



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00885**

(22) Data de depozit: **25/11/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2019** BOPI nr. **5/2019**

(41) Data publicării cererii:  
**30/06/2014** BOPI nr. **6/2014**

(73) Titular:  
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN BUCUREȘTI, STR.DIONISIE LUPU NR.37, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **NIȚULESCU GEORGE MIHAI, NR.82, SĂRATA MONTEORU, BZ, RO;**  
• **ALDEA MĂDĂLINA IOANA, BD. CONSTANTIN BRÂNCOVEANU NR. 10, BL. B3, AP. 30, ET. 8, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **CORALIA BLEOTU, ALEEA LUNCA BRADULUI NR. 2, BL. H5, SC. 6, AP. 2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **MATEI LILIA, STR. IALOVENI NR. 102, AP. 61, CHIȘINĂU, MD;**  
• **HÎRJĂU MIRCEA, BD. TINERETULUI NR. 3, BL. Z1, SC. 1, ET. 10, AP. 64, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **VELESCU BRUNO ȘTEFAN, STR.NEAGOE VODĂ NR.53, BACĂU, BC, RO;**  
• **OLARU OCTAVIAN TUDOREL, STR. ZBOINA NEAGRĂ NR. 5, BL. 98, SC. 1, ET. 1, AP. 8, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**EP 1861395 B1; EP 0343893 B1**

(54) **AGENȚI ANTITUMORALI DERIVAȚI  
AI N-(4-HIDROXI-4-METIL-3-FENILTIAZOLIDIN-2-ILIDEN)  
-1-METIL-1H-PIRAZOL-4-CARBOXAMIDEI**



# RO 129522 B1

1           Invenția de față se referă la derivați ai N-(4-hidroxi-4-metil-3-feniltiazolidin-2-iliden)-1-  
-metil-1H-pirazol-4-carboxamidei, compuși cu proprietăți antitumorale prin inducția apoptozei  
3           celulare, la prepararea acestora prin cuplarea derivațiilor de N-aril-N'-[(1-metil-1H-pirazol-4-  
-il)carbonil]-tiouree cu bromoacetonă, în prezență de piridină, și la obținerea de compoziții  
5           farmaceutice conținând ca unic principiu activ un derivat de N-(4-hidroxi-4-metil-3-feniltiazolidin-  
2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidă.

7           Cancerul este o maladie cu răspândire crescândă la nivel populațional. Tratatamentul  
acestuia este greu de tolerat, iar eradicarea completă a bolii este dificil de obținut cu trata-  
9           mentele curente. Cercetările întreprinse pentru conceperea și identificarea de noi molecule  
capabile să trateze cancerul vizează noi mecanisme moleculare, inducerea apoptozei celulare  
11          fiind unul dintre cele mai promițătoare.

13          Apoptoza reprezintă un mecanism de control celular ce permite eliminarea din organism  
a celulelor care prezintă potențialul de a deveni tumorale din cauza prezenței unor defecte la  
nivelul ADN, sau a unui ciclu celular aberant. Inhibitorii dezacetilării histonelor au fost studiați  
15          ca inductorii ai apoptozei celulare pe linii celulare de carcinom ovarian, fenotipul agresiv,  
rezultatele studiilor arătând efecte antitumorale semnificative prin inducerea apoptozei cu  
17          scăderea expresiei ciclonei B1 [Chen S. și col., **PLoS One**, 2013, 8(11)]. Alte clase de compuși,  
ca analogii de 3,5-bis(4-hidroxi-3-metilstiril)-N-(fenil-substituit)-1H-pirazol-1-carboxamidă, au fost  
19          evaluați ca agenți anticanceroși. Rezultatele au evidențiat acțiunea anticanceroasă superioară  
pentru derivații pirazolici, comparativ cu analogii structurali pirimidinici [Ahsan M. J. și col.,  
21          **BioMed Research International**, 2013, 2013, 239354-68], cu posibil mecanism de inducere  
a apoptozei [Jia Y.-L. și col., **Journal of Asian Natural Products Research**, 2009, 11(11),  
23          918-928]. O serie de studii *in silico* au descris acțiuni anti-angiogeneze pentru nucleul pirazolic  
[Kankanala J. și col., **British Journal of Pharmacology**, 2012, 166(2), 737-48]. Angiogeneza  
25          care caracterizează țesutul tumoral [Carmeliet P., Jain R. K., **Nature**, 2000, 407(6801), 249-57]  
permite noi abordări terapeutice fundamentate pe posibilitățile farmacocinetice de distribuție la  
27          nivel tumoral ale agenților inductorii ai apoptozei celulare. În acest fel, se permite inductorilor de  
apoptoză atacul direct, prin fluxul mare de sânge, cu pătrunderea acestora la nivelul țesutului  
29          tumoral solid și, în același timp, reducerea numărului de vase de sânge nou formate la nivel  
tumoral [Perez E. A., Spano J. P., **Cancer**, 2012, 118(12), 3014-25], care poate constitui o  
31          alternativă pentru noile molecule intrate în terapie ca bevacizumab [Thompson Coon J. și col.,  
**Health Technology Assessment**, 2013, 17(14), 1-237].

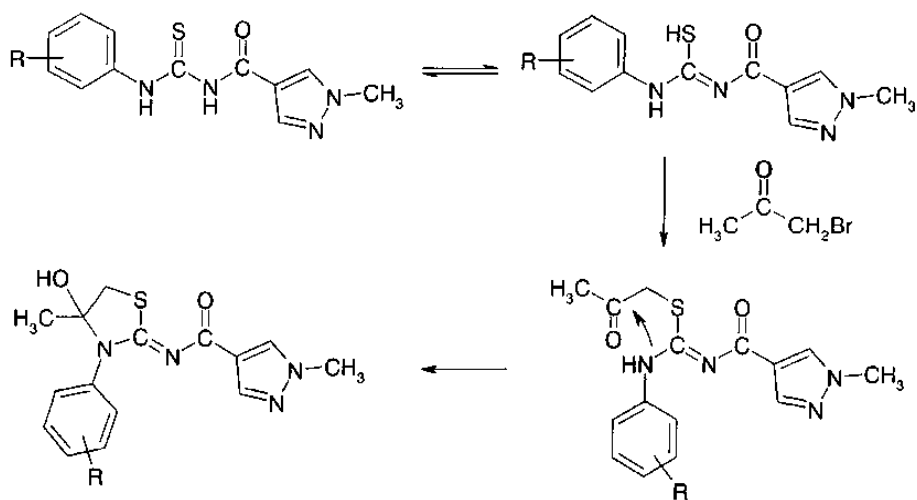
33          Alte studii realizate pe derivați pirazolici au descris efectul acestora asupra metastazelor  
din cancerul de sân [Wang F. și col., **Journal of Medicinal Chemistry**, 2011, 54(20), 7193-  
35          205]. Derivații pirazolici au fost investigați ca potențiali inhibitori ai proteinei de șoc termic  
Hsp90, cu aplicații în terapia cancerului, cu perspectiva introducerii în studiile clinice de fază I  
37          [McDonald E. și col., **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2006, 6(11), 1193-203].

39          În acest fel, nucleu pirazolic atrage o atenție sporită datorită potențialului farmaceutic  
considerabil al derivaților acestuia ca agenți antitumorali prin diverse mecanisme biochimice  
[Shaw A. Y. și col., **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2010, 18(9), 3270-8], [Zheng L.-W.  
41          și col., **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2009, 17(5), 1957-62].

43          Invenția de față se referă la derivați ai N-(4-hidroxi-4-metil-3-feniltiazolidin-2-iliden)-1-  
metil-1H-pirazol-4-carboxamidei cu proprietăți antitumorale, având formula generală prezentată  
în figură.

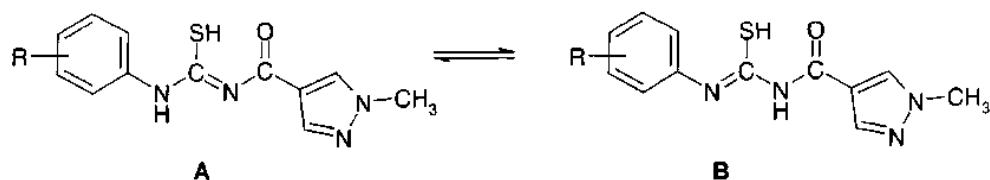
# RO 129522 B1

Obiectul invenției constă într-un procedeu de obținere a derivaților definiți ca mai sus, prin cuplarea derivaților de N-aril-N'-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-tiouree cu bromoacetona, în prezență de piridină, conform succesiunii de reacții prezentate în schema de mai jos, și demonstrarea efectelor antiproliferative și inductoare ale apoptozei celulare ale acestora.



Schema 1

Sinteza folosește ca materie primă derivați de N-aril-N'-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-tiouree preparați conform metodei descrise de literatură [Nițulescu și col., Brevet RO 123418, 2012]. Acești compuși pot izomeriza la forma tautomeră de izotiouree, și pot exista sub două forme tautomere tiolice. Datorită efectului atrăgător de electroni al grupei carbonil, structura (A) este predominantă formei (B), conform schemei 2.



Schema 2

Grupele tiol prezintă un caracter nucleofil mai pronunțat decât atomii de azot, și reacționează cu bromoacetona, formând un derivat de S-2-oxopropil-izotiouree. Substituția nucleofilă este favorizată de prezența grupei carbonil în poziția a, și de pH-ul alcalin creat de piridină. Piridina are și rolul de a capta ionul bromură, formând bromura de piridiniu, insolubilă în mediul de reacție.

Prin atacul nucleofil al grupei -NH- asupra grupei carbonil se formează derivații de N-(4-hidroxi-4-metil-3-feniltiazolidin-2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidă.

Cercetări anterioare [Nițulescu și col., European Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 45(11), 4914-9] descriu obținerea unor derivați asemănători, cu semnificative efecte anticanceroase, prin condensarea derivaților de tiouree menționați mai sus cu bromoacetona, în mediu de trietilamină. Utilizarea trietilaminei pentru captarea ionului bromură conduce la un pH acid care favorizează eliminarea spontană a unei molecule de apă, și determină formarea unor derivați de feniltiazol.

În cadrul acestei invenții am înlocuit trietilamina cu piridina, cu un caracter bazic mult mai mare, ca fixator de proton. Această modificare permite obținerea derivaților doriți, cu structură N-(4-hidroxi-4-metil-3-feniltiazolidin-2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidică. Utilizarea unui captator ionic cu caracter bazic mai puternic, de tip hidroxid de sodiu, conduce la hidroliza grupei tioamidice, și astfel nu este indicată.

Grupa alcoolică din structura compușilor descriși prin această invenție contribuie în mod decisiv la creșterea solubilității, comparativ cu derivații feniltiazolici analogi; îmbunătățirea solubilității este foarte importantă pentru asigurarea unei biodisponibilități corespunzătoare.

Bromoacetona se sintetizează prin reacția acetonei cu bromul, în raport molar de 1:1. Folosirea unui exces de brom îmbunătățește mult randamentul, dar prezintă dezavantajul formării de derivați polibromurați. Sinteza se poate realiza și folosind cloroacetona, dar randamentul este mult mai mic.

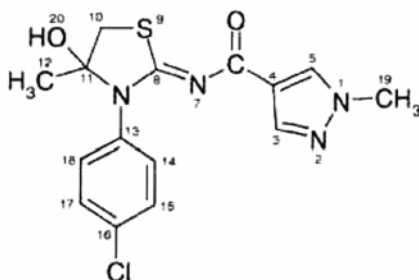
Pentru dovedirea structurii s-au efectuat spectre IR și RMN. Spectrele IR s-au realizat cu un aparat JASCO FT/IR-4200 prevăzut cu un accesoriu ATR PRO450-S cu optică diamond, folosind substanță solidă în tehnica ATR. Spectrele <sup>1</sup>H-RMN și <sup>13</sup>C-RMN au fost înregistrate la 300 MHz, respectiv, 75,075 MHz, folosind un aparat Gemini 300BB, utilizând ca solvent DMSO-d<sub>6</sub>, iar ca standard intern TMS. Pentru atribuirea univocă a semnalelor s-au efectuat și experimente bi-dimensionale COSY și HETCOR.

Analiza elementală s-a realizat cu un aparat Perkin Elmer CHNS/O Analyser Series II 2400. Temperaturile de topire au fost determinate cu un aparat Electrothermal 9100, și sunt necorectate. Rezultatele obținute prin analiza spectrală și elementală confirmă structura noilor compuși.

Se dau în cele ce urmează două exemple de realizare a invenției.

## Exemplul 1

Sinteza N-(3-(4-clorofeniltiazolidin)-4-hidroxi-4-metil-2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidei (C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S)



Într-un balon cu trei găuri, prevăzut cu refrigerent și agitator mecanic, se dizolvă N-4-clorofenil-N'-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-tiouree (2,95 g; 0,01 moli) în 200 ml acetonă anhidră, și se adaugă piridina anhidrizată și proaspăt distilată (0,01 moli; 0,8 ml).

Deoarece bromoacetona este o substanță ușor reactivă și puternic lacrimogenă, se preferă prepararea sa *ex-tempore*. Într-o pâlnie de picurare se aduc acetona (10 ml) și bromul (0,25 ml), și se lasă să reacționeze la temperatura camerei. După 5...10 min se observă decolorarea soluției, indicând formarea bromoacetonei.

Se picură la temperatura camerei, pe parcursul unei ore, sub agitare, soluția de bromoacetona peste soluția de tiourea. Se observă treptat apariția unui precipitat de bromură de piridiniu. Agitarea se continuă încă o oră. Se îndepărtează solvenul prin distilare la presiune redusă, se spală reziduu cu apă, pentru îndepărtarea bromurii de piridiniu și a excesului de piridină, se usucă și se purifică prin recristalizare.

# RO 129522 B1

Se purifică prin recristalizare din acetat de etil. 1  
Rezultă 2,49 g de compus cristalin alb (350,83 g/mol) (randament 71%), cu P.t. 238-  
239°C. 3

Analiza IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3203( $\nu_{\text{O-H}}$ ); 1664( $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1587( $\nu_{\text{C=N}}$ ); 1159( $\nu_{\text{C-O}}$ ).

Analiza RMN: 5

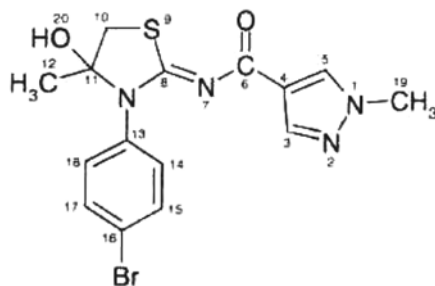
$^1\text{H}$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm, J Hz): 7,79 (s, H-3); 7,56 (d, 8,6, 2H, H-15, H-17); 7,49 (s, H-5); 7,37 (d, 8,6, 2H, H-14, H-18); 3,79 (s, 3H, H-19); 3,52 (d, 1H, 11,8, H-10); 3,31 (d, 1H, 11,8, H-10); 1,38 (s, H-12). 7

$^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 171,18 (C-6); 170,26 (C-8); 140,19 (C-5); 137,08 (C-13); 133,29 (C-3); 132,21 (C-16); 130,99 (C-15, C-17); 128,61 (C-14, C-18); 121,74 (C-4); 90,61 (C-11); 41,03 (C-10); 25,96 (C-12). 9

Analiza elementală: Teoretic C 51,35%, H 4,31%, N 15,97%, S, 9,14. Experimental C 51,27%, H 4,33%, N 16,16%, S, 9,22. 13

## Exemplul 2

Sinteza *N*-(3-(4-bromofeniltiazolidin)-4-hidroxi-4-metil-2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidei ( $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{BrN}_4\text{O}_2\text{S}$ ) 15



Compusul se prepară prin metoda menționată anterior, fiind necesare 2,39 g (0,01 moli) 25  
de *N*-4-bromofenil-*N'*-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-tiouree și 200 ml de acetonă anhidră, ca  
solvent. Rezultă 2,84 g compus (395,28 g/mol), randament 72%, cristalizat, alb, cu P.t. 27  
176-80°C.

Analiza IR ( $\text{m}^{-1}$ ): 3203( $\nu_{\text{O-H}}$ ); 1664( $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1587( $\nu_{\text{C=N}}$ ); 1159( $\nu_{\text{C-O}}$ ). 29

Analiza RMN:

$^1\text{H}$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm, J Hz): 7,81 (s, H-3); 7,70 (d, 8,5, 2H, H-14, H-18); 7,50 (s, H-5); 7,32 (d, 8,5, 2H, H-15, H-17); 3,80 (s, 3H, H-19); 3,48 (d, 1H, 11,8, H-10); 3,28 (d, 1H, 11,8, H-10); 1,39 (s, H-12). 31

$^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 171,20 (C-6); 170,21 (C-8); 140,21 (C-5); 137,46 (C-13); 133,29 (C-3); 131,55 (C-15, C-17); 131,32 (C-14, C-18); 121,75 (C-4); 120,77 (C-16); 90,61 (C-11); 41,04 (C-10); 25,98 (C-12). 33

Analiza elementală: Teoretic C 45,58%, H 3,83%, N 14,17%, S, 8,11. Experimental C 45,67%, H 3,80%, N 14,21%, S, 8,04. 37

## Evaluarea potențialului anticanceros

 39

Pentru evaluarea potențialului antitumoral s-au efectuat o serie de determinări biologice  
specifice, după cum urmează: 41

### Detectia apoptozei cu sistemul anexină V-iodură de propidium

Celulele tratate cu compus pentru 24 h au fost tripsinizate, spălate cu PBS, 43  
resuspendate în tampon conținând  $\text{Ca}^{2+}$ , și colorate cu un amestec de anexină V-iodură de  
propidium. Achiziția datelor a fost efectuată cu Beckman Coulter Epics XL Flow Cytometer, 45  
analizând 10000 de evenimente/test. Analiza datelor achiziționate a fost realizată cu programul  
FlowJo. 47

# RO 129522 B1

1 Inducerea morții celulare, determinată cu ajutorul kitului Annexin V-FITC Apoptosis  
2 Detection Kit, a fost cuantificată ca procent de celule Anexina+ (apoptoza timpurie) și Anexina  
3 + iodura de propidium (apoptoza târzie sau necroza) (tabelul 1).

Tabelul 1

## 5 *Cuantificarea efectelor apoptotic/necrotic induse de substanțele nou sintetizate*

	necroza	apoptoza timpurie	apoptoza târzie	celule viabile
7 Exemplul 1	1,44	4,96	3,37	90,2
8 Exemplul 2	1,34	6,22	6,76	85,7

## 9 *Determinarea nivelurilor relative ale proteinelor implicate în apoptoză*

11 Au fost analizate lizate proteice obținute din linia celulară HCT8 cu și fără tratament cu  
12 substanțele nou sintetizate. Analiza s-a realizat cu kit-ul Proteome Profiler Array-Human  
13 Apoptosis Array Kit (ARY009, R&D System), utilizând 400 µg lizat proteic total din fiecare probă.  
14 Acesta a fost incubat cu membrane de nitroceluloză din kit, pe care au fost spotati anticorpi  
15 specifici pentru diferite proteine implicate în apoptoză. Ulterior membranele au fost spălate  
16 pentru îndepărtarea proteinelor nelegate, și incubate cu un cocktail de anticorpi biotinilați. În  
17 continuare s-a aplicat conjugatul streptavidina-HRP, membranele au fost spălate pentru  
18 îndepărtarea excesului de conjugat, și s-a adăugat substratul chemiluminescent Novex ECL  
19 (Invitrogen). Detectia a fost realizată prin captarea semnalului pe filme de raze X, urmată de  
20 dezvoltare. Intensitatea semnalului a fost analizată cu ajutorul programului ImageJ 1.42.  
21 Tratamentul cu 50 µg/ml din derivați ai N-(4-hidroxi-4-metil-3-feniltiazolidin-2-iliden)-1-metil-1H-  
22 pirazol-4-carboxamidei induce creșterea proteinelor implicate în calea extrinsecă a apoptozei  
23 (FAS, FAD, TRAIL). De asemenea, nivelul pro-caspazei 3 scade, și crește nivelul caspazei 3  
24 clivate, susținând astfel activarea căilor apoptotice.

## 25 *Analiza ciclului celular*

27 După expunerea celulelor Hep la diferite concentrații de substanță, suspensia de celule  
28 a fost fixată în etanol 70% cel puțin 30 min. După centrifugare sedimentul celular a fost reluat  
29 în 1 ml soluție tampon fosfat conținând 50 µg/ml RNA-ză și propidium iodid (PI). Celulele  
30 colorate au fost analizate la citometrul de flux în 2 h. Procentul celulelor în diferite faze ale  
31 ciclului celular a fost determinată cu programul FlowJo. Substanțele de la exemplu 1 și 2 induc  
32 creșterea drastică a fazelor G2/M (tabelul 2), dovedind un important efect antiproliferativ.

Tabelul 2

## 33 *Efectul substanțelor asupra ciclului celular determinat prin citometrie în flux*

	G0/G1	S	G2/M
35 Martor	74,51	21,01	7,82
37 Exemplul 1	43,62	27,01	33,4
38 Exemplul 2	37,33	28,71	39,46

39 Determinările biologice efectuate demonstrează efectul antiproliferativ al derivaților  
40 cu structură N-(4-hidroxi-4-metil-3-feniltiazolidin-2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidică pre-  
41 zentați în această invenție.

# RO 129522 B1

Scopul invenției de față este utilizarea derivaților N-(4-hidroxi-4-metil-3-feniltiazolidin-2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidici ca medicamente antitumorale și, în acest scop, am elaborat o formă farmaceutică pentru administrare orală. Deoarece acești compuși posedă o solubilitate apoasă redusă, prepararea de sisteme multiparticulate de tip pelete optimizează eficacitatea terapeutică prin modularea cedării, și asigură o biodisponibilitate optimă. Dimensiunile mici ale peletelor asigură distribuirea de-a lungul tractului intestinal, și eliberarea substanței active în doze mici, favorizând dizolvarea și absorbția sa.

Pentru obținerea unui medicament anticanceros s-au preparat la scară de laborator, prin metoda de extrudare-sferonizare, pelete alcătuite dintr-un amestec binar de excipienți, celuloză microcristalină (MCC) și lactoză, asociat unei doze de 100 mg de substanță activă pe unitate dozată.

*Procedeu de obținere a medicamentului anticanceros pe baza derivaților N-(4-hidroxi-4--metil-3-feniltiazolidin-2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidici*

Într-un pahar Berzelius de 200 ml se prepară 100 g soluție de liant, prin dizolvarea PVP (2,5 g) în apă (97,5 g), sub agitare cu un agitator magnetic. Componentele pulverulente (substanță anticanceroasă 1 g, celuloză microcristalină 2,8 g, lactoză 1,4 g) s-au transferat într-un mixer de laborator, și s-au amestecat pentru omogenizare, timp de 10 min, la viteza de 15 rpm. S-a continuat amestecarea în timp ce soluția de liant 2,5% (2,8 g) a fost adăugată prin pulverizare peste amestec, rezultând o masă coezivă, plastică.

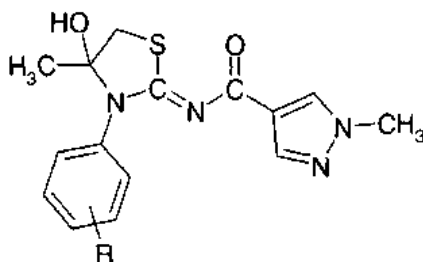
Masa umedă a fost adusă în extruderul echipat cu o matriță având deschiderea ochiurilor de 1 mm, și a fost extrudată la o viteză de 15 rpm. Extrudatele umede au fost încărcate în sferonizatorul echipat cu o placă de fricțiune cu diametrul de 12 cm și striuri dispuse încrucișat, în unghi drept. Sferonizarea s-a realizat la o viteză de rotație a plăcii de fricțiune de 872 rpm, timp de 2 min. Peletele au fost scoase din echipamentul de sferonizare și uscate în etuvă, la 40°C, timp de 1 h, până la o umiditate reziduală de cel mult 3%, obținându-se 5,45 g pelete. Acestea au fost supuse cernerii pentru a separa fracțiunea dimensională 0,8...1,18 mm, obținându-se 4,90 g de pelete cu un coeficient de circularitate de 75%, calculat după formula  $4 \pi \cdot \text{suprafață}/\text{perimetru}^2$ , proprietăți determinate utilizând software-ul ImageJ (National Institute of Health, SUA).

S-a procesat forma farmaceutică multiparticulată de tip capsulă gelatinoasă dură conținând pelete, cu o doză de 100 mg substanță activă pe unitate dozată.

# RO 129522 B1

## Revendicări

1. Derivați de N-(4-hidroxi-4-metil-3-feniltiazolidin-2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidă cu formula generală:



**caracterizați prin aceea că R este halogen.**

2. Derivați de N-(4-hidroxi-4-metil-3-feniltiazolidin-2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidă, conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că** sunt selectați dintre:

- N-(3-(4-clorofeniltiazolidin)-4-hidroxi-4-metil-2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidă

și

- N-(3-(4-bromofeniltiazolidin)-4-hidroxi-4-metil-2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidă.

3. Procedeu de obținere a unui derivat de N-(4-hidroxi-4-metil-3-feniltiazolidin-2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidă, cu formula generală I, definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** va cuprinde etapele de: dizolvare a N-4-halofenil-N'-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-tioureei, în care halo înseamnă clor sau brom, în acetonă anhidră; adăugare a piridinei proaspăt distilate; adăugare în picătură, la temperatura camerei, a bromoacetonei preparată *ex tempore*, prin reacția acetonei cu brom, la temperatura camerei; agitare timp de 1 h; distilare solvent la presiune scăzută; spălare a rezidului cu apă; uscare și purificare prin recristalizare din acetat de etil.

4. Preparat farmaceutic ce conține un derivat N-(4-hidroxi-4-metil-3-feniltiazolidin-2-iliden)-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamidă, cu formula generală I, definit în revendicarea 1, împreună cu excipienți acceptabili farmaceutic, pentru utilizare în tratamentul anticanceros.



(51) Int.Cl.

**C07D 403/12** (2006.01);

**C07D 417/12** (2006.01);

**A61P 35/00** (2006.01)

