



MD 4014 C2 2010.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4014** (13) **C2**

(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 INVENȚIE

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

(54) **Complexi polioxometalați cu activitate antitumorală**

(57) **Rezumat:**

1

Invenția se referă la sinteza compușilor complecși polioxometalați cu activitate antitumorală.

Esența invenției constă în sinteza compușilor complecși polioxometalați 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

5 Rezultatul invenției constă în sinteza unor compuși complecși polioxometalați cu un efect de inhibare a celulelor tumorale de 85...92% la o concentrație de 10...100 μM .

Revendicări: 1

Figuri: 2

10

MD 4014 C2 2010.02.28

Descriere:

Invenția se referă la sinteza compușilor complecși polioxometalați cu activitate antitumorală.

Sunt cunoscuți complecși polioxometalați (POM) care inhibă proteina specifică, chinaza CK2, fermentul care se manifestă într-un șir de boli canceroase, prin controlul proliferării și supraviețuirii celulelor, fiind un ferment de fosforilare. Inhibitorii chinazei CK2 cunoscuți în prezent, de obicei reprezintă niște compuși organici, care se combină cu centrul activ al fermentului.

Cercetătorii de la Institutul de Chimie Moleculară (Franța) în comun cu cercetătorii de la Institutul de Tehnologie și Știință din Grenoble (Franța) au scos în evidență un nou tip de inhibitori CK2. Acești compuși anorganici fac parte din grupul compușilor polioxometalați cu conținut de molibden și wolfram și se manifestă în concentrații nanomolare în calitate de inhibitori eficienți ai chinazei CK2 în comparație cu inhibitorii cunoscuți în prezent. Cercetătorii au depistat un mecanism, deși neînțeles până la capăt, de acțiune a polioxometalaților. Spre deosebire de inhibitorii organici cunoscuți, polioxometalații nu se combină cu centrul activ al fermentului. [1]

Dezavantajul complecșilor polioxometalați menționați constă în faptul că aceștia au fost utilizați doar în calitate de inhibitori ai proteinei specifice, chinaza CK2.

Problema invenției constă în extinderea spectrului de compuși complecși cu o înaltă activitate antitumorală.

Esența invenției constă în sinteza compușilor complecși polioxometalați 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 invenției constă în sinteza unor compuși complecși polioxometalați cu un efect de inhibare a celulelor tumorale de 85...92% la o concentrație de 10...100 μM .

Cercetarea efectului inhibitor al polioxometalaților cu formula generală $[N(CH_3)_4]_{5+n}[Se^{IV}_2W_{19-n}V_{3+n}O_{71}] \cdot mH_2O$ a fost efectuată pe neuroblastomul uman SH-SY5Y cu ajutorul testului MTT (bromura de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu). Testul a confirmat că complecșii revendicați manifestă activitate biologică și pot fi folosiți în tratamentul unui șir de boli canceroase.

Exemplele 1...3 descriu sinteza substanțelor revendicate, când valorile $n = 0$ și $m = 12$ sau 17 .

*Exemple de realizare**Exemplul 1*

Sinteza $[N(CH_3)_4]_7[Se_2W_{17}V_5O_{71}] \cdot 12H_2O$, unde $n = 2$, $m = 12$.

La 50 ml soluție apoasă fierbinte, care conține 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 obținut 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 soluție de clorură de tetrametilamoniu (de 5%) și a fost lăsat să se cristalizeze. Cristalele aciculare de culoare roșie, care s-au sedimentat au fost filtrate și recristalizate din apă. Randamentul de obținere 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 $[N(CH_3)_4]_5[Se_2W_{19}V_3O_{71}] \cdot 17H_2O$, unde $n = 0$, $m = 17$.

La 50 ml soluție apoasă fierbinte, care conține 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 obținut 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 soluție de clorură de tetrametilamoniu (de 5%) și a fost lăsat să se cristalizeze. Cristalele aciculare de culoare roșie care s-au sedimentat au fost filtrate și recristalizate din apă. Randamentul de obținere a compusului revendicat a constituit 55%.

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.

Exemplul 3

Sinteza $[N(CH_3)_4]_5[Se_2W_{19}V_3O_{71}] \cdot 17H_2O$, unde $n = 0$, $m = 17$.

La 50 ml soluție apoasă fierbinte, care conține 16,5 g (50 mmol) wolframat de natriu ($Na_2WO_4 \cdot H_2O$), 2,06 g (16,5 mmol) metavanadat 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 obținut a fost acidulat până la un pH = 3 și încălzit timp de 1 oră. În continuare complexul a fost sedimentat cu soluție de clorură de tetrametilamoniu (de 5%). Cristale în formă de druze de culoare roșie-închisă au fost filtrate și recristalizate din apă.

MD 4014 C2 2010.02.28

4

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; H₂O - 5,46.

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

Structura compușilor revendicați este confirmată de rezultatele analizei cu raze X, spectroscopiei în infraroșu și termogravimetriei.

Analiza cu raze X a demonstrat că pentru toți trei compuși este caracteristic același polioxoanion $[Se^{IV}_2W_{19-n}V_{3+n}O_{71}]^{(5+n)-}$, care constă din două fragmente $\{\alpha-SeW_{9-n}V_nO_{33}\}$, legate între ele printr-un cation $\{WO_2^{4+}\}$ și prin trei grupe VO^{3+} . Fragmentele structurale $\{\alpha-SeW_{9-n}V_nO_{33}\}$ sunt derivați lacunari de tipul B de la anionul keggin $[SeW_{12-n}V_{9-n}O_{40}]^{(6+n)-}$, adică o pereche de electroni neparticipanți ai atomului de Se(IV) este direcționată, nu spre interior $\{\alpha-SeW_{9-n}V_nO_{33}\}$ (ca în derivatul de tipul A), ci spre exterior, pentru completarea poliedrului coordinativ Se(IV) până la un tetraedru.

În spectrele de rezonanță magnetică nucleară pe izotopul de seleniu (⁷⁷Se) se observă două semnale cu aceeași intensitate, ceea ce confirmă structura neechivalentă a două subunități $\{SeW_{9-n}V_nO_{33}\}$ și poate fi condiționat de conținutul diferit al vanadiului în aceste fragmente sau de amplasarea reciproc diferită a atomilor de vanadiu și de wolfram. În spectrele de rezonanță magnetică nucleară pe nuclelele de vanadiu (⁵¹V) se observă 5 semnale, care de asemenea denotă prezența, minim a doi atomi de vanadiu în subunitățile $\{SeW_{9-n}V_nO_{33}\}$. Spectrele în IR ale celor trei complecși polioxometalați au demonstrat prezența benzilor de absorbție la 450 și 1000 cm⁻¹ caracteristice fragmentului polioxo, cele ale grupării tetrametilamoniu la 1770 și 1490, și cele ale grupărilor alifatică la 2900 și 3040 cm⁻¹. Banda de absorbție de la 840 cm⁻¹ se referă la oscilațiile de valență ale legăturilor v(Se=O), v(W=O), și respectiv, cele de la 730 și 780 cm⁻¹ se referă la oscilațiile legăturilor punte aproape liniare v(W-O-W), unghiulare v(W-O-W) și v(V-O-V). Cercetarea stabilității termice a compușilor revendicați în intervalul de temperaturi 20...1000°C a demonstrat că ei posedă o stabilitate termică în intervalul 260...300°C.

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

Celulele neuroblastomului uman SH-SY5Y au fost colectate prin tripsinizare (tratarea fermentului cu tripsină), într-un număr de 40000 celule/ml necesar pentru efectuarea testului, celulele fiind numărate prin metoda Bauer și plasate în mediul de creștere.

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

Testul MTT se bazează pe reducerea cristalelor incolore de bromură de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu cu dehidrogenaze mitocondriale și citoplasmice ale celulelor vii metabolice active cu formarea cristalelor albastre de formazon, numărul cărora se calculează prin metodă spectrofotometrică. Densitatea optică s-a măsurat la lungimea de undă de 540 nm cu fotometrul prin filiere (Bio-Nek).

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

Tabel

Rezultatele efectului inhibitor al compușilor polioxometalați $[N(CH_3)_4]_7[Se_2W_{17}V_5O_{71}] \cdot 12H_2O$ (1) și $[N(CH_3)_4]_5[Se_2W_{19}V_3O_{71}] \cdot 17H_2O$ (2) asupra neuroblastomului SH-SY5Y.

№	Concentrația, μM	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

MD 4014 C2 2010.02.28

5

(57) Revendicări:

- 5 Complecși polioxometalați cu activitate antitumorală cu formula:
[N(CH₃)₄]_{5+n}[Se₂W_{19-n}V_{3+n}O₇₁] $\cdot$ mH₂O, unde n = 0 sau 2, m = 12 sau 17, unde atomii de seleniu (IV) sunt centrali.

10

(56) Referințe bibliografice:

1. Prudent R., Moucadet 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

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

CIOCARLAN Alexandru

Redactor:

UNGUREANU Mihail

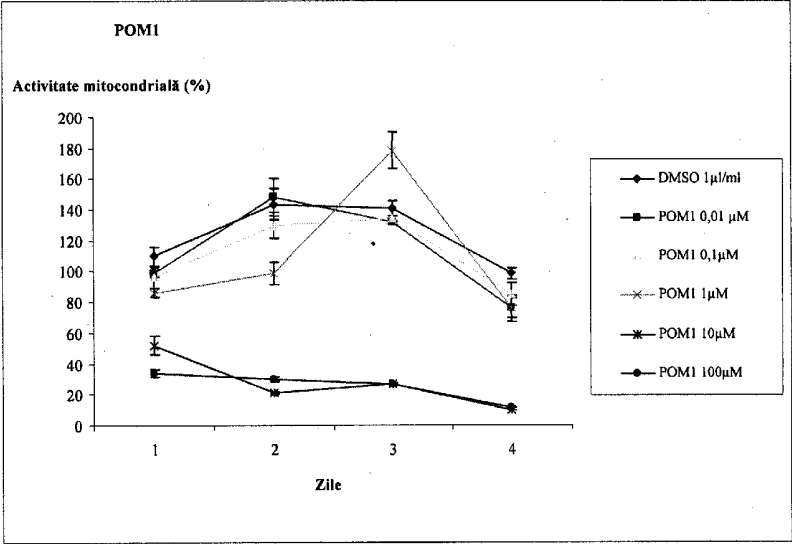


Fig. 1

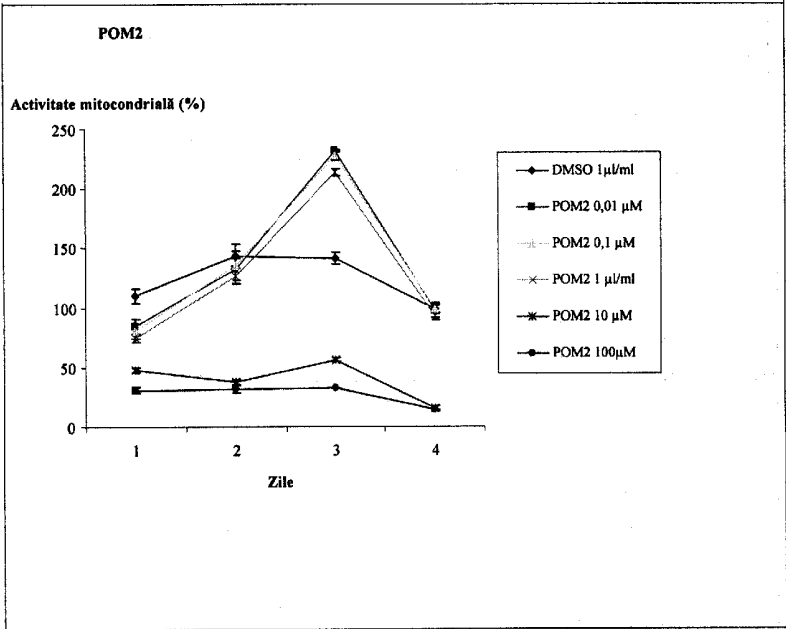


Fig.2

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) Alți indici de clasificare: (54) Titlul: Complecși polioxometalați cu activitate antitumorală (71) Solicitantul : GUȚUL Tatiana, MD; DIMOGLO Anatolii, MD Termeni caracteristici : a) limba română: “compuși complecși polioxometalați”, „activitate anticancer” b) limba engleză: “polyoxometalate complex compounds”, “antitumoral activity”.	
I. Minimul de documente consultate (sistemul clasificării și 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-științifică consultată adăugător la minim de documentație (autori, titluri, editura, țara și data publicării)	
1. Marcu Gh., Rusu M. Chimia polioxometalaților. Editura Tehnică, București, 1997.	
III. Baze de date electronice consultate (denumirea BD și termen de documentare)	
1. Bazele de date internaționale (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 înainte de data depozit, dar după data priorității invocate
A - document care definește 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 evidență 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 fi 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 fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași 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 aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2009.12.07
Examinatorul		CIOCARLAN Alexandru