MD 4014 B1 2010.02.28

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenţia de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4014** (13) **B1**
(51) **Int. Cl.:** ***C01B 19/00*** (2006.01)
C01G 31/00 (2006.01)
C01G 41/00 (2006.01)
A61K 33/04 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENŢIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenţie poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. depozit: a 2009 0046
(22) Data depozit: 2009.04.23

(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
2010.02.28, BOPI nr. 2/2010

(71) Solicitanţi: GUŢUL Tatiana, MD; DIMOGLO Anatolii, MD
(72) Inventatori: GUŢUL Tatiana, MD; DIMOGLO Anatolii, MD; SOKOLOV Maxim, RU; KORKMAZ Seval, TR
(73) Titulari: GUŢUL Tatiana, MD; DIMOGLO Anatolii, MD
(74) Reprezentant: ANISIMOVA Liudmila

(54) Complecşi polioxometalaţi cu activitate antitumorală

(57) Rezumat:

1

Invenţia se referă la sinteza compuşilor complecşi polioxometalaţi cu activitate antitumorală.

Esenţa invenţiei constă în sinteza compuşilor complecşi polioxometalaţi cu formula:

$[N(CH_3)_4]_{5+n}[Se_2W_{19-n}V_{3+n}O_{71}]\cdot mH_2O$, unde n = 0 sau 2, m = 12 sau 17, unde atomii de seleniu (IV) sunt centrali.

2

Rezultatul invenţiei constă în sinteza unor compuşi complecşi polioxometalaţi cu un efect de inhibare a celulelor tumorale de 85…92% la o concentraţie de 10…100 μM.

Revendicări: 1

Figuri: 2

MD 4014 B1 2010.02.28

Descriere:

Invenţia se referă la sinteza compuşilor complecşi polioxometalaţi cu activitate antitumorală.

Sunt cunoscuţi complecşi polioxometalaţi (POM) care inhibă proteina specifică, chinaza CK2, fermentul care se manifestă într-un şir de boli canceroase, prin controlul proliferării şi supravieţuirii celulelor, fiind un ferment de fosforilare. Inhibitorii chinazei CK2 cunoscuţi în prezent, de obicei reprezintă nişte compuşi organici, care se combină cu centrul activ al fermentului. [1]

Cercetătorii de la Institutul de Chimie Moleculară (Franţa) în comun cu cercetătorii de la Institutul de Tehnologie şi Ştiinţă din Grenoble (Franţa) au scos în evidenţă un nou tip de inhibitori CK2. Aceşti compuşi anorganici fac parte din grupul compuşilor polioxometalaţi cu conţinut de molibden şi wolfram şi se manifestă în concentraţii nanomolare în calitate de inhibitori eficienţi ai chinazei CK2 în comparaţie cu inhibitorii cunoscuţi în prezent. Cercetătorii au depistat un mecanism, deşi neînţeles până la capăt, de acţiune a polioxometalaţilor. Spre deosebire de inhibitorii organici cunoscuţi, polioxometalaţii nu se combină cu centrul activ al fermentului.

Dezavantajul complecşilor polioxometalaţi menţionaţi constă în faptul că aceştia au fost utilizaţi doar in calitate de inhibitori ai proteinei specifice, chinaza CK2, nu şi în cazul neuroblastomului uman SH-SY5Y.

Problema invenţiei constă în extinderea spectrului de compuşi complecşi cu o înaltă activitate antitumorală.

Esenţa invenţiei constă în sinteza compuşilor complecşi polioxometalaţi cu formula:

$[N(CH_3)_4]_{5+n}[Se_2W_{19-n}V_{3+n}O_{71}]\cdot mH_2O$, unde n = 0 sau 2, m = 12 sau 17, unde atomii de seleniu (IV) sunt centrali.

Rezultatul invenţiei constă în sinteza unor compuşi complecşi polioxometalaţi cu un efect de inhibare a celulelor tumorale de 85…92% la o concentraţie de 10…100 μM.

Cercetarea efectului inhibitor al polioxometalaţilor cu formula generală $[N(CH_3)_4]_{5+n}[Se^{IV}{}_2W_{19n}V_{3+n}O_{71}]\cdot mH_2O$ a fost efectuată pe neuroblastomul uman SH-SY5Y cu ajutorul testului MTT (bromura de 3,3,4-dimetilhylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliu). Testul a confirmat că complecşii revendicaţi manifestă activitate biologică şi pot fi folosiţi în tratamentul unui şir de boli canceroase.

Exemplele 1…3 descriu sinteza substanţelor revendicate, când valorile n = 0 şi n = 12 sau cu 17.

Exemple de realizare

Exemplul 1

Sinteza $[N(CH_3)_4]_{5+n}[Se^{IV}{}_2W_{19n}V_{3+n}O_{71}]\cdot mH_2O$.

La 50 ml soluţie apoasă fierbinte, care conţine 16,50 g (50 mmol) wolframat de natriu ($Na_2WO_4\cdot H_2O$), 4,8 g (25 mmol) metavanadat de natriu ($NaVO_3$), 0,86 g (5,5 mmol) selenit de natriu (Na_2SeO_3), elementele de bază fiind într-un raport molar Se : W : V = 1 : 9 : 4,5, s-a adăugat acid clorhidric (6 M) până la un pH = 5. Amestecul obţinut a fost încălzit timp de 15 min la temperatura de 80°C, acidulat până la un pH = 2,5, după care la el s-au adăugat 10 ml de soluţie de clorură de tetrametilamoniu (de 5%) şi a fost lăsat să se cristalizeze. Cristalele aciculare de culoare roşie, care s-au sedimentat au fost filtrate şi recristalizate din apă. Randamentul de obţinere a compusului revendicat a constituit 65%.

Analiza elementală (%): Găsit: W, 58,23; V, 4,47; Se, 3,20; C, 5,08; N, 1,67; H_2O, 4,1. Calculat: W, 57,67; V, 4,72; Se, 2,93; C, 6,23; N, 1,75; H_2O, 4,0.

Exemplul 2

Sinteza $[N(CH_3)_4]_{5+n}[Se^{IV}{}_2W_{19n}V_{3+n}O_{71}]\cdot mH_2O$.

Acest exemplul descrie sinteza compusului ce corespunde formulei din titlu, pentru n = 0. La 50 ml soluţie apoasă fierbinte, care conţine 16,50 g (50 mmol) wolframat de natriu ($Na_2WO_4\cdot H_2O$), 2,06 g (16,5 mmol) metavanadat de natriu ($NaVO_3$), 0,86 g (5,5 mmol) selenit de natriu (Na_2SeO_3), elementele de bază fiind într-un raport molar Se : W : V = 1 : 9 : 3, s-a adăugat acid clorhidric (6M) până la un pH = 5. Amestecul obţinut a fost încălzit timp de 15 min la temperatura de 80°C, apoi acidulat până la pH = 2,5, după care la el s-au adăugat 10 ml de soluţie de clorură de tetrametilamoniu (de 5%) şi a fost lăsat să se cristalizeze. Cristalele aciculare de culoare roşie care s-au sedimentat au fost filtrate şi recristalizate din apă. Randamentul de obţinere a compusului revendicat a constituit 55%.

Analiza elementală (%): Găsit: W, 61,23; V, 3,17; Se, 3,20; C, 5,08; N, 1,56; H2O, 5,41. Calculat: W, 62,08; V, 2,73; Se, 2,82; C, 4,28; N, 1,25; H_2O, 5,46.

Exemplul 3

Sinteza $[N(CH_3)_4]_5[Se_2W_{19}V_3O_{71}]\cdot 17H_2O$.

La 50 ml soluţie apoasă fierbinte, care conţine 16,5 g (50 mmol) wolframat de natriu ($Na_2WO_4\cdot H_2O$), 2,06 g (16,5 mmol) metavandat de natriu ($NaVO_3$), s-a adăugat cu picătura acid clorhidric (6 M) până la un pH = 6, apoi s-a adăugat 1,2 g (5.5 mmol) de acid selenios (H_2SeO_3), elementele de bază fiind într-un raport molar Se : W : V = 1 : 9 : 3. Amestecul obţinut a fost acidulat până la un pH = 3 şi încălzit timp de 1 oră. În continuare complexul a fost sedimentat cu soluţie de clorură de tetrametilamoniu (de 5%). Cristale în formă de druze de culoare roşie-închisă au fost filtrate şi recristalizate din apă.

Analiza elementală (%): Găsit: W, 61,23; V, 3,17; Se, 3,20; C, 5,08; N, 1,56; H_2O, 5,41. Calculat: W, 62,08; V, 2,73; Se, 2,82; C, 4,28; N, 1,25; H_2O, 5,46.

Compuşii obţinuţi cu formula generală $[N(CH_3)_4]_{5+n}$ $[Se^{IV}_2W_{19n}V_{3+n}O_{71}]\cdot mH_2O$ reprezintă substanţe cristaline, având culoarea de la roşu-aprins, până la roşu-inchis, sunt stabile la aer, bine solubile in dimetilsulfoxid (DMSO), dimetilformamidă (DMFA), alcool etilic şi în apă la încălzire.

Structura compuşilor revendicaţi este confirmată de rezultatele analizei cu raze X, spectroscopiei în infraroşu şi termogravimetriei.

Analiza cu raze X a demonstrat că pentru toţi trei compuşi este caracteristic acelaşi polioxoanion $[Se^{IV}_2W_{19-n}V_{3+n}O_{71}]^{(5+n)-}$, care constă din două fragmente $\{\alpha\text{-}SeW_{9-n}V_nO_{33}\}$, legate intre ele printr-un cation $\{WO_2^{4+}\}$ şi prin trei grupe VO^{3+}. Fragmentele structurale {α-SeW9-nVnO33} sunt derivaţi lacunari de tipul B de la anionul kegghin $[SeW_{12-n}V_{-n}O_{40}]^{(6+n)-}$, adică o pereche de electroni neparticipanţi ai atomului de Se(IV) este direcţionată, nu spre interior $\{\alpha\text{-}SeW_{9-n}V_nO_{33}\}$ (ca in derivatul de tipul A), ci spre exterior, pentru completarea poliedrului coordinativ Se(IV) până la un tetraedru.

În spectrele de rezonanţă magnetică nucleară pe izotopul de seleniu (77Se) se observă două semnale cu aceeaşi intensitate, ceea ce confirmă structura neechivalentă a două subunităţi $\{SeW_{9-n}V_nO_{33}\}$ şi poate fi condiţionat de conţinutul diferit al vanadiului în aceste fragmente sau de amplasarea reciproc diferită a atomilor de vanadiu şi de wolfram. În spectrele de rezonanţă magnetică nucleară pe nucleele de vanadiu (51V) se observă 5 semnale, care de asemenea denotă prezenţa, minim a doi atomi de vanadiu in sub-unităţile $\{SeW_{9-n}V_nO_{33}\}$. Spectrele în IR ale celor trei complecşi polioxometalaţi au demonstrat prezenţa benzilor de absorbţie la 450 şi 1000 cm^{-1} caracteristice fragmentului polioxo, cele ale grupării tetra-metilamoniu la 1770 şi 1490, şi cele ale grupărilor alifatice la 2900 şi 3040 cm^{-1}. Banda de absorbţie de la 840 cm^{-1} se referă la oscilaţiile de valenţă ale legăturilor ν(Se – O). Benzile de absorbţie intensive de la 990 cm^{-1} şi 890 cm^{-1} se referă la legăturile terminale ν(V=O), ν(W=O), şi respectiv, cele de la 730 şi 780 cm^{-1} se referă la oscilaţiile aproape liniare ν(W-O-W) şi unghiulare ν(W-O-W), ν(V-O-V) ale legăturilor punte. Cercetarea stabilităţii termice a compuşilor revendicaţi în intervalul de temperaturi 20…1000°C a demonstrat că ei posedă o stabilitate termică în intervalul 260…300°C.

Cercetarea efectului inhibitor al polioxometalaţilor cu formula generală $[N(CH_3)_4]_{5+n}$ $[Se^{IV}_2W_{19n}V_{3+n}O_{71}]\cdot mH_2O$ a fost efectuată pe neuroblastomul uman SH-SY5Y cu ajutorul testului MTT (3-3,4-dimetilhylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

Celulele neuroblastomului uman SH-SY5Y au fost colectate prin tripsinizare (tratarea fermentului cu tripsină), untr-un număr de 40.000 celule/ml necesar pentru efectuarea testului, celulele fiind numărate prin metoda Bauer şi plasate în mediul de creştere.

Au fost pregătite soluţiile polioxometalaţilor $N(CH_3)_4]_5[Se_2W_{17}V_5O_{71}]\cdot 17H_2O$ şi $[N(CH_3)_4]_6[Se_2W_{19}V_3O_{71}]\cdot 12H_2O$ în dimetilsulfoxid (DMSO) cu concentraţia de 0,01, 0,1, 1,0, 10,0 şi 100 mM, care au fost introduse în mediul de creştere cu celulele pentru cercetarea efectului inhibitor al acestora. Numărul celulelor ce au supravieţuit a fost determinat cu ajutorul testului MTT.

Testul MTT se bazează pe reducerea cristalelor incolore de bromură de 3-3,4-dimetilhylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazoliu cu dehidrogenaze mitocondriale şi citoplasmatice ale celulelor vii metabolic active cu formarea cristalelor albastre de formason, numărul cărora se calculează prin metodă spectrofotometrică. Densitatea optică s-a măsurat la lungimea de undă de 540 nm cu fotometrul pentru filiere (Bio-Nek).

Rezultatele cercetărilor sunt prezentate în figurile 1, 2 şi în tabel. La acţiunea compuşilor asupra neuroblastomului SH-SY5Y peste 4 zile supravieţuiesc numai 8…10% şi 10…15% din celule. Aşadar, efectul inhibitor constituie pentru complexul $[N(CH_3)_4]_7[Se_2W_{17}V_5O_{71}]\cdot 12H_2O$ (1) 90…92% şi pentru complexul $[N(CH_3)_4]_5[Se_2W_{19}V_3O_{71}]\cdot 17H_2O$ (2) 85…90%.

Tabel

Rezultatele efectului inhibitor al compuşilor polioxometalaţi $[N(CH_3)_4]_7[Se_2W_{17}V_5O_1]\cdot 12H_2O$ (1) şi $[N(CH_3)_4]_5[Se_2W_{19}V_3O_{71}]\cdot 17H_2O$ (2) asupra neuroblastomului SH-SY5Y.

№	Concentraţia, ?M	Compusul 1	Compusul 2
1	0.01	93	98
2	0,1	80	88
3	1,0	78	82
4	10,0	10	15
5	100,0	8	10

(57) Revendicări:

Complecşi polioxometalaţi cu activitate antitumorală cu formula: $[N(CH_3)_4]_{5+n}[Se_2W_{19-n}V_{3+n}O_{71}]\cdot mH_2O$, unde n = 0 sau 2, m = 12 sau 17, unde atomii de seleniu (IV) sunt centrali.

(56) Referinţe bibliografice:

1. Prudent R., Moucadel V., Laudet B., Barette C., Lafanechere L., Hasenknopf B., Li J., Bareyt S., Lacote E., Thorimbert S., Malacria M., Gouzerh P., Cochet C. Identification of polyoxometalates as nanomolar noncompetitive inhibitors of protein kinase CK2. *Chemistry & Biology*, 2008, vol. 15, p. 683…692

Şef Secţie: GROSU Petru

Examinator: CIOCARLAN Alexandru

Redactor: UNGUREANU Mihail

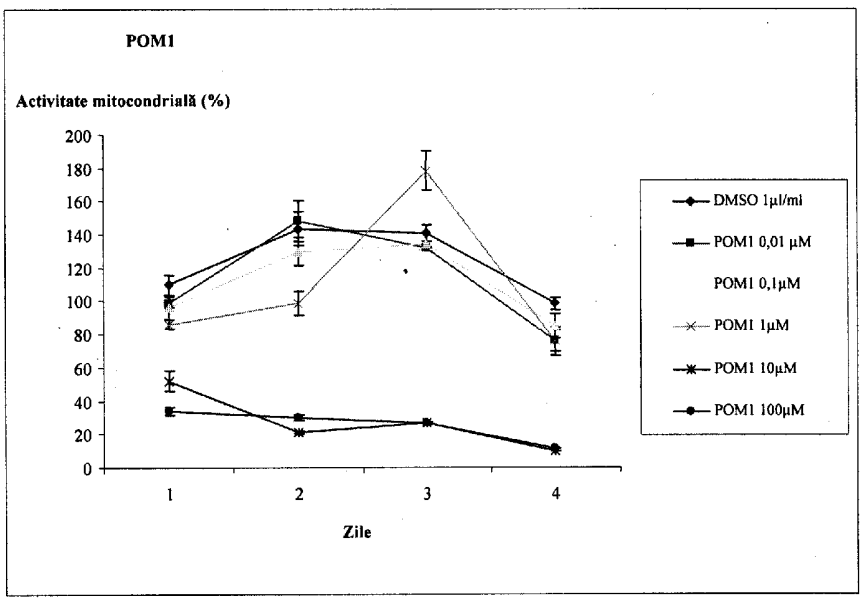

POM1
Activitate mitocondrială (%)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
Zile
DMSO 1µl/mi
POM1 0,01 µM
POM1 0,1µM
POM1 1µM
POM1 10µM
POM1 100µM

Fig. 1

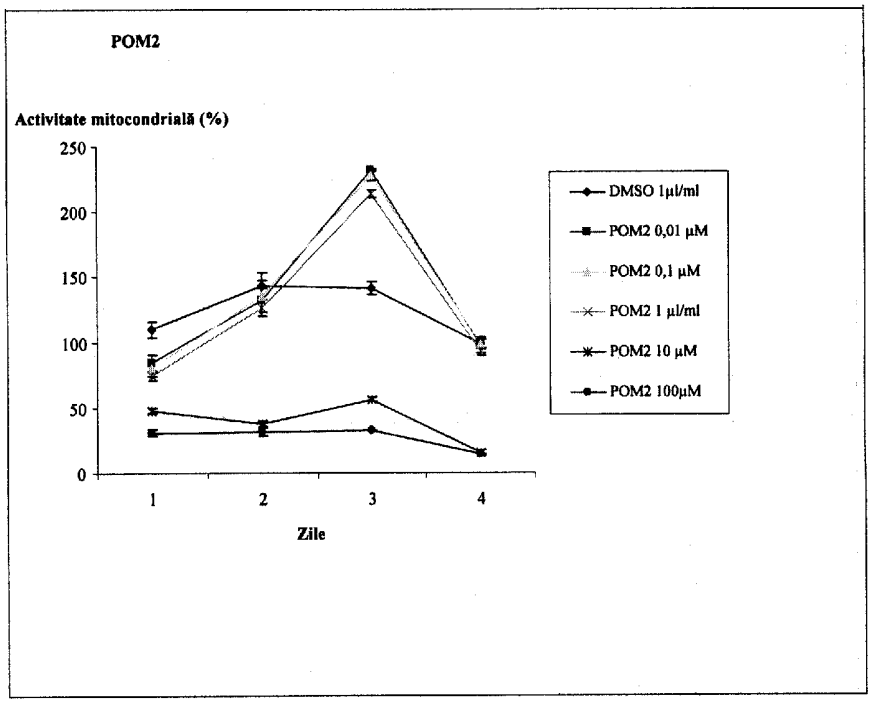

POM2
Activitate mitocondrială (%)
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
Zile
DMSO 1µl/ml
POM2 0,01 µM
POM2 0,1 µM
POM2 1 µl/ml
POM2 10 µM
POM2 100µM

Fig.2

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2009 0046 (22) Data depozit: 2009.04.23	

(51): **Int. Cl.:** ***A61P 35/00*** (2006.01)
C30B 7/00 (2006.01)
C30B 28/04 (2006.01)
C30B 29/30 (2006.01)
C30B 29/32 (2006.01)
C30B 29/46 (2006.01)

Alţi indici de clasificare:

(54) **Titlul**: **Complecşi polioxometalaţi cu activitate antitumorală**

(71) Solicitantul : **GUŢUL Tatiana, MD; DIMOGLO Anatolii, MD**

Termeni caracteristici :

a) limba română: "compuşi complecşi polioxometalaţi", „activitate anticancer"

b) limba engleză: "polyoxometalate complex compounds", "antitumoral activity".

I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării şi indici de clasificare Int. Cl.)

Int. Cl.: ***A61P 35/00*** (2006.01)
C30B 7/00 (2006.01)
C30B 28/04 (2006.01)
C30B 29/30 (2006.01)
C30B 29/32 (2006.01)
C30B 29/46 (2006.01)

II. Literatura tehnico-ştiinţifică consultată adăugător la minim de documentaţie (autori, titluri, editura, ţara şi data publicării)

1. Marcu Gh., Rusu M. Chimia polioxometalaţilor. Editura Tehnică, Bucureşti, 1997.

III. Baze de date electronice consultate (denumirea BD şi termen de documentare)

1. Bazele de date internaţionale (Internet)
- BD FIPS (RU)
- Oficiul European de Brevete (ep. espacenet.com)
- SUA (www.uspto.gov)
- Romania (www.osim. ro)

MD 1994-2009
EA 1995-2009
SU 1970-1991.

IV. Documente considerate ca relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	CN 101148445 A 2008.03.26	1
A	RU 2324688 C2 2008.05.20	1
A	US 6656509 B1 2003.12.02	1
A	DE 19751637 A1 1999.05.06	1
A	JP 11140067 A 1999.05.25	1
A	JP 2134362 A 1990.05.23	1
A	JP 63107959 A 1988.05.12	1
A	US 2006258697 A1 2006.11.16	1
A	GB 2417685 A 2006.03.08	1
A	US 2005197399 A1 2005.09.08	1
A	RU 2185819 C1 2002.07.27	1
A	JP 2028190 A 1990.01.30	1
A	JP 1102023 A 1989.04.19	1
A	JP 61267514 A 1986.11.27	1
A	WO 2004014832 A2 2004.02.19	1
A	WO 9405849 A1 1994.03.17	1
A	US 6911470 B1 2005.06.28	1

☐ **Documentele următoare sunt indicate în rubrica IV**	☐ **Informația referitoare la brevete paralele se anexează**
*** categoriile speciale ale documentelor consultate:**	**P** - document publicat inainte de data depozit, dar după data priorității invocate
A - document care defineşte stadiul anterior general	**T** - document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
E - document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta data	**X** - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fu considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat de unul singur
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate sau poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)	**Y** - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fu considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceiaşi natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă divulgare	**&** - document care face parte din aceiaşi familie de documente

Data finalizării documentării	2009.12.07
Examinatorul	CIOCARLAN Alexandru