Marunouchi 2-chome Chiyoda-ku
Tokyo 100-8324, JP

72 Inventor/es:

IKEMOTO KAZUTO y
SAKAMOTO HITOSHI

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 651 238 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cristal de sal disódica de pirroloquinolina quinona y procedimiento para su fabricación

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a un cristal de sal disódica de pirroloquinolina quinona y a un procedimiento para producir el mismo.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Se ha propuesto la pirroloquinolina quinona (en lo sucesivo denominada a veces como "PQQ") como una posible nuevo vitamina (véase, por ejemplo, el documento no de patente 1). Además, la PQQ está presente no sólo en las bacterias, sino también en mohos eucariotas y levaduras y juega un papel importante como coenzima. También, la PQQ se ha encontrado que tienen muchas actividades fisiológicas, tales como la actividad promotora del crecimiento celular, la actividad anti-catarata, la actividad de prevención y terapéutica de la enfermedad hepática, la actividad de curación de heridas, la actividad antialérgica, la actividad inhibidora de la transcriptasa inversa, la actividad de inhibición de glioxalasa I y la actividad contra el cáncer, y similares. Por lo tanto, la PQQ ha llamado mucho la atención como un material útil en los campos de productos farmacéuticos, alimentos y cosméticos. En el campo de los productos farmacéuticos, se espera que la PQQ pueda ser aplicada como agente terapéutico para enfermedades cardíacas (Documento de Patente 1), dermatosis (Documento de Patente 2), y enfermedades neurodegenerativas (Documento de Patente 3), por ejemplo. También se espera que la PQQ pueda ser aplicada como una sustancia que tiene un efecto antienvjecimiento en el campo de los alimentos y que tiene un efecto embellecedor de la piel en el campo de la cosmética.

[0003] La PQQ puede producirse por metodologías, tales como síntesis químicas orgánicas y procesos de fermentación y, a menudo se proporciona en forma de un cristal de sal de metal alcalino, en particular un cristal de sal disódica (en lo sucesivo denominado a veces "cristal disódico"). El cristal disódico de PQQ está en forma de pentahidrato cristalino, y el análisis de un cristal ha revelado la estructura del cristal disódico (Documento que no es de Patente 1). Además del procedimiento descrito en el Documento que no es de Patente 1, los procedimientos descritos para producir el cristal disódico de PQQ incluyen el ajuste del pH de una solución de disódico de PQQ para cristalizar disódico de PQQ (Documento de Patente 4) y precipitación usando un disolvente orgánico acuoso para precipitar el cristal disódico de PQQ de la solución acuosa (Documento de Patente 5). Cualquiera de estos procedimientos, sin embargo, produce un sólido que tiene un bajo grado de cristalinidad o utiliza un disolvente no comestible. Además, el cristal producido no siempre tiene una alta capacidad de conservación.

[0004] Cuando se aplica a productos farmacéuticos y cosméticos, se desea que la PQQ tenga un alto grado de cristalinidad, contenga pocas impurezas, tenga una solubilidad estable o una alta dispersabilidad en un disolvente, y tenga un alto grado de capacidad de conservación. Cuando se aplica a alimentos y productos farmacéuticos, también se desea que la PQQ no sea dañina para el cuerpo humano. Cuando se aplica a los productos farmacéuticos y cosméticos para la piel, se desea además que la PQQ tenga un alto grado de permeabilidad a través de la piel.

Documentos de la técnica anterior

[Documento de patente]

[0005]

[Documento de patente 1] Publicación de solicitud de patente japonesa no examinada No. 2005-530786

[Documento de patente 2] Publicación de solicitud de patente japonesa no examinada No. 2011-246442

[Documento de patente 3] Publicación de solicitud de patente japonesa no examinada No. 2007-269769

[Documento de patente 4] WO 2011/007633

[Documento de patente 5] Publicación de solicitud de patente japonesa examinada No. H07-113024

[Documento que no es de patente]

[0006] [Documento que no es de patente 1] Ishida, T. y otros, "Molecular and cristal structure of PQQ (methoxatin), a novel coenzyme of quinoproteins: extensive stacking carácter and metal ion interaction", Journal of American Chemical Society, 1989, Vol. 111, pág. 6.822-6.828.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[Materia a resolver por la invención]

[0007] Un objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo cristal disódico de PQQ que tenga una excelente dispersabilidad en un disolvente y una excelente permeabilidad a través de la piel y sea útil en los campos de productos farmacéuticos, cosméticos o alimentos, y un procedimiento para producir el mismo con alta eficacia.

5 [Solución al problema]

[0008] Los presentes inventores han encontrado que un cristal disódico de PPQ se puede preparar en condiciones específicas para producir el cristal disódico de PQQ en nuevas formas cristalinas (forma cristalina 1 y forma cristalina 2). Específicamente, los presentes inventores han encontrado que un cristal disódico de PQQ tiene estabilidad al calor en el aceite de alimentos, y han encontrado además que cuando se calienta en aceite de alimentos, se proporciona un cristal disódico de PQQ en una buena forma cristalina 1 y forma cristalina 2 en un tiempo corto. Los presentes inventores también han encontrado que el cristal disódico de PQQ en forma cristalina 1 y forma cristalina 2 tiene un alto grado de dispersabilidad en aceites, y tiene un alto grado de permeabilidad a través de la piel. La presente invención se basa en estos descubrimientos.

[0009] La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La descripción siguiente está sujeta a esta limitación. Todos los aspectos y realizaciones que no estén cubiertas por las reivindicaciones son meramente aspectos de la presente descripción y no forman parte de la invención.

[0010] El cristal disódico de PQQ, según la presente invención, no sólo tiene una alta pureza, sino que también mejora la dispersabilidad en una solución y la permeabilidad a través de la piel y, por lo tanto, es útil como ingrediente de cosméticos, productos farmacéuticos o alimentos funcionales.

Breve descripción de los dibujos

[0011]
La figura 1 muestra los resultados de difracción de rayos X en polvo para un cristal disódico de PQQ (forma cristalina 1).
La figura 2 muestra los resultados de difracción de rayos X en polvo cuando se cambia la temperatura en la etapa de secado.
La figura 3 muestra los resultados de difracción de rayos X en polvo para el cristal disódico de PQQ preparado por precipitación con etanol.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0012] El cristal disódico de PQQ según la presente invención tiene un bajo contenido de agua (en lo sucesivo denominado a veces "cristal de bajo contenido de agua"). Específicamente, el cristal disódico de PPQ según la presente invención tiene un contenido de agua del 4,6% o menos, y preferiblemente del 3% o menos. El cristal disódico de PPQ según la presente invención está en forma cristalina 1 o forma cristalina 2 descritas en esta memoria descriptiva, y puede ser una mezcla de al menos un cristal seleccionado de cristales en forma cristalina 1, forma cristalina 2, y otras formas cristalinas. No es particularmente problemático en el uso que pueden estar mezclados el cristal disódico de PQQ en forma cristalina 1 o forma cristalina 2 según la presente invención, por ejemplo, con un cristal que es un precursor del cristal disódico de PPQ según la presente invención (en lo sucesivo denominado a veces simplemente "cristal precursor").

[0013] El cristal disódico de PQQ, según la presente invención es un cristal disódico de PQQ (forma cristalina 1) que tiene picos de ángulo 2θ en $11,4 \pm 0,4$, $13,5 \pm 0,4$, $18,0 \pm 0,4$, $18,7 \pm 0,4$, $26,0 \pm 0,4$ y $28,5 \pm 0,4^\circ$ obtenido por difracción de rayos X en polvo usando una radiación Cu K α . Estos picos pueden observarse en un difractómetro de rayos X en polvo común equipado con un monocromador. Puesto que los datos medidos también incluyen un error de medición, la forma cristalina definida por la presente invención es una forma cristalina que tiene la identidad racional sobre el ángulo de los picos.

[0014] El cristal disódico de PQQ, según la presente invención, es preferiblemente un cristal disódico de PQQ (forma cristalina 2) que tiene picos de ángulo 2θ en $8,7 \pm 0,4$, $11,5 \pm 0,4$, $12,0 \pm 0,4$, $17,4 \pm 0,4$ y $18,7 \pm 0,4^\circ$ obtenido por difracción de rayos X en polvo usando una radiación Cu K α . En la medición de difracción de polvo, la forma cristalina 1 como un cristal de bajo contenido de agua se puede observar en las condiciones de medición habituales (a temperatura normal), mientras que la forma cristalina 2 no se puede observar en el entorno de humedad habitual, pero se requiere ser medida en un entorno de un estado de alta temperatura de 180°C o más, o en la atmósfera seca.

[0015] El cristal disódico de PQQ, según la presente invención se produce por un procedimiento que comprende una etapa de producción de un cristal precursor del cristal disódico de PPQ según la presente invención y secado del cristal precursor. El cristal precursor de un cristal disódico de PQQ como se usa en la presente invención se refiere a un cristal disódico de PQQ que tiene un contenido de agua de más del 4,6% y preferiblemente más del 7%. En la presente invención, el cristal precursor de un cristal disódico de PQQ tiene preferiblemente un contenido de agua del 14% o menos.

[0016] Como material de partida para el cristal disódico de PPQ según la presente invención, se puede utilizar una sal sódica de PQQ (es decir, una sal monosódica de PQQ, una sal disódica de PQQ y una sal trisódica de PQQ) y se prefiere PQQ trisódica. La sal sódica de PQQ puede contener cloruro de sodio como impurezas que pueden incluirse durante un proceso de producción, y estas impurezas puede ser eliminadas de manera adecuada en el proceso de producción de la presente invención para mejorar la pureza del producto. El cristal precursor de un cristal de sal disódica de PQQ se puede cristalizar mediante la adición de una sal disódica de PQQ (por ejemplo, un sólido de sal sódica de PQQ) en una solución acuosa con concentración de etanol o isopropanol de 10 a 90% en peso en las condiciones en las que el sólido de la sal sódica de PQQ no se disuelve completamente (es decir, condiciones en las que la solución se satura con la sal sódica de PQQ), y el ajuste del pH de la solución al intervalo de 2 a 5 mediante la adición de un ácido a la solución. La concentración de etanol o isopropanol en la solución acuosa es preferiblemente del 35 al 65% en peso. Las condiciones en las que la sal sódica de PQQ no se disuelve por completo (es decir, condiciones en las que la solución se satura con PQQ) varían dependiendo de la concentración del alcohol usado. Cuando se utiliza una sal trisódica de PQQ como una sal sódica de PQQ, la concentración de PQQ trisódica es de 0,5 a 800 g/l, más preferiblemente de 0,5 a 100 g/L, y aún más preferiblemente de 5 a 60 g/L. La mayor concentración del alcohol utilizado permite el uso de una solución que tiene una menor concentración de PQQ en este proceso. Específicamente, cuando la solución acuosa es una solución acuosa de etanol al 50%, la concentración de PQQ trisódica a utilizar es de 1 a 200 g/L. También el pH de la solución acuosa se puede ajustar más preferiblemente a un intervalo de 2,5 a 3,5.

[0017] El cristal precursor puede producirse mediante el ajuste del pH de la solución acuosa a un valor predeterminado seguido de reacción durante 0,1 a 96 horas. La reacción puede llevarse a cabo durante 6 a 72 horas para la producción de cristales grandes. Además, la reacción puede llevarse a cabo a una temperatura de 0 a 90°C, y más preferiblemente de 10 a 60°C. Las condiciones para la cristalización se pueden seleccionar libremente en vista de los efectos de la presencia y la intensidad de agitación sobre la calidad del cristal producido.

[0018] El cristal precursor resultante puede obtenerse por filtración, centrifugación y decantación. Esta sustancia puede lavarse con un alcohol para proporcionarse como un cristal precursor. Alternativamente, el cristal precipitado se puede proporcionar como un cristal precursor ya que es sin tales operaciones de separación. El cristal precursor resultante es preferiblemente un cristal disódico de PQQ que tiene picos ángulo 2θ en $9,1 \pm 0,4$, $10,3 \pm 0,4$, $13,8 \pm 0,4$, $17,7 \pm 0,4$, $18,3 \pm 0,4$, $24,0 \pm 0,4$, $27,4 \pm 0,4$, y $39,5 \pm 0,4^\circ$ obtenido por difracción de rayos X en polvo usando una radiación Cu K α , y preferiblemente contiene 12,7% de agua como agua de cristalización.

[0019] En el procedimiento de producción, según la presente invención, el cristal precursor de cristal disódico de PQQ se cristaliza, seguido de secado del cristal precursor. Esto puede dar lugar al cristal disódico de PPQ, según la presente invención. Específicamente, el cristal precursor puede ser secado por liofilización, secado ambiental o secado al vacío. En la etapa de secado, el ajuste de las condiciones de secado, tales como el tiempo de secado y la temperatura de secado, pueden promover el cambio en la forma cristalina desde el cristal precursor al cristal disódico de PQQ en forma cristalina 1 o la forma cristalina 2 para producir el cristal disódico de PPQ, según la presente invención. La temperatura de secado varía dependiendo del procedimiento, y es, por ejemplo, de -80 a 250°C, y preferiblemente de -60 a 250°C. El límite inferior de la temperatura de secado es la temperatura de partida en la liofilización, y el límite superior de la temperatura de secado es una temperatura a la que no se produce la descomposición de PQQ disódica. Por ejemplo, la temperatura de secado puede ser de -80 a 0°C, y preferiblemente de -60 a 0°C en la liofilización, de 40 a 250°C en el secado ambiente, y de 0 a 250°C en el secado al vacío. Más específicamente, para la obtención del cristal disódico de PQQ en forma cristalina 1, el secado al vacío puede llevarse a cabo, por ejemplo, por secado a 50°C durante 70 horas o más, y el secado ambiente puede llevarse a cabo por calentamiento a 120°C o más y menos de 180°C durante 30 minutos o más, sin limitación. Para obtener el cristal disódico de PQQ en forma cristalina 2, el secado ambiente puede llevarse a cabo, por ejemplo, a 180°C o más durante 30 minutos o más. Cabe indicar que la PQQ disódica en forma cristalina 1 experimenta transición de fase bajo presión atmosférica a 180°C a la forma cristalina 2. Por lo tanto, la PQQ disódica en forma cristalina 2 también se puede producir preparando en primer lugar la forma cristalina 1, y sometiendo después el cristal a transición de fase. Además, la etapa de secado se puede detener basándose en el contenido de agua en el cristal como un índice. Por ejemplo, el secado en la presente invención se puede detener cuando el contenido de agua en el cristal como un índice es del 7% en peso o menos, preferiblemente el 4,6% en peso o menos, y más preferiblemente el 3% en peso o menos. El grado de descomposición de la PQQ disódica puede variar en función del entorno circundante, y el secado se lleva a cabo preferiblemente en una atmósfera de gas nitrógeno en comparación con una atmósfera habitual desde el punto de vista de reducción de la descomposición. También en una atmósfera de gas nitrógeno, la temperatura de secado puede ser más alta que en una atmósfera habitual, por lo que el tiempo de secado se puede acortar.

[0020] En una realización más preferida del procedimiento, según la presente invención, el secado del cristal precursor puede llevarse a cabo mediante el calentamiento del precursor en un aceite (por ejemplo, friendo el precursor en un aceite). Cuando el cristal precursor se calienta en un aceite, desde el punto de vista del progreso del cambio de forma cristalina 1 o forma cristalina 2, la temperatura de calentamiento es preferiblemente de 120 a 200°C bajo presión normal. Con el fin de obtener el cristal disódico de PQQ en forma cristalina 1, la temperatura del aceite puede ser, pero no se limita a, 120°C o más y menos de 180°C, por ejemplo, mientras que con el fin de obtener el

crystal disódico de PQQ en forma cristalina 2, la temperatura del aceite puede ser mayor, es decir, de 180 a 200°C. La temperatura de calentamiento puede exceder de 200°C, a menos que el aceite arda o el cristal disódico de PQQ se descomponga. El tiempo de calentamiento es preferiblemente de 30 minutos o más. Se puede utilizar cualquier aceite comestible, incluyendo aceites comestibles, tales como aceite de soja, aceite de ácido graso de cadena media, aceite de maíz, aceite de pescado, aceite de oliva, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de pescado y aceite de coco. Se puede utilizar una mezcla de un aceite y un cristal disódico de PQQ obtenido en este proceso como está como una suspensión del cristal disódico de PQQ que tiene un bajo contenido de agua, por ejemplo, para cápsulas blandas, o se puede usar después de extraer el aceite usando hexano. Hasta el momento, la PQQ ha sido conocida por su alta reactividad, pero no por su estabilidad al calor en los aceites comestibles. Según la presente invención, el cristal disódico de PQQ tiene estabilidad a alta temperatura, y se convierte de forma inesperada en una nueva forma cristalina 1 o la forma cristalina 2 por calentamiento. El calentamiento del cristal precursor en los aceites es ventajoso en que el cristal disódico de PQQ en forma cristalina 1 o la forma cristalina 2 se puede obtener en un tiempo corto.

[0021] El cristal disódico de PQQ en forma cristalina 1 y forma cristalina 2 según la presente invención tiene un alto grado de dispersabilidad en un aceite comestible, y tiene un alto grado de permeabilidad a través de la piel. Por otra parte, el cristal disódico de PQQ en forma cristalina 1 y forma cristalina 2, según la presente invención, tiene un bajo contenido de agua, y puede tener un alto grado de capacidad de conservación. Además, el cristal disódico de PQQ producido, según la presente invención, tiene una ventaja de alta pureza, ya que es un cristal. Además, el cristal disódico de PQQ en forma cristalina 2 es relativamente higroscópico en una atmósfera húmeda, y por lo tanto se conserva preferiblemente en una atmósfera seca.

[0022] Por consiguiente, el cristal disódico de PPQ, según la presente invención, puede usarse adecuadamente como un alimento, alimento funcional, nutrientes, cosméticos, productos farmacéuticos o cuasi fármaco para humanos o animales. Un alimento funcional como se usa en el presente documento significa un alimento tomado con el propósito de mantenimiento de la salud o la nutrición como una alternativa a una comida, como un alimento saludable, suplementos nutricionales, alimentos con demandas de función de nutrientes y alimentos saludables de nutrientes, y comida saludable específica. La forma específica para un alimento, alimento funcional, nutrientes, cosméticos, farmacéuticos o cuasi-fármacos incluye, pero no se limita a, cápsulas (por ejemplo, una cápsula de gelatina, una cápsula blanda), comprimidos, productos masticables, comprimidos y bebidas de suplemento nutritivas. El cristal disódico de PQQ en forma cristalina 1 y forma cristalina 2, según la presente invención, tiene un bajo contenido de agua, y por lo tanto es ventajoso para el moldeo del comprimido y la conservación. Como se describió anteriormente, el cristal disódico de PQQ en forma cristalina 1 y la forma cristalina 2 según la presente invención también tiene una excelente dispersabilidad en aceites y grasas, y una excelente permeabilidad a través de la piel. Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, una composición cosmética, un alimento funcional y un nutriente que comprenden el cristal disódico de PQQ, según la presente invención. En particular, el cristal según la presente invención tiene una excelente permeabilidad a través de la piel, y por lo tanto la composición farmacéutica de la presente invención puede ser una composición farmacéutica para la administración percutánea. Además, el cristal de la presente invención tiene una excelente dispersabilidad en aceites y grasas, y por lo tanto, es adecuado para la prescripción para las formulaciones de dispersión en aceite. Por lo tanto, la composición farmacéutica y la composición cosmética, según la presente invención, se pueden proporcionar en forma de una formulación de dispersión como una emulsión o una suspensión, la forma de una formulación semisólida como una pomada o una crema, o la forma de una formulación formada como una cápsula blanda.

[0023] Cuando el cristal disódico de PPQ, según la presente invención se prepara como un alimento funcional, se puede utilizar un aditivo, incluyendo, por ejemplo, un edulcorante, un colorante, un conservante, un agente espesante, un antioxidante, un fijador del color, un agente de blanqueo, un agente antibacteriano y antifúngico, una base de goma, un agente de amargor, una enzima, un agente de recubrimiento, un agente de acidificación, un condimento, un emulsionante, un enriquecedor, un agente de fabricación, un agente aromatizante y un extracto de especias. Además, el cristal disódico de PPQ, según la presente invención, se puede añadir típicamente a los alimentos habituales, por ejemplo, miso, salsa de soja, sopa de miso instantánea, ramen, tallarines fritos, curry, sopa de maíz, mapo dofu, berenjena estilo mapo, salsa de pasta, pudín, pasteles y pan. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener el cristal disódico de PPQ, según la presente invención, y al menos un aditivo de formulación. La composición cosmética de la presente invención puede contener el cristal disódico de PPQ, según la presente invención, y al menos un aditivo cosmético. Una persona experta en la técnica seleccionará adecuadamente el aditivo de formulación y el aditivo cosmético según la forma de la prescripción de la composición farmacéutica y composición cosmética, respectivamente.

EJEMPLOS

[0024] La presente invención se describirá ahora en más detalle con referencia al siguiente Ejemplo de referencia, ejemplos y ejemplo comparativo, pero no pretende estar limitado a los mismos.

[0025] La medición de difracción de rayos X en polvo se lleva a cabo usando M18XCE de Mac Science Co., Ltd. o RINT2500 de Rigaku Corporation, bajo las siguientes condiciones.

Rayos X: Cu/tensión de tubo de 40 kV/corriente de tubo de 100 mA
 Velocidad de rastreo: 4.000°/min
 Anchura de muestreo: 0,020°.

- 5 **[0026]** El contenido de agua (% en peso) de cada cristal se determinó por el procedimiento de Karl Fischer.

Ejemplo de Referencia 1: cristal precursor

- 10 **[0027]** Según la descripción en la patente japonesa nº 2751183, el PQQ trisódico como material de partida se preparó por cultivo. Se añadió el sólido (60 g) de sal trisódica de PQQ hidratada que contenía PQQ (20 g) a una solución acuosa (1 L) que tenía una concentración de etanol del 50% en peso y la solución acuosa se saturó. En este momento, el sólido no se disolvió completamente. El pH de la mezcla se ajustó a 3,5 por adición de ácido clorhídrico a la mezcla a temperatura ambiente. Se añadió lentamente el ácido clorhídrico gota a gota durante aproximadamente dos horas. Después de la adición de ácido clorhídrico, la mezcla se agitó durante dos días, y a continuación la solución acuosa de etanol resultante se filtró para preparar un cristal disódico de PQQ hidratado (rendimiento: 99% en moles). La medición de la difracción de rayos X en polvo reveló que el cristal resultante tenía picos de ángulo 2θ en $9,1 \pm 0,4$, $10,3 \pm 0,4$, $13,8 \pm 0,4$, $17,7 \pm 0,4$, $18,3 \pm 0,4$, $24,0 \pm 0,4$, $27,4 \pm 0,4$, y $39,5 \pm 0,4^\circ$. Después de disponer el cristal resultante en un entorno de una temperatura de 40°C y una humedad relativa (RH) del 75%, se midió el contenido de agua. Se demostró que el cristal resultante tiene un contenido de agua del 12,7% y una pureza del 87,3%.

Ejemplos 1: Forma cristalina 1

- 25 **[0028]** El cristal precursor preparado en el Ejemplo de Referencia 1 se puso en un secador de vacío (Advantech Co., Ltd., nombre del producto: FS-420), se despresurizó mediante una bomba de vacío de tipo diafragma (DRYFAST ULTRA producido por A Gardner Denver, Producto número: 2.032) hasta el límite del dispositivo (2 Torr), y se secó a 50°C durante 77 horas.

- 30 **[0029]** La medición de la difracción de rayos X en polvo reveló que el cristal resultante era un cristal disódico de PQQ (forma cristalina 1) que tenía los picos de ángulo 2θ en $11,4 \pm 0,4$, $13,5 \pm 0,4$, $18,0 \pm 0,4$, $18,7 \pm 0,4$, $26,0 \pm 0,4$ y $28,5 \pm 0,4^\circ$ (Figura 1). Como se muestra en la figura 1, el cristal disódico de PQQ preparado en este ejemplo fue un cristal en una nueva forma cristalina (Forma cristalina 1) que es diferente de la forma cristalina del cristal precursor que tiene un alto contenido de agua. La medición del contenido de agua demostró que el cristal resultante tenía un contenido de agua del 0,7%, y que el contenido de agua del cristal se redujo significativamente en comparación con el del cristal precursor. El cristal resultante tenía una pureza del 99,3%.

Ejemplo 2: Forma cristalina 1

- 40 **[0030]** El cristal precursor preparado en el Ejemplo de Referencia 1 se puso en un secador de vacío (Advantech Co., Ltd., nombre del producto: FS-420), y se secó a presión atmosférica a 120°C durante un día. La medición de la difracción de rayos X en polvo reveló que el cristal resultante estaba en una forma cristalina idéntica a la forma cristalina 1 preparada en el Ejemplo 1. La medición del contenido de agua demostró que el cristal resultante tenía un contenido de agua del 2,2%, y una pureza del 97,8%.

45 Ejemplo 3: Forma cristalina 1 (en aceite a 150°C durante 0,5 horas)

- 50 **[0031]** Se añadió el cristal precursor (9,6 g) preparado en el Ejemplo de Referencia 1 a un aceite comestible ODO (65 g) producido por Nisshin OilIO, y se calentó (frió) la mezcla a 150°C durante 30 minutos. La medida de difracción de rayos X en polvo reveló que el cristal resultante estaba en una forma cristalina idéntica a la forma cristalina 1 preparada en el Ejemplo 1. Aunque el tiempo de calentamiento fue más corto que en los Ejemplos 1 y 2, el cristal precursor se calentó en aceite para preparar la forma cristalina 1 en un tiempo corto.

- 55 **[0032]** La cromatografía líquida de alto rendimiento para el cristal preparado reveló que la cantidad de impurezas contenidas en el cristal no aumentaron, y que el cristal preparado tenía una pureza de 99% o más. La medición del contenido de agua demostró que el cristal resultante tenía un contenido de agua del 1,9%. Aunque el tiempo de calentamiento fue más corto que en los Ejemplos 1 y 2, el contenido de agua del cristal preparado se redujo significativamente, y fue equivalente al contenido de agua para el Ejemplo 1 o 2.

Ejemplo 4: Mezcla de cristales con un contenido de agua del 7%

- 60 **[0033]** El cristal precursor preparado en el Ejemplo de Referencia 1 se puso en un secador de vacío, fue evacuado mediante una bomba de vacío de tipo diafragma (DRYFAST ULTRA producida por A Gardner Denver, número de producto: 2032) hasta el límite del dispositivo (2 Torr), y a continuación se secó a 50°C durante 22 horas.

- 65 **[0034]** La medición del polvo de la difracción de rayos X reveló que el cristal resultante era una mezcla del cristal disódico de PQQ en forma cristalina 1 que tiene picos de ángulo 2θ en $11,4 \pm 0,4$, $13,5 \pm 0,4$, $18,0 \pm 0,4$, $18,7 \pm 0,4$,

26,0 ± 0,4 y 28,5 ± 0,4° y el cristal precursor obtenido en el Ejemplo de Referencia 1. La medición del contenido de agua demostró que el cristal resultante tenía un contenido de agua de 7%, y tenía una pureza de 93%. A continuación, la mezcla de cristal resultante se convirtió secuencialmente al cristal en forma cristalina 1 mediante la reducción del contenido de agua (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1 en el que el secado se llevó a cabo en las mismas condiciones durante 77 horas).

Ejemplo 5: Relación entre la temperatura de calentamiento y la forma cristalina preparada

[0035] La relación entre la temperatura de calentamiento en el proceso de secado y la forma cristalina preparado se investigó en este ejemplo.

[0036] El cristal precursor preparado en el Ejemplo de Referencia 1 se calentó a una velocidad de cambio de temperatura de 20°C/min, y la medición se inició 15 minutos después de que la temperatura alcanzara las respectivas temperaturas preestablecidas. Difracción de rayos X en polvo: 5 a 60°, 4°/min.

[0037] Se investigó la forma cristalina del cristal a cada una de las temperaturas preestablecidas y se demostró que: cuando la temperatura establecida era de 30°C, el cristal resultante era similar al cristal precursor; cuando la temperatura establecida era de 120°C, el cristal resultante se produjo como una mezcla del cristal precursor y la forma cristalina 1, que es similar a la mezcla de cristales en el Ejemplo 4 que tiene un contenido de agua del 7%; cuando la temperatura establecida era de 150°C, el cristal resultante era un cristal en forma cristalina 1; y cuando la temperatura establecida era de 180°C, los cristales resultantes fueron un cristal disódico de PQQ en una nueva forma cristalina (Forma cristalina 2) que tenía picos de ángulo 2θ en 8,7 ± 0,4, 11,5 ± 0,4, 12,0 ± 0,4, 17,4 ± 0,4, y 18,7 ± 0,4°. Los resultados de la difracción de rayos X en polvo para el cristal tratado a cada temperatura se muestran en la figura 2. El análisis termogravimétrico para el cristal en forma cristalina 2 reveló que el contenido de agua del cristal en forma cristalina 2 era casi el 0%. Sin embargo, este cristal era inestable. Cuando se dejó el cristal reposar a 30°C durante un tiempo (por ejemplo, medio día o más), absorbió agua y se volvió a un cristal en la forma cristalina similar a la del cristal precursor (Figura 2).

Ejemplo Comparativo 1: Cristal disódico de PQQ diferente del Ejemplo de Referencia 1

[0038] El cristal precursor en el Ejemplo de Referencia 1 se disolvió en agua, y se añadió etanol a la solución para precipitar un cristal disódico de PQQ rojo. La medición del contenido de agua demostró que el cristal resultante tenía un contenido de agua del 14,5%. Posteriormente, el cristal resultante se secó a una presión reducida durante 96 horas de una manera similar al Ejemplo 1 y se sometió a una medición de difracción de rayos X en polvo. Sin embargo, se encontró que el cristal preparado por este procedimiento tenía una estructura con un bajo grado de cristalinidad con picos de ángulo 2θ en 9,4 y 22,4°. (Figura 3). La medición del contenido de agua demostró que el cristal resultante tenía un contenido de agua del 9,6%, y una pureza del 90,4%.

Ejemplo 6: Prueba de Dispersabilidad para los cristales disódicos de PQQ en forma cristalina 1 y forma cristalina 2

[0039] En este ejemplo, el cristal disódico de PQQ en forma cristalina 1 y forma cristalina 2 se comparó en la dispersabilidad en aceites comestibles con los cristales convencionales.

[0040] En primer lugar, los cristales disódicos de PQQ en forma cristalina 1 y forma cristalina 2 se prepararon de la siguiente manera: Un cristal en forma cristalina 1 se preparó añadiendo el cristal precursor (3 g) de la sal disódica de PQQ obtenida en el Ejemplo de referencia 1 a una recipiente de vidrio, evacuando mediante una bomba de vacío de tipo diafragma (DRYFAST ULTRA producida por A Gardner Denver, número de producto: 2032) hasta el límite del dispositivo (2 Torr) y, a continuación, secando a 150°C durante 4 horas a una reducida presión para producir un sólido marrón oscuro. Después del secado, la presión en el recipiente volvió a la presión atmosférica, e inmediatamente el recipiente de vidrio se cerró con una tapa. Un cristal en forma cristalina 2 se preparó añadiendo el cristal precursor (3 g) de la sal disódica de PQQ obtenida en el Ejemplo de Referencia 1 a un matraz en forma de berenjena de 200 ml, y calentando a 200°C durante 4 horas bajo reflujo con gas nitrógeno a una velocidad de flujo de 100 ml/min para producir un sólido marrón oscuro. Después del secado, la temperatura dentro del matraz se redujo a temperatura ambiente con gas nitrógeno bajo reflujo. En este ejemplo, se utilizó el cristal disódico de PQQ (cristal precursor) en el Ejemplo de Referencia 1 como control.

[0041] Cada uno (5 mg) de los cristales resultantes (el cristal precursor, el cristal en forma cristalina 1 y el cristal en forma cristalina 2) se añadió a aceite de soja (200 µL), y las mezclas se transfirieron a un recipiente de polipropileno y se mezclaron vigorosamente. A continuación, se les permitió reposar a temperatura ambiente, y se midió el período de tiempo hasta que todos los cristales que flotaban en el aceite de soja precipitaron en la parte inferior del recipiente, lo que se usó como un índice de la dispersabilidad para cada cristal.

[0042] Los resultados se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

	tiempo de precipitación (min)
forma cristalina 1	30
forma cristalina 2	45
Cristal precursor	0,5

[0043] Como se muestra en la Tabla 1, para el cristal precursor, todos los cristales se precipitaron en la parte inferior del recipiente en 0,5 minutos, mientras que los cristales en forma cristalina 1 y forma cristalina 2 necesitaron 30 minutos y 45 minutos para precipitar, respectivamente. Esto indicó que los cristales en la forma cristalina 1 y la forma cristalina 2 habían mejorado dispersabilidad en aceites y grasas comestibles sobre el cristal precursor. La Tabla 1 muestra que la dispersabilidad de los cristales en forma cristalina 1 y la forma cristalina 2 en los aceites y grasas comestibles mejoró 50 veces o más que la del cristal precursor.

[0044] Típicamente, en la producción de cápsulas blandas, se mezcla un ingrediente eficaz y se formula con aceites y grasas comestibles. El bajo contenido de agua del cristal disódico de PQQ según la presente invención tiene un mayor grado de dispersabilidad que la del cristal convencional, y se cree que es adecuado para la producción de formulaciones de cápsulas blandas, por ejemplo.

Ejemplo 7: Prueba de permeabilidad de los cristales disódicos de PQQ en forma cristalina 1 y forma cristalina 2 a través de la piel

[0045] En este ejemplo, los cristales disódicos de PPQ en forma cristalina 1 y forma cristalina 2 preparados en el Ejemplo 6 se compararon con el cristal precursor en la permeabilidad a través de la piel.

[0046] Los cristales disódicos de PQQ en forma cristalina 1 y forma cristalina 2 preparados en el Ejemplo 6 y el cristal precursor obtenido en el Ejemplo de Referencia 1 se mezclaron cada uno con polvo de ácido L-ascórbico (de Wako, grado especial) en una relación en peso de 1:4 para preparar composiciones para la prueba, y las composiciones se utilizaron para la prueba de permeabilidad. El polvo de ácido L-ascórbico se utilizó como control.

[0047] La prueba de permeabilidad se realizó usando piel de cerdo. La piel de cerdo se lavó con agua corriente y el agua fue eliminada por completo. Esta piel de cerdo se puso en contacto con cada una de las composiciones para la prueba (5 mg) y, a continuación, se fijó a la piel con cinta adhesiva. Después de 80 minutos, se extrajo la cinta, y la piel se lavó con agua corriente, seguido de la eliminación de las composiciones para las pruebas adheridas a la superficie de la piel. El grado de permeabilidad del cristal de PQQ a la piel se evaluó sobre la base del grado de coloración de la piel. En concreto, en este ejemplo, se evaluó mediante la captura de la fotografía de la piel después de las pruebas en un ordenador, y midiendo el cambio en el brillo de la piel utilizando un software de procesamiento de imágenes (Nombre del producto: Paint (software adjunto en Windows XP), Microsoft Corp.). Aquí, el cambio en el brillo de la piel se calculó según la siguiente ecuación:

[Ecuación 1]

$$[(\text{El brillo de la piel no tratada}) - (\text{El brillo de la piel tratada})] \times 100 / (\text{El brillo de la piel no tratada})$$

[0048] Los resultados se muestran en la Tabla 2.

[Tabla 2]

	Permeabilidad a través de la piel
Forma cristalina 1	44
Forma cristalina 2	59
Cristal precursor	32
Polvo de ácido L-ascórbico	0

[0049] Tal como se muestra en la Tabla 2, los cristales en forma cristalina 1 y forma cristalina 2 mostraron una mayor permeabilidad a través de la piel en comparación con el cristal precursor. Esto indicó que los cristales disódicos de PQQ en forma cristalina 1 y forma cristalina 2 son más adecuados para su uso en productos cosméticos y farmacéuticos para la administración percutánea.

Prescripción del Ejemplo 1: formulación de cápsula de gelatina

[0050] Se añadieron coenzima Q10 (de MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.) (8 g), hidrolizado de proteína de soja (de Nisshin OilliO) (2 g), y el cristal disódico de PQQ en el Ejemplo 1 (forma cristalina 1) (2 g) a una bolsa de plástico, y se mezclaron agitando la bolsa para preparar una composición para ingestión oral. La composición resultante se encapsuló con 10 mg en cada una de las cápsulas de gelatina para preparar formulaciones de cápsula de gelatina.

Prescripción del Ejemplo 2: formulación de cápsula blanda con dispersión en aceite:

- 5 **[0051]** Se mezclaron conjuntamente aceite de ensalada de cártamo (de Nisshin OilIIO) (2.700 g), éster de ácido graso en glicerina (de RIKEN VITAMIN CO., LTD.) (300 g), y cera de abejas (de YOKOHAMA OILS & FATS INDUSTRY, CO., LTD.) (300 g) y la mezcla resultante se agitó a 70°C, y a continuación se añadió el cristal disódico de PQQ (forma cristalina 1) en el Ejemplo 1 a la mezcla, y la mezcla se mezcló usando un mezclador. La mezcla resultante se encapsuló en una cápsula blanda para preparar una formulación de cápsula blanda.

10

REIVINDICACIONES

1. Cristal disódico del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico (forma cristalina 1) que tiene un contenido de agua del 4,6% en peso o menos y que tiene picos de ángulo 2θ en $11,4 \pm 0,4$, $13,5 \pm 0,4$, $18,0 \pm 0,4$, $18,7 \pm 0,4$, $26,0 \pm 0,4$, y $28,5 \pm 0,4^\circ$ obtenido por difracción de rayos X en polvo utilizando una radiación Cu K α .
5
2. Cristal disódico del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico (forma cristalina 2) que tiene un contenido de agua del 4,6% en peso o menos y que tiene picos de ángulo 2θ en $8,7 \pm 0,4$, $11,5 \pm 0,4$, $12,0 \pm 0,4$, $17,4 \pm 0,4$ y $18,7 \pm 0,4^\circ$ obtenido por difracción de rayos X en polvo utilizando una radiación Cu K α .
10
3. Composición farmacéutica que comprende el cristal disódico del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico, según la reivindicación 1 ó 2.
4. Composición cosmética que comprende el cristal disódico del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico, según la reivindicación 1 ó 2.
15
5. Alimento funcional o nutriente que comprende el cristal disódico del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico, según la reivindicación 1 ó 2.
20
6. Procedimiento para producir el cristal disódico del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico, según la reivindicación 1, que comprende las etapas de producir un cristal que es un precursor del cristal disódico del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico (un cristal precursor), en el que el cristal precursor se cristaliza ajustando el pH de una solución acuosa que contiene etanol o isopropanol a una concentración del 10% al 90% en el que una sal sódica del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico se disuelve a pH entre 2 y 5, y secar el cristal precursor, en el que el secado es secado al vacío a 50°C durante 70 horas o más, o secado ambiente a 120°C o más y menos de 180°C durante 30 minutos o más.
25
7. Procedimiento para producir el cristal disódico del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico, según la reivindicación 2, que comprende las etapas de producir un cristal que es un precursor del cristal disódico del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico (un cristal precursor), en el que el cristal precursor se cristaliza ajustando el pH de una solución acuosa que contiene etanol o isopropanol a una concentración del 10% al 90% en el que una sal sódica del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico se disuelve a pH entre 2 y 5, y secar el cristal precursor, en el que el secado es secado ambiente a 180°C o más durante 30 minutos o más.
30
8. Procedimiento para producir el cristal disódico del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico, según la reivindicación 6 ó 7, en el que el cristal precursor es un cristal disódico del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico que tiene picos de ángulo 2θ en $9,1 \pm 0,4$, $10,3 \pm 0,4$, $13,8 \pm 0,4$, $17,7 \pm 0,4$, $18,3 \pm 0,4$, $24,0 \pm 0,4$, $27,4 \pm 0,4$, y $39,5 \pm 0,4^\circ$ obtenido por difracción de rayos X en polvo utilizando una radiación Cu K α .
35
9. Procedimiento para producir el cristal disódico del ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrol[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la etapa de secado se lleva a cabo mediante calentamiento del cristal precursor en aceites.
40
- 45

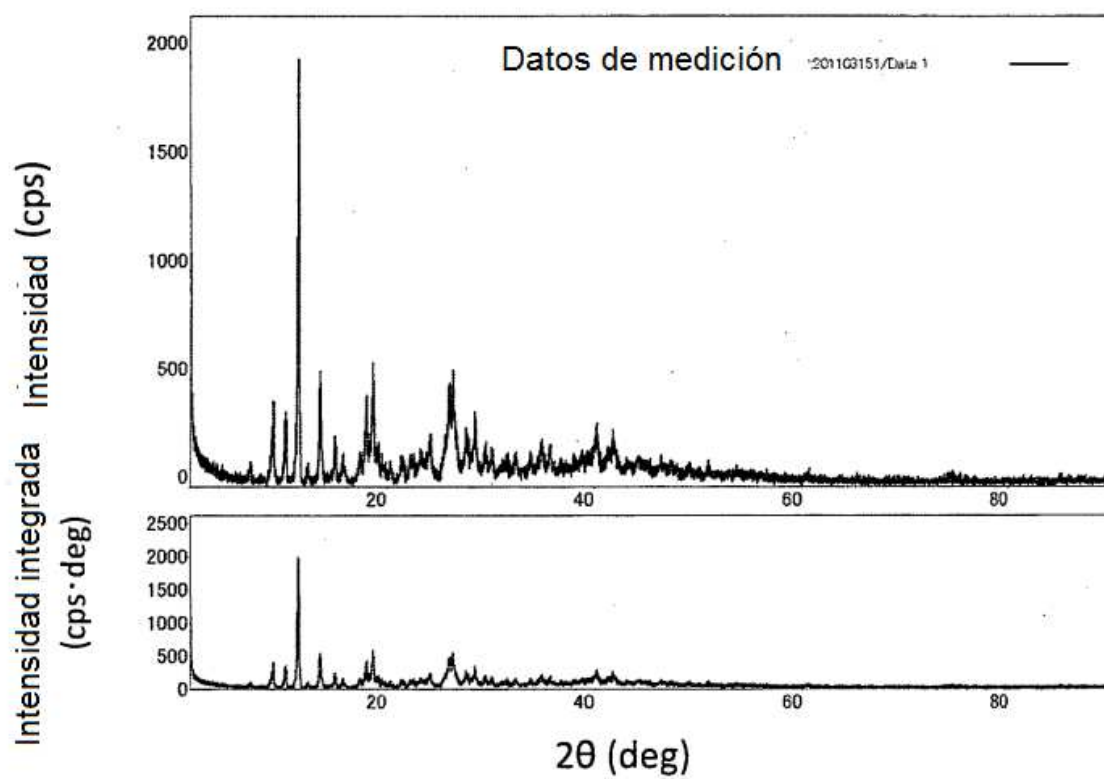


Figura 1

26 abril 2011



Análisis y
caracterización de
materiales

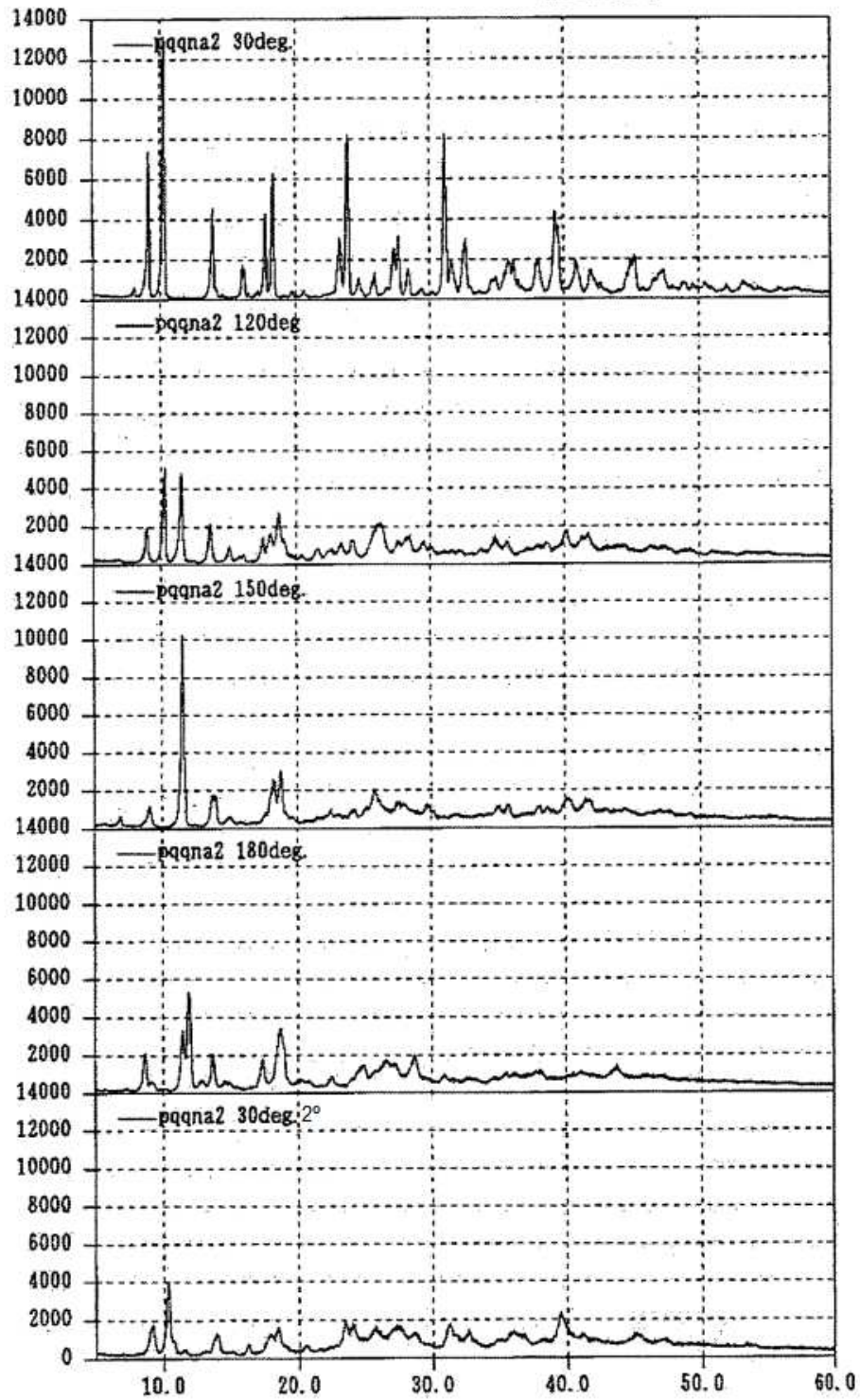


Figura 2

Nombre de la muestra : etoni

