



MD 4014 B1 2010.02.28

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția 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 INVENȚIE

<b>Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării</b>	
(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) Complecși 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.

5

10

2

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  $\mu$ M.

Revendicări: 1

Figuri: 2

MD 4014 B1 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. [1]

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.

Dezavantajul complecșilor polioxometalați menționați constă în faptul că aceștia au fost utilizați doar în calitate de inhibitori ai proteinei specifice, chinaza CK2, nu și în cazul neuroblastomului uman SH-SY5Y.

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  $\mu$ M.

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-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliu). 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  $n = 12$  sau cu  $17$ .

*Exemple de realizare*

*Exemplul 1*

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

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<sub>2</sub>O, 4,1. Calculat: W, 57,67; V, 4,72; Se, 2,93; C, 6,23; N, 1,75; H<sub>2</sub>O, 4,0.

*Exemplul 2*

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

Acest exemplu descrie sinteza compusului ce corespunde formulei din titlu, pentru  $n = 0$ . 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<sub>2</sub>O, 5,41. Calculat: W, 62,08; V, 2,73; Se, 2,82; C, 4,28; N, 1,25; H<sub>2</sub>O, 5,46.

*Exemplul 3*

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

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.

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

Compușii obținuți cu formula generală  $[N(CH_3)_4]_{5+n} [Se^{IV}_2W_{19n}V_{3+n}O_{71}] \cdot nH_2O$  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.

5 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 keeghin  $[SeW_{12-n}V_nO_{40}]^{(6+n)-}$ , 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.

10 În spectrele de rezonanță magnetică nucleară pe izotopul de seleniu ( $^{77}Se$ ) 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 nucleele de vanadiu ( $^{51}V$ ) 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 1770 și 1490, și cele ale grupărilor alifatiche la 2900 și 3040  $cm^{-1}$ . Banda de absorbție de la 840  $cm^{-1}$  se referă la oscilațiile de valență ale legăturilor  $\nu(Se-O)$ . Benzile de absorbție intensive de la 990  $cm^{-1}$  și 890  $cm^{-1}$  se referă la legăturile terminale  $\nu(V=O)$ ,  $\nu(W=O)$ , și respectiv, cele de la 730 și 780  $cm^{-1}$  se referă la oscilațiile aproape liniare  $\nu(W-O-W)$  și unghiulare  $\nu(W-O-W)$ ,  $\nu(V-O-V)$  ale legăturilor puncte. 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.

25 Cercetarea efectului inhibitor al polioxometalaților cu formula generală  $[N(CH_3)_4]_{5+n} [Se^{IV}_2W_{19n}V_{3+n}O_{71}] \cdot nH_2O$  a fost efectuată pe neuroblastomul uman SH-SY5Y cu ajutorul testului MTT (3-3,4-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

30 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 și plasate în mediul de creștere.

Au fost pregătite soluțiile polioxometalaților  $N(CH_3)_4]_5[Se_2W_{17}V_5O_{71}] \cdot 17H_2O$  și  $[N(CH_3)_4]_6[Se_2W_{19}V_3O_{71}] \cdot 12H_2O$  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.

35 Testul MTT se bazează pe reducerea cristalelor incolore de bromură de 3-3,4-dimetilthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium cu dehidrogenaze mitocondriale și citoplasmice 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).

40 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

45

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, ?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

50

**(57) Revendicări:**

- 5 Complecși polioxometalați cu activitate antitumorală cu formula:  
[N(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sub>5+n</sub>[Se<sub>2</sub>W<sub>19-n</sub>V<sub>3+n</sub>O<sub>71</sub>]-mH<sub>2</sub>O, unde n = 0 sau 2, m = 12 sau 17, unde atomii de seleniu (IV) sunt centrali.

10

**(56) Referințe 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

**Șef Secție:**

GROSU Petru

**Examinator:**

CIOCARLAN Alexandru

**Redactor:**

UNGUREANU Mihail

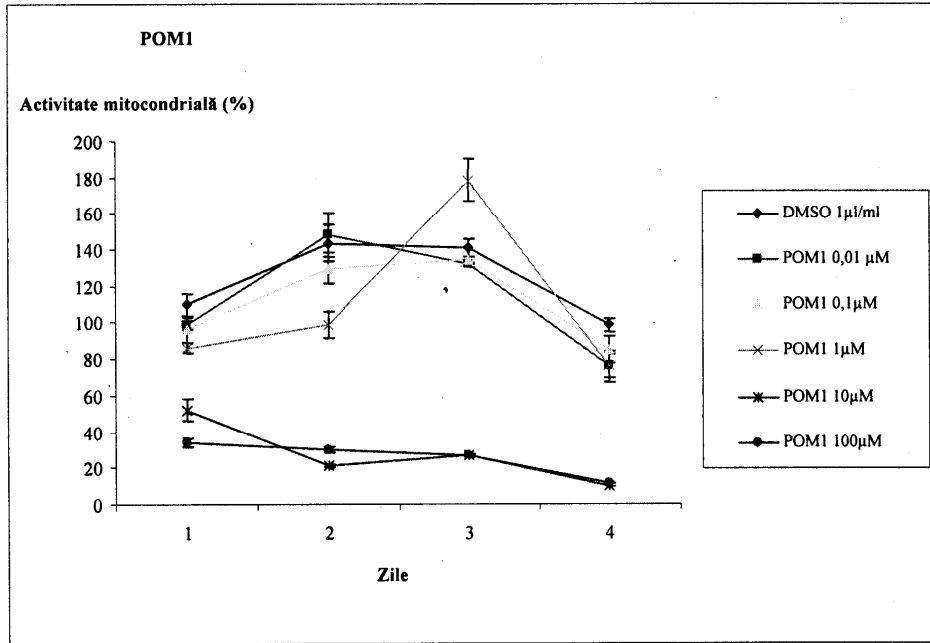


Fig. 1

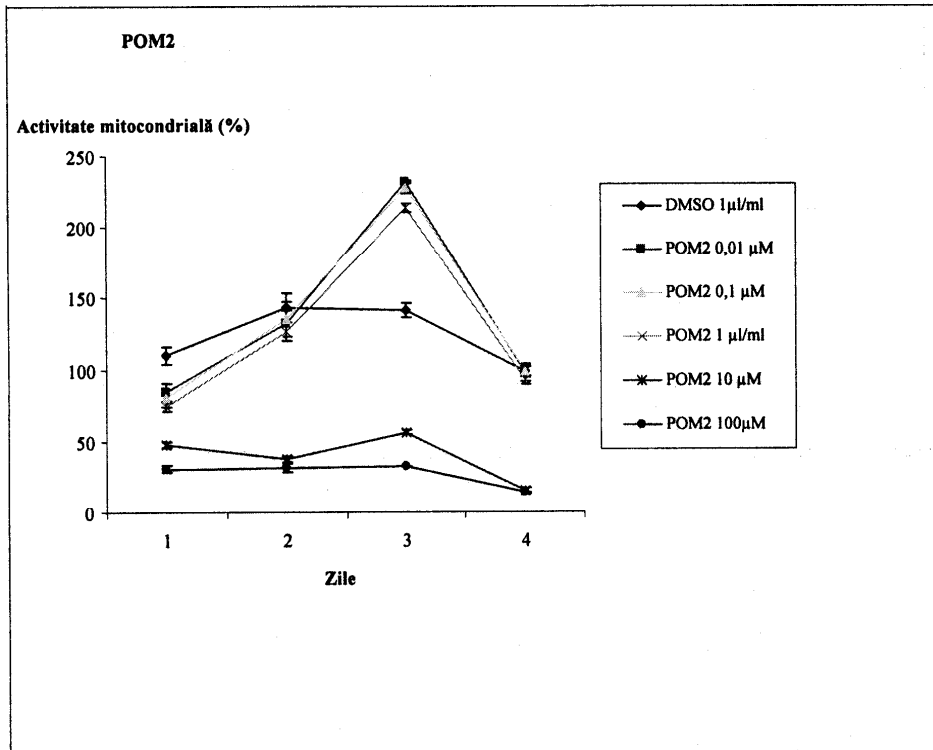


Fig.2