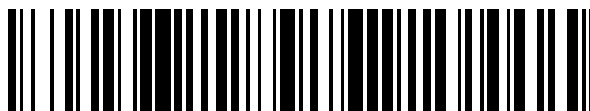


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 078**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2014 PCT/CN2014/080542**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15000370**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2014 E 14819418 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 2998305**

54 Título: **Cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona, método de preparación y aplicación del mismo**

30 Prioridad:

01.07.2013 CN 201310270885

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

17.11.2020

73 Titular/es:

**SHANGHAI RI XIN BIOTECHNOLOGY CO. LTD.
(100.0%)**

**Room 3A 301 Building 52 No.777 Hongmei South
Road Minhang
Shanghai 200237, CN**

72 Inventor/es:

**ZHONG, CHUNJIU;
MEI, XUEFENG y
ZHANG, HUAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 794 078 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

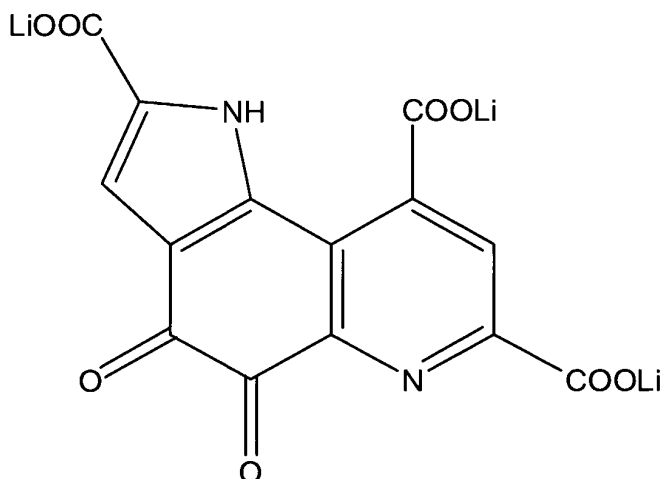
Cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona, método de preparación y aplicación del mismo

Campo técnico

5 La presente invención va destinada a un cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona y al método de preparación y aplicación del mismo.

Antecedentes

El nombre completo de la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona es un derivado de trilitio de pirroloquinolin quinona. Su fórmula es $C_{14}H_3N_2O_8Li_3$, y el peso molecular es 348. Tiene la siguiente estructura química:



(I)

10 Los documentos CN 101 851 234 y JP 2011 126812 divulgan el compuesto de fórmula (I).

Una sustancia con la misma composición química puede cristalizar con dos o más disposiciones de red espacial diferentes. Este fenómeno se denomina polimorfismo. El comportamiento polimórfico de los fármacos puede tener una importancia crucial en farmacia y farmacología, lo que tiene enormes impactos en la calidad del fármaco. Las formas cristalinas variadas pueden diferir entre sí con respecto a una o más propiedades físicas, tales como la forma del cristal, el punto de fusión, la dureza, la solubilidad y la disociación, la estabilidad de estado y el comportamiento de compactación. Las diferencias en las propiedades físicas exhibidas por los polimorfos afectan a parámetros farmacéuticos tales como la estabilidad de almacenamiento, biodisponibilidad y eficacia. Por tanto, la investigación de desarrollo de nuevos fármacos debería prestar más atención a la investigación del polimorfismo del fármaco y el control cristalino.

20 Científicos japoneses descubrieron PQQ como vitamina B soluble en agua en 2003. Los ratones privados de PQQ crecieron mal, presentaron piel frágil, desarrollaron anomalías como osteoartrismo, presentaron función inmunitaria deteriorada, no se reprodujeron y mostraron propensión a artritis. Por tanto, PQQ se identifica como un nutriente esencial *in vivo*. Se cree que PQQ tiene el mismo efecto en humanos. Las técnicas actuales publican que el peso molecular de PQQ es 330. Se descubre de forma temprana en microorganismos, y también existe en eucariotas superiores. Su estructura cristalina y síntesis química ya están claras.

PQQ es un cofactor de enzimas esenciales múltiples. PQQ puede mejorar la función de la cadena respiratoria mitocondrial y los niveles de radicales libres *in vivo*. Los estudios indican que los ratones con deficiencia de PQQ crecen mal, no se reproducen y son propensos a la artritis. Por tanto, PQQ se identifica como vitamina y nutriente esencial *in vivo*. Los estudios demuestran que PQQ tiene las siguientes funciones relacionadas con el sistema nervioso: (1) Antioxidante: elimina de manera intensa especies de oxígeno reactivas; (2) Alteración de la función de la cadena respiratoria: mantiene el metabolismo energético de las mitocondrias; (3) Activación del mecanismo de señal: estimula la liberación del factor de crecimiento nervioso, recuperando y favoreciendo el crecimiento del nervio; (4) regula el crecimiento de células somáticas y previene eficazmente la insuficiencia hepática; (5) Atenúa la deposición de la proteína α -sinucleína y previene la fibrosis de las células nerviosas. Por lo tanto, PQQ exhibe un efecto beneficioso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (EA).

Se ha comprobado que la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona suprime las actividades de la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) y tiene un valor potencial para tratar diversas enfermedades mentales. Por tanto, se presta más

atención a los valores de aplicación adversos de la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona. Se trata de descubrir sus mecanismos multifactoriales y aplicarlos en la prevención de enfermedades mentales.

Resumen

- 5 La presente invención va destinada al cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona y al método de preparación y aplicación del mismo.
- 10 La presente invención divulga un cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona, caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos significativos a ángulos de difracción (valores de 2θ) de $6,222 \pm 0,2^\circ$, $7,379 \pm 0,2^\circ$, $7,941 \pm 0,2^\circ$, y $23,631 \pm 0,2^\circ$. Su pico endotérmico es de alrededor de $90-96^\circ\text{C}$ en el termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Muestra picos alrededor de $3396,03\text{ cm}^{-1}$, $1652,70\text{ cm}^{-1}$, $1604,48\text{ cm}^{-1}$ y $1355,71\text{ cm}^{-1}$ en el patrón de espectroscopía infrarroja (IR).
- 15 En una realización, el cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos más significativos a ángulos de difracción (valores de 2θ) de $24,044 \pm 0,2^\circ$, $25,497 \pm 0,2^\circ$, $27,541 \pm 0,2^\circ$, $30,736 \pm 0,2^\circ$, $32,306 \pm 0,2^\circ$ y un patrón de espectroscopía infrarroja (IR) con más picos alrededor de $1500,35\text{ cm}^{-1}$, $1243,86\text{ cm}^{-1}$, $1147,44\text{ cm}^{-1}$, $808,03\text{ cm}^{-1}$, $761,74\text{ cm}^{-1}$, $570,83\text{ cm}^{-1}$.
- 20 En otra realización adicional, el compuesto muestra un pico endotérmico de $93,33^\circ\text{C}$ en el termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC).
- 25 La presente invención va destinada al proceso de preparación del cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona del siguiente método: se mezcla pirroloquinolin quinona con hidróxido de litio (relación en peso 4:1), seguido de adición de disolvente orgánico y agitación continua durante 2 horas a $0-5^\circ\text{C}$, luego se añade acetonitrilo a la mezcla (la proporción de acetonitrilo con respecto a pirroloquinolin quinona es de 8 ml: 4 g), seguido de agitación durante 1 hora, el intermedio precipitado A de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona se recoge por filtración. El intermedio resultante A de la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona se disuelve en agua, seguido de la adición de tetrahidrofurano o isopropanol hasta mezclar por completo (la proporción del intermedio A de la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona, agua y tetrahidrofurano o isopropanol es de 10-1000 mg: 0,5-20 ml : 4-80 ml), el cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona se obtiene al dejar en reposo durante la noche a temperatura ambiente.
- 30 En una realización, el disolvente orgánico está seleccionado entre el grupo que consiste en cetonas, éteres, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, ésteres, nitrilos, alcoholes, hidrocarburos halogenados y una combinación de dos o más de los mismos, que disuelve la materia prima y no arruina su estructura.
- 35 En una realización adicional, el disolvente orgánico está seleccionado entre el grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol, pentanol, acetona, 2-butanona, tetrahidrofurano, nitrometano, acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, éter metil terc-butílico y una combinación de dos o más de ellos. La relación de pirroloquinolin quinona con respecto a disolvente orgánico es 20 mg: 1 ml.
- La presente invención va destinada a una composición farmacéutica que comprende el cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona y al menos uno cualquiera de los excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 40 En una realización, los excipientes farmacéuticamente aceptables están seleccionados entre materiales de relleno, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes y una combinación de dos o más de los mismos.
- En otra realización, los materiales de relleno están seleccionados entre almidón, lactosa, celulosa cristalina, dextrina, manitol, oxidasa, sulfato de calcio y una combinación de dos o más de los mismos.
- 45 En otra realización, los desintegrantes están seleccionados entre carboximetilcelulosa y su sal, carboximetilcelulosa reticulada y su sal, polivinilpirrolidona reticulada, carboximetil almidón sódico, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución y una combinación de dos o más de los mismos.
- En otra realización, los aglutinantes están seleccionados entre polivinilpirrolidona, hidroxipropil metil celulosa, suspensión de almidón y una combinación de dos o más de los mismos.
- 50 En otra realización, los lubricantes están seleccionados entre estearato de magnesio, estearato de calcio y una combinación de dos o más de los mismos.
- La presente invención proporciona la aplicación del cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona en la preparación de medicamentos para tratar alteraciones de la memoria.
- La presente invención divulga la forma cristalina B de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona, en la que el patrón de difracción de rayos X en polvo, el termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC), la curva de sorción de vapor dinámico (DVS) y el patrón de espectroscopía infrarroja (IR) son fundamentalmente coherentes con la figura 1, figura 2, figura 3 y figura 4, respectivamente.
- En comparación con la técnica actual, la presente invención contiene más efectos beneficiosos:

La presente invención va destinada al cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona y al método de preparación y aplicación del mismo. El cristal de sal trilitio de pirroloquinolin quinona se podría usar para preparar medicamentos para tratar problemas de memoria.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 es un patrón característico de difracción de rayos X en polvo (XRPD) para cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona;

La Figura 2 es un termograma característico de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona;

10 La Figura 3 es una curva característica de Sorción Dinámica de Vapor (DVS) para el cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona; y

La Figura 4 es un patrón característico de espectroscopía infrarroja (IR) para cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona.

Descripción detallada de la divulgación

15 Las realizaciones de la presente divulgación se describen a continuación a través de ejemplos específicos, y los expertos en la materia pueden comprender fácilmente otras ventajas y efectos de la presente divulgación de acuerdo con el contenido divulgado en la memoria descriptiva.

Los anteriores objetivos, características y ventajas de la invención y otros resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de las realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos.

Condición de laboratorio:

20 Los patrones de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de los polimorfos se miden en un difractómetro de rayos X en polvo XRD6500 (Shimadzu, Japón) usando radiación Cu-Ka a temperatura ambiente. Se utiliza una exploración continua dos theta a 2°/min de 5°-40°.

25 En una realización adicional, el patrón cristalino es característico en el patrón de difracción de rayos X en polvo. La banda, especialmente en ángulo bajo, se puede cambiar ligeramente en la intensidad relativa dependiendo de la condición de cristalización, el tamaño de partícula, la concentración relativa de la mezcla y otras condiciones de medición. Por tanto, la intensidad relativa del ángulo de difracción 2θ de la forma cristalina no es característica. La identificación de la forma cristalina se debería determinar con referencia a las posiciones máximas, pero no a su intensidad relativa. Además, la identificación de la forma cristalina no debe depender de un solo pico, sino de un análisis exhaustivo del sistema específico dI/II. Además, durante la identificación de la mezcla, puede ocurrir alguna
30 deficiencia de pico debido a la disminución de la concentración de la muestra. Por lo tanto, no es necesario encontrar bandas seguras aparecidas en muestras altamente puras. Incluso una sola banda puede identificar la forma cristalina.

Los termogramas de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de los polimorfos se miden en un DSC8500 (perkinelmer, EE.UU.). Las condiciones de análisis son 10 °C/min con una purga de nitrógeno.

35 Los patrones de espectroscopía infrarroja (IR) de los polimorfos se miden en un Nicolot-Magna FT-IR750 (Nicolot-Magna, EE.UU.) a temperatura ambiente, explorando a 4000-350 cm⁻¹.

Las curvas de Sorción Dinámica de Vapor (DVS) de los polimorfos se miden en SMS DVS Intrinsic a 0-95 % HR y 25 °C.

Ejemplo 1: Preparación de cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona

40 Se mezclan 4 g de pirroloquinolin quinona con 1 g de hidróxido de litio, seguido de la adición de 16 ml de ddH₂O. La mezcla se agita a 0-5 °C durante 2 horas, y se añaden 8 ml de acetonitrilo a la mezcla, seguido de agitación durante 1 hora. El producto intermedio precipitado A de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona se recoge por filtración. Los 10 mg resultantes del intermedio A de la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona se disuelven en 0,5 ml de agua, seguido de la adición de tetrahidrofurano hasta que se mezcla por completo. El 1 mg de la forma cristalina B de la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona se obtiene al dejar en reposo durante la noche a temperatura ambiente. La muestra obtenida se mide por difracción de rayos X en forma de polvo como se muestra en la Figura 1.

45 Los datos de picos del patrón de difracción de rayos X en forma de polvo se describen a continuación:

ES 2 794 078 T3

Tabla 1: Listado de datos de picos de patrón de difracción de rayos X en forma de polvo para la forma cristalina B de la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona

2 θ °	d/Å	% de Intensidad
6,222	1850	59,7
7,379	844	27,2
7,941	3099	100
12,495	84	2,7
13,093	206	6,6
13,48	98	3,2
14,633	129	4,2
15,938	189	6,1
17,299	287	9,3
17,652	71	2,3
18,775	145	4,7
19,193	80	2,6
20,375	60	1,9
20,962	100	3,2
21,326	234	7,6
22,305	167	5,4
23,631	1184	38,2
24,044	403	13
25,497	321	10,4
26,146	187	6
26,801	189	6,1
27,541	372	12
28,461	62	2
28,817	120	3,9
29,909	209	6,7
30,736	328	10,6
31,59	186	6
31,833	89	2,9
32,306	397	12,8
33,461	138	4,5
33,843	202	6,5
35,059	215	6,9
35,561	86	2,8
36,42	70	2,3
36,893	95	3,1
37,633	208	6,7
38,315	75	2,4
39,231	48	1,5

La muestra obtenida se mide por calorimetría diferencial de barrido (DSC), sorción dinámica de vapor (DVS) y espectroscopía infrarroja (IR), respectivamente, como se muestra en las figuras 2, 3, 4. El compuesto muestra un pico endotérmico de 93,33 ° C en el termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Muestra picos alrededor de 3396,03 cm⁻¹, 1652,70 cm⁻¹, 1604,48 cm⁻¹, 1500,35 cm⁻¹, 1355,71 cm⁻¹, 1243,86 cm⁻¹, 1147,44 cm⁻¹, 808,03 cm⁻¹, 761,74 cm⁻¹, 570,83 cm⁻¹ en el patrón de espectroscopía infrarroja (IR).

Ejemplo 2: Preparación de la forma cristalina B de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona

Los 10 mg obtenidos del intermedio A de la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona del ejemplo 1 se disuelven en 0,5 ml de agua, seguido de la adición de 4 ml de isopropanol. Los 0,5 mg de cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona se obtienen dejando en reposo durante la noche a temperatura ambiente. La muestra obtenida se mide por difracción de rayos X en forma de polvo, que muestra el mismo patrón de pico que el ejemplo 1.

Ejemplo 3: Preparación de la forma cristalina B de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona Se disuelven 10 mg de la forma cristalina A de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona (adquirida en Shanghai Rixin Biological Co., Ltd) en 1 ml de disolvente orgánico (la mezcla de metanol y éter metil terc-butílico con una relación de 1:1). Se obtienen 0,7 mg de la forma cristalina B de la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona al dejar en reposo durante la noche a temperatura ambiente. La muestra obtenida se mide por difracción de rayos X en forma de polvo, que muestra el mismo patrón de pico que el ejemplo 1.

Ejemplo 4: Comparaciones de naturaleza higroscópica de la forma cristalina A y la forma B de la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona

Bajo el alcance de una humedad relativa (HR) de un 5 % a un 95 %, se mide la naturaleza higroscópica del intermedio A de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona y la forma cristalina B de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona del ejemplo 1, por análisis de sorción dinámica de vapor. La curva DVS indica que la naturaleza higroscópica del intermedio A de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona del ejemplo 1 es de un 25,3 % y un 32,6 % bajo una humedad relativa (HR) de un 65 % y un 80 %, respectivamente. Bajo el ambiente húmedo normal para el almacenamiento, muestra una elevada naturaleza higroscópica con una variedad de un 5-25 %. El sólido cristalino no es bueno. La naturaleza higroscópica de la forma cristalina B de la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona es un 8,4 % y un 13,9% bajo la humedad relativa (HR) de un 65 % y 80 %, respectivamente. Bajo el ambiente húmedo normal para el almacenamiento, muestra una naturaleza higroscópica con una variedad de un 5-10 %. El sólido cristalino no es bueno.

Tal y como se usa en el presente documento "básicamente puro" es que el cristal de la presente invención contiene preferentemente un 90 % o más de una sustancia cristalina, más preferentemente un 95 % o más, más preferentemente un 96 % o más, más preferentemente más un 97 % o más, de forma especialmente preferida un 98 % o más, lo más preferentemente un 99 % o más de una sustancia cristalina, que se usa en difracción de rayos X en polvo (XRPD), espectroscopía Raman, espectroscopía infrarroja (IR).

Ejemplo 5: Una composición farmacéutica que comprende el cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona

La forma cristalina B de la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona se mezcla con estearato de magnesio y celulosa cristalina de acuerdo con la siguiente descripción:

Forma cristalina B de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona	1,4 mg
Celulosa cristalina (Avicel PH102)	116,2 mg
Estearato de magnesio	2,4 mg
Total	120 mg

Se obtienen 120 mg de comprimidos de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona usando una máquina de prensado de comprimidos con 7 mm de modelo.

Ejemplo 6: Modelo animal para la función biológica de cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona

Materiales experimentales:

1. Ratones de tipo salvaje (Shanghai Slac Laboratory Animal Co., Ltd, los pesos de los ratones son de 16 g a 18 g, machos, totalmente 10 ratones) para el grupo 1.

2. Ratones transgénicos APP/PS1 (Centro de Investigación de Animales Modelo de la Universidad de Nanjing, los pesos de los ratones son de 30 g a 40 g, machos, totalmente 60 ratones). Se asignan aleatoriamente sesenta ratones a seis grupos (grupo 2 al grupo 7) con diez ratones por cada grupo.

Grupo 1: ratones de tipo salvaje

Grupo 2: ratones modelo

Grupo 3: control positivo de Aricept

Grupo 4: dosificación elevada de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona

5 Grupo 5: dosificación media elevada de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona

Grupo 6: dosificación media reducida de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona

Grupo 7: dosificación reducida de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona

Preparación de la disolución:

10 Grupo de dosificación elevada de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona: se obtienen 12 ml de disolución A disolviendo 3,6 mg de la forma cristalina B de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona en ddH₂O.

Grupo de dosificación media-alta de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona: se obtienen 12 ml de disolución B diluyendo 6 ml de disolución A con ddH₂O.

Grupo de dosificación media-baja de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona: se obtienen 12 ml de disolución C diluyendo 6 ml de disolución B con ddH₂O.

15 Grupo de dosificación baja de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona: se obtienen 12 ml de disolución D diluyendo 6 ml de disolución C con ddH₂O.

Grupo Aricept: se obtiene una solución de Aricept de 0,15 mg/ml triturando un comprimido (5 mg) de Aricept para dar lugar a un polvo, y luego se disuelve en CMC a un 0,5 % (carboximetilcelulosa).

Instrumentos experimentales:

20 Laberinto de agua de Morris (sistema de análisis de video experimental del laberinto de agua de Morris, JLBehv-MWMG, Shanghai Jiliang Technology Co., Ltd)

Procedimiento experimental:

25 El grupo 1 y el grupo 2 se administran diariamente por medio de disolución salina normal y los grupos 3 a 7 se administran diariamente por medio de disoluciones de fármaco preparadas anteriormente, con la dosificación de 1 ml/100 g/día durante un mes continuo. A partir de la quinta semana, se lleva a cabo el adiestramiento de los ratones en el laberinto de agua de Morris, 30 minutos después de la administración del fármaco. La sesión de adiestramiento dura 4 días. El ensayo de prueba se lleva a cabo en el 5º día. Se usa el software de estadística del laberinto de agua de Morris para registrar y analizar automáticamente la trayectoria de natación en el cuadrante, el tiempo empleado y la trayectoria en la ocupación del cuadrante objetivo u opuesto y los tiempos de cruce de la plataforma.

30 Los datos se indican como promedio ± desviación típica ($X \pm SD$). Se usa el análisis de varianza para un solo factor para estadísticas de diferencia de datos. La diferencia entre grupos está determinada por $P < 0,05$. Los resultados detallados se muestran en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1 Ensayo de prueba en el 5º día: trayectoria de natación y tiempo empleado en la ocupación del cuadrante objetivo ($n = 10$, $X \pm SD$)

Grupo	Fármaco	Distancia media ajustada de aproximación a la plataforma (mm)	tiempo empleado en el cuadrante IV (s)
Vehículo	N.S	579,7 ± 89,6	21,1 ± 4,8
Ratones modelo	N.S	723,9 ± 85,1 ^{##}	12,6 ± 4,4 ^{##}
Aricept	1,5 mg/kg	582,7 ± 104,4 ^{**}	21,7 ± 6,9 ^{**}
Dosis elevada de PQQ-Li	3 mg/kg	572,5 ± 93,6 ^{**}	19,5 ± 8,5 [*]
Dosis media alta de PQQ-Li	1,5 mg/kg	605,6 ± 104,1 [*]	17,7 ± 5,9 [*]
Dosis media baja de PQQ-Li	0,75 mg/kg	674,9 ± 104,6	15,8 ± 7,6
Dosis baja de PQQ-Li	0,375 mg/kg	762,6 ± 73,2	12,4 ± 4,2

^{##} P < 0,01 en comparación con el vehículo
^{*} P < 0,05, ^{**} P < 0,01 en comparación con ratones modelo

Tabla 2 Prueba de ensayo en el 5º día: trayectoria de natación y tiempo transcurrido en la ocupación del cuadrante I de la plataforma (n = 10, X ± SD)

Cuadrante ocupación de plataforma			
Grupo	Fármaco	Trayectoria de natación (mm)	tiempo (s)
Vehículo	N.S	2829,7 ± 983,3	11,2 ± 4,0
Ratones modelo	N.S	1310,4 ± 731,7##	3,9 ± 2,6##
Aricept	1,5 mg/kg	2730,8 ± 1485,3*	9,3 ± 5,4*
Dosis elevada de PQQ-Li	3 mg/kg	2636,1 ± 1091,5**	9,2 ± 4,4**
Dosis media alta de PQQ-Li	1,5 mg/kg	2653,3 ± 1012,3**	8,9 ± 4,0**
Dosis media baja de PQQ-Li	0,75 mg/kg	2029,9 ± 1133,1	6,4 ± 5,0
Dosis baja de PQQ-Li	0,375 mg/kg	961,6 ± 560,7	2,8 ± 1,9
## P < 0,01 en comparación con el vehículo			
* P < 0,05, ** P < 0,01 en comparación con ratones modelo			

5 Tabla 3 Prueba de ensayo en el 5º día: trayectoria de natación, tiempo empleado y tiempos de cruce de la plataforma en la ocupación del cuadrante I de la plataforma (n = 10, X ± SD)

Grupo	Fármaco	primera vez que cruza la plataforma (s)	tiempos de cruce de plataforma (s)
Vehículo	N.S	17,5 ± 19,2	2,2 ± 1,6
Ratones modelo	N.S	49,1 ± 15,2##	0,4 ± 0,5##
Aricept	1,5 mg/kg	30,7 ± 20,1*	1,6 ± 1,3*
Alta dosis de PQQ-Li	3 mg/kg	21,8 ± 17,8**	2,3 ± 1,6**
Dosis media alta de PQQ-Li	1,5 mg/kg	22,7 ± 19,6**	2,2 ± 1,6**
Dosis media baja de PQQ-Li	0,75 mg/kg	31,3 ± 22,6	1,6 ± 1,3*
Dosis baja de PQQ-Li	0,375 mg/kg	44,9 ± 17,1	0,8 ± 0,8
## P < 0,01 en comparación con el vehículo			
* P < 0,05, ** P < 0,01 en comparación con ratones modelo			

Conclusión:

10 La forma cristalina B de la sal de trilitio de pirroloquinolin quinona tiene buenos efectos dependientes de la dosis en ratones transgénicos APP / PS1 que se muestra en la prueba del laberinto de agua de Morris. Podría mejorar significativamente la memoria espacial y el deterioro cognitivo de los ratones transgénicos APP / PS1.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona, caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos significativos a ángulos de difracción (valores 2θ) de $6,222 \pm 0,2^\circ$, $7,379 \pm 0,2^\circ$, $7,941 \pm 0,2^\circ$, $23,631 \pm 0,2^\circ$; el pico endotérmico del cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona es de alrededor de $90-96^\circ\text{C}$ en el termograma de calorimetría de barrido diferencial; y el cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona muestra picos alrededor de $3396,03\text{ cm}^{-1}$, $1652,70\text{ cm}^{-1}$, $1604,48\text{ cm}^{-1}$, $1355,71\text{ cm}^{-1}$ en el patrón de espectroscopía infrarroja (IR).
- 10 2. El cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona según la reivindicación 1, caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos más significativos a ángulos de difracción (valores 2θ) de $24,044 \pm 0,2^\circ$, $25,497 \pm 0,2^\circ$, $27,541 \pm 0,2^\circ$, $30,736 \pm 0,2^\circ$, $32,306 \pm 0,2^\circ$; el cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona también muestra más picos alrededor de $1500,35\text{ cm}^{-1}$, $1243,86\text{ cm}^{-1}$, $1147,44\text{ cm}^{-1}$, $808,03\text{ cm}^{-1}$, $761,74\text{ cm}^{-1}$, $570,83\text{ cm}^{-1}$ en el patrón de espectroscopía infrarroja (IR).
3. El cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona según la reivindicación 1, caracterizado por un pico endotérmico de 93°C en el termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- 15 4. Un método para preparar el cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende los métodos de: pirroloquinolin quinona se mezcla con hidróxido de litio (relación en peso 4: 1), seguido de adición de disolvente orgánico para agitación continua durante 2 horas a $0-5^\circ\text{C}$, luego se añade acetonitrilo a la mezcla (la relación de acetonitrilo con respecto a pirroloquinolin quinona es de 8 ml: 4 g), seguido de agitación durante 1 hora, el intermedio precipitado A de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona se recoge por filtración; el intermedio resultante A de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona se disuelve en agua, seguido de adición de tetrahidrofurano o isopropanol hasta que se mezcla por completo (la proporción de intermedio A de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona, agua y tetrahidrofurano o isopropanol es de 10-1000 mg: 0,5-20 ml : 4-80 ml), el cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona se obtiene al dejar en reposo durante la noche a temperatura ambiente.
- 20 5. El método para preparar el cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona de la reivindicación 4, en el que el disolvente orgánico está seleccionado entre metanol, etanol, isopropanol, pentanol, acetona, 2-butanona, tetrahidrofurano, nitrometano, acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, éter metil terc-butílico y una combinación de dos o más de los mismos.
- 25 6. Una composición farmacéutica que comprende el cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que los excipientes están seleccionados entre materiales de relleno, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes y una combinación de dos o más de los mismos.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que los materiales de relleno están seleccionados entre almidón, lactosa, celulosa cristalina, dextrina, manitol, oxidasa, sulfato de calcio y una combinación de dos o más de los mismos.
- 35 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que los desintegrantes están seleccionados entre carboximetilcelulosa y sus sales, carboximetilcelulosa reticulada y sus sales, polivinilpirrolidona reticulada, carboximetil almidón sódico, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución y una combinación de dos o más de los mismos.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que los aglutinantes están seleccionados entre polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, suspensión de almidón y una combinación de dos o más de los mismos.
- 40 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que los lubricantes están seleccionados entre estearato de magnesio, estearato de calcio y una combinación de dos de los mismos.
12. Un cristal de sal de trilitio de pirroloquinolin quinona según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 para uso en un método de tratamiento de alteraciones de la memoria.

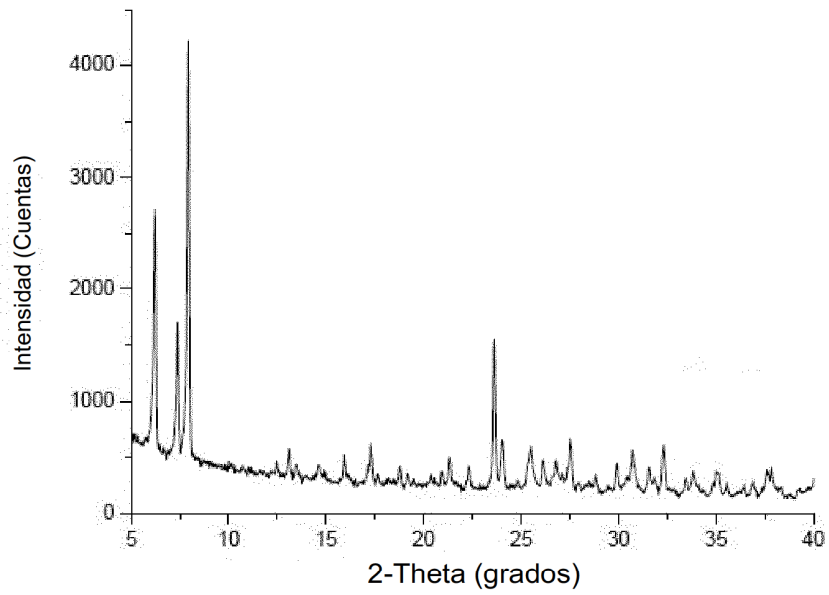


Figura 1

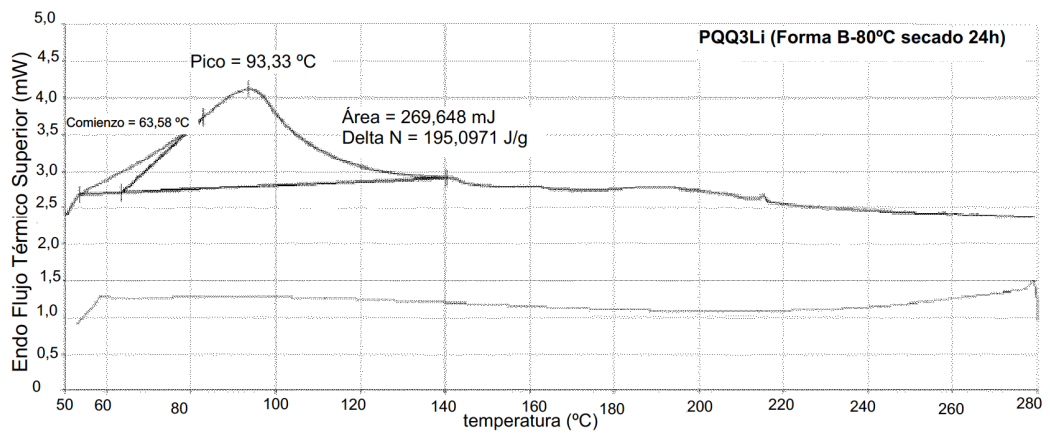


Figura 2

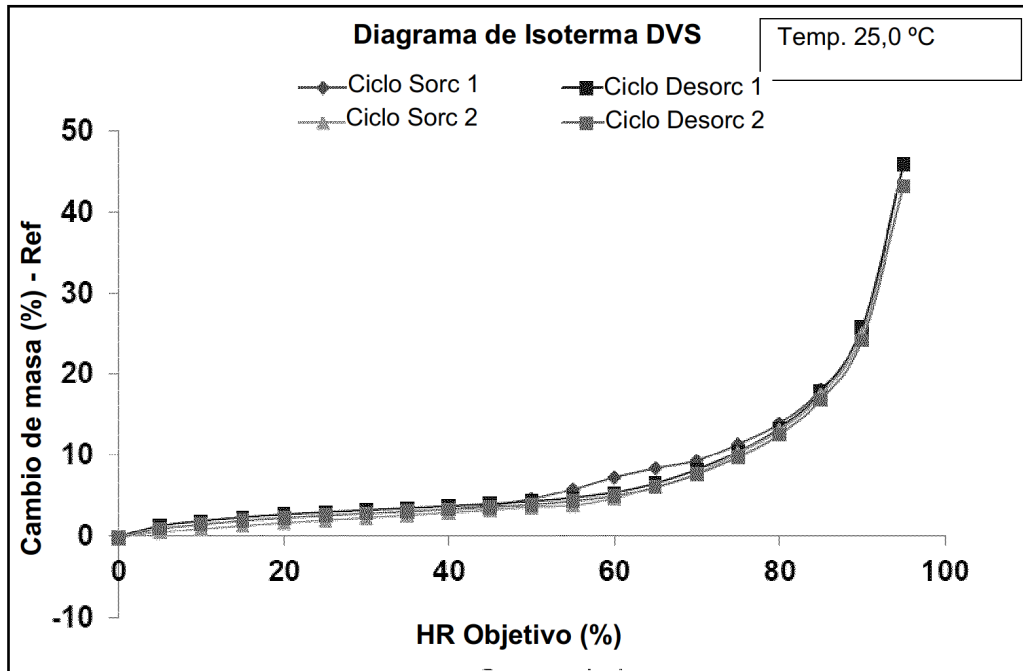


Figura 3

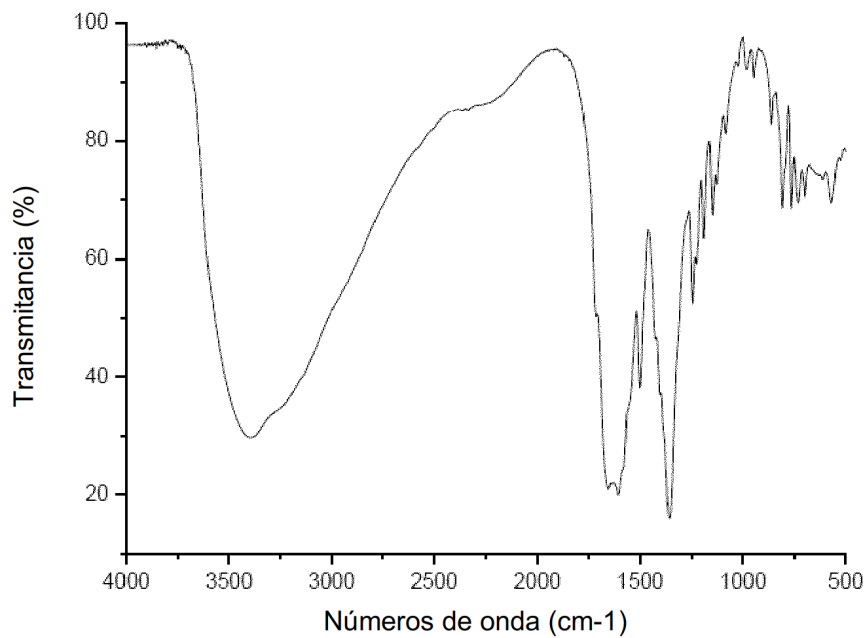


Figura 4