

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035565**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.07.08

(21) Номер заявки
201790249

(22) Дата подачи заявки
2015.07.30

(51) Int. Cl. **C07C 277/08** (2006.01)
C07C 279/04 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИГУАНИДИНА**(31) **A609/2014**(32) **2014.07.31**(33) **AT**(43) **2017.07.31**(86) **PCT/AT2015/050187**(87) **WO 2016/015081 2016.02.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИЛАЙФ ФАРМА ГМБХ (AT)

(72) Изобретатель:
**Претч Александер, Нагль Михаэль,
Виснер Кристоф, Холлаус Ральф,
Генов Мирослав (AT)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **DAFU WEI ET AL.: "Condensation
between guanidine hydrochloride and diamine/**

multi-amine and its influence on the structures and antibacterial activity of oligoguanidines", E-POLYMERS, no. 072, 26 August 2012 (2012-08-26), pages 1-10, XP002751231, Seite 2, Absatz "Results and Discussion" Zeilen 1-5; Tabelle 1, Eintrag 11 von oben; Tabelle 2, Eintrag 11 von oben; Seite 6, vierter Absatz von oben; figure 1

R. GROSS ET AL.: "Beschleunigung von Substitutionsreaktionen eines Phosphorsäurediesters durch Bis(guanidinium)-Verbindungen", LIEBIGS ANN. CHEM., 1994, pages 49-58, XP002751232, Schema 3, Verbindungen 12 und 13; Seite 54, linke Spalte, Absätze 7 und 8

US-A-2325586

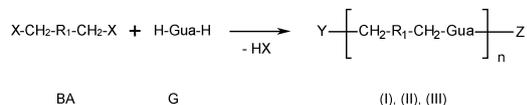
US-A-2882156

U. BATTAGLIA ET AL.: "A short synthesis of triazolopyrimidine antibiotic Essramycin", J. NAT. PROD., vol. 73, 2010, pages 1938-1939, XP002752052, Scheme 2

US-A-3869478

US-A-3901944

(57) Изобретение относится к способу получения продукта поликонденсации гуанидина, аминокгуанидина или диаминогоуанидина G с одним или несколькими бензильными или аллильными производными ВА по следующей схеме реакции:



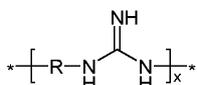
где каждый X независимо друг от друга представляет собой уходящую группу; R₁ независимо представляет собой либо ароматическую кольцевую систему по меньшей мере с одним ароматическим кольцом, которое необязательно содержит один или несколько гетероатомов, выбранных из O, N и S, и которое необязательно замещено одной или двумя винильными группами, с которыми соединены группы -CH₂-X, либо представляет собой этилен; Gua представляет собой гуанидиндиил-, аминокгуанидиндиил- или диаминогоуанидиндиил- радикалы; Y представляет собой H-Gua; Z представляет собой H или Y и Z вместе соединены химической связью с образованием циклической структуры, при этом по меньшей мере одно бензильное или аллильное производное ВА подвергается реакции поликонденсации с избытком гуанидина, аминокгуанидина или диаминогоуанидина G с отщеплением HX. Изобретение также относится к полигуанидиновому олигомеру, полученному указанным способом, его применению в качестве противомикробного средства и к содержащей его фармацевтической композиции для борьбы с бактериальной инфекцией.

B1**035565****035565 B1**

Данное изобретение относится к новому способу получения полигуанидина, к полученному таким образом продукту поликонденсации - полигуанидиновому олигомеру и к его применению в качестве антимикробного или противоионфекционного средства.

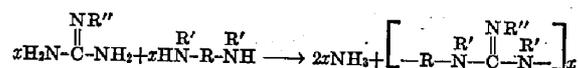
Уровень техники

Полигуанидин с приведенной ниже общей формулой, а также его различные производные известны уже давно:

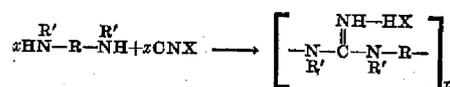


В патентной литературе уже в 1943 году в патенте US 2325586 описаны несколько способов получения различных полигуанидинов поликонденсацией i) гуанидина или его солей, ii) циангалогенидов, iii) дицианамидов, или iv) изоцианидиндигалогенидов с диаминами, или v) двух дициандиамидов друг с другом (при этом получают цианозамещенные полигуанидины), а также описано применение полученных таким образом полигуанидинов в качестве красящих веществ:

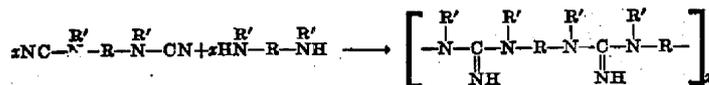
i)



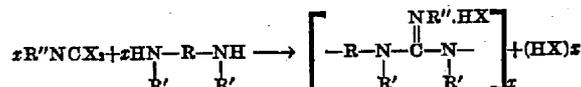
ii)



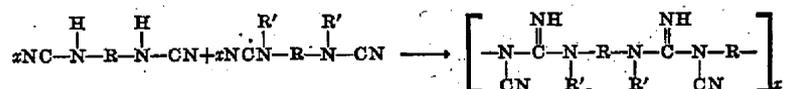
iii)



iv)



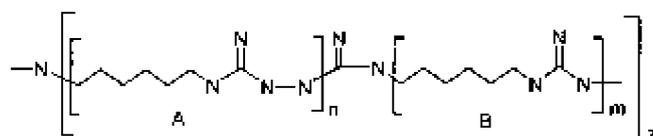
v)



В качестве диаминов в реакциях с i) по iv) уже тогда раскрывались как алкилен- и фенилендиамин, так и оксиалкилен- или простые полиэфирдиамин, которые позднее стали известны также под названием Jeffamine®.

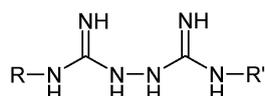
Спустя десятилетия такие полигуанидины также оказались отличными биоцидами. Так, группа Оскара Шмидта в WO 99/54291 A1 раскрывает получение полигексаметиленгуанидинов со свойствами микробиоцидов, в WO 01/8567 6 A1 - полигуанидинов со свойствами биоцидов, которые получают конденсацией гуанидина с полиоксиалкиленами, а в WO 2006/047800 A1 - производных полигуанидина, действующих как биоциды, в частности как фунгициды, которые образуются поликонденсацией гуанидина со смесью из алкилендиамин и оксаликлендиамин и имеют меньшую токсичность, чем полимеры, которые содержат только один из двух видов двухвалентных радикалов R₁.

В WO 02/30877 A1 описаны похожие полигуанидины в качестве дезинфицирующего средства, которые дополнительно содержат группы фенилена в цепи. Русская исследовательская группа (Тец, Тец и Краснов) раскрывают в WO 2011/043690 A1, из которой произведены заявки US 2011/0269936 A1 и EP 2520605 A1, биоциды на основе полигуанидина со следующей формулой, которые получают поликонденсацией гуанидина и гексаметилендиамина в присутствии гидразингидрата:



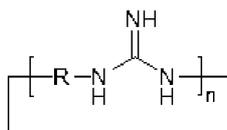
Таким образом, гидразин во время поликонденсации, по меньшей мере формально, замещает аминогруппу либо только одной, либо двумя группами гуанидина, вследствие чего образуются блоксополимеры, в которых блоки поли(гексаметиленгуанидина) чередуются с блоками по-

ли(гексаметиленаминогуанидина), и оба вида блоков соединены друг с другом через димеры гуанидина, как представлено ниже:



Также эти полимеры и их соли присоединения кислоты предположительно должны действовать как биоциды против бактерий, вирусов и грибов. Однако в примерах данных заявок, в которых получены семь различных полимеров, кроме того, что в примере 1 получено "твердое, почти бесцветное, прозрачное вещество", не содержится больше никаких физических данных для полученных продуктов.

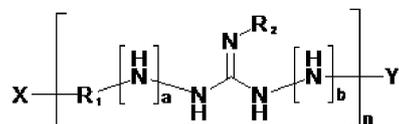
Относительно структур, которые могут образовываться во время поликонденсации гуанидина с диамином, существует несколько статей исследовательской группы технического университета в Граце, например Albert et al., *Biomacromolecules*, 4(6), 1811-1817 (2003) и Feiertag et al., *Macromol. Rap. Comm.* 24(9), 567-570 (2003). Дополнительно к различным возможностям окончаний линейных полимерных цепей одним из исходных мономеров, обычно также образуются в заметном количестве, которое зависит, среди прочего, от длины цепи диамина, являются циклические молекулы со следующей формулой:



Главным недостатком практически всех описанных выше производных полигуанидина является, во-первых, заметная токсичность данных продуктов и, во-вторых, в случае применения высокорекреационноспособных компонентов сравнительно трудоемкий способ их получения, а также применение проблематичных с токсикологической точки зрения компонентов, таких как гидразин, из-за чего упомянутые исследователи начали искать решение.

В ходе исследований авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что продукты поликонденсации amino- и диаминогуанидина с аминами имеют значительно более низкую токсичность, чем поликонденсаты с гуанидином аналогичной структуры из цитированных выше документов WO 2011/043690 A1, US 2011/0269936 A1 и EP 2520605 A1, однако также являются эффективными антимикробными веществами.

Эти результаты раскрываются в находящихся на рассмотрении родственных заявках на патент AT A 53/2013 и PCT/AT2014/050026, в которых заявляются производные полигуанидина со следующей формулой, а также их соли:



где X выбирают из -NH₂, аминогуанидино- и 1,3-диаминогуанидино-групп;

Y выбирают из -H и -R₁-NH₂ или

X и Y вместе представляют собой химическое соединение, с образованием циклической структуры; R₁ выбирают из двухвалентных органических радикалов, содержащих от 2 до 20 атомов углерода, в которых необязательно один или несколько атомов углерода заменены на O или N;

a и b имеют значение 0 или 1, при этом a+b≠2, если не содержится 1,3-диаминогуанидин-элементов;

R₂ выбирают из -H и -NH₂, при этом R₂ представляет собой -NH₂, если a+b=0;

R₂ представляет собой -H или -NH₂, если a+b=1 и R₂ представляет собой -H, если a+b=;

n>2.

В качестве способа получения этих новых поли(ди)аминогуанидинов, по аналогии с известными в уровне техники способами, применяли поликонденсацию диаминов с amino- и/или диаминогуанидином при нагревании.

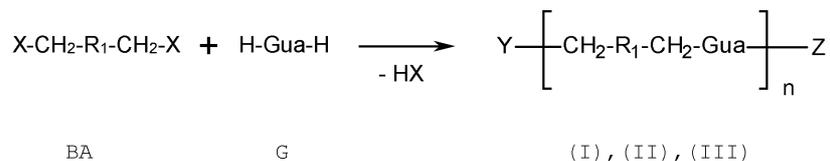
Без привязки к какой-либо теории, авторы настоящего изобретения предполагают, что действие amino- и диаминогуанидино-групп (далее вместе обозначаемых как "аминогуанидины", если из контекста не следует другого) лучше переносится эукариотическими клетками человека, чем действие гуанидино-групп, в частности чем тех полимеров, которые содержат описанные выше димеры гуанидина с гидро-мостиками.

Однако некоторые из этих новых соединений аминогуанидина оказались не полностью удовлетворительными относительно антимикробного действия или токсичности, а также способ получения требует усовершенствования в том отношении, что при применении определенных диаминов требуются очень высокие температуры для полимеризации в расплаве, а также иногда встречаются проблемы с остаточным содержанием мономеров.

Поэтому целью данного изобретения является разработка других производных полигуанидина с улучшенными свойствами, а также предпочтительного способа их получения.

Раскрытие изобретения

Данная цель достигается согласно настоящему изобретению в первом аспекте путем предложения способа получения продукта поликонденсации гуанидина, аминогуанидина или диаминогуанидина G с одним или несколькими бензил- или аллил-производными ВА согласно следующей схеме реакции:



где каждый X независимо представляет собой уходящую группу;

каждый R₁ независимо представляет собой ароматическую кольцевую систему по меньшей мере с одним ароматическим кольцом, которое необязательно содержит один или несколько атомов азота и которое необязательно замещено одной или двумя винильными группами, к которым присоединены группы -CH₂-X, либо представляет собой этилен;

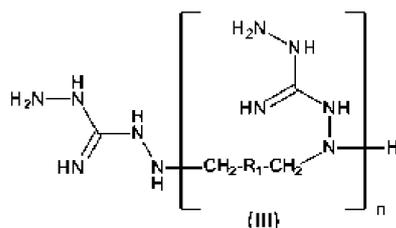
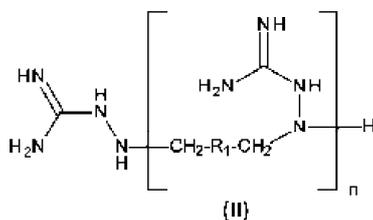
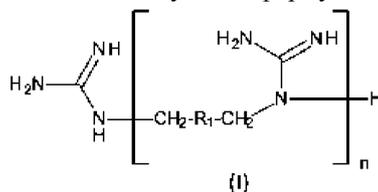
Gua представляет собой гуанидиндиил-, аминогуанидиндиил-или диаминогуанидиндиил-радикалы;

Y представляет собой H-Gua;

Z представляет собой H или

Y и Z вместе соединены химической связью с образованием циклической структуры,

при этом по меньшей мере одно бензил- или аллил-производное ВА подвергается реакции поликонденсации с избытком гуанидина, аминогуанидина или диаминогуанидина G с отщеплением HX для того, чтобы образовался полигуанидин с нижеследующей формулой (I), (II) или (III):



или циклическая структура, полученная посредством замыкания кольца с отщеплением соответствующего гуанидина, или соль полигуанидина.

В данном способе получения происходит поликонденсация в противоположность к уровню техники не с отщеплением аммиака, а с отщеплением уходящей группы X, предпочтительно в виде галогенводорода, например HCl или HBr, или в виде сульфоновой кислоты, например CH₃SO₂OH (MsOH), которые с имеющимися в молекуле amino- или имино-группами образуют соли присоединения кислоты, вследствие чего можно сэкономить на применении уловителя кислоты. Уходящая группа может быть выбрана, например, из хлора, брома, йода, мезилата, трифлата и тозилата.

Это приводит к тому, что нет необходимости проводить поликонденсацию в расплаве, хотя по экономическим причинам согласно данному изобретению полимеризация в расплаве является предпочтительным способом проведения реакции. Поэтому в предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одно бензил- или аллил-производное ВА преобразуется с гуанидином, аминогуанидином или диаминогуанидином G при нагревании реагентов до температуры выше их температуры плавления, при этом реакцию полимеризации предпочтительно проводят в течение по меньшей мере 2 ч, еще предпочтительнее по меньшей мере 3 ч. В частности, реакцию, по аналогии с более ранними способами изобретателей, проводят в две стадии при различных температурах, первой, более низкой, и второй, более вы-

сокой, для того, чтобы достичь по возможности полного преобразования и, таким образом, большей длины цепи при одновременном сниженном содержании остаточных мономеров.

Неожиданно авторы изобретения установили, что при применении бензильных или аллильных структур образуется как в уровне техники смесь продуктов поликонденсации с различными структурами. Конечно, основные продукты не соответствуют известным из более ранних заявок изобретателей структурам только с одним замещенным азотом, а уже однократно замещенный азот, очевидно, реагирует второй раз до образования вышеупомянутых структур с формулами (I)-(III).

Без привязки к какой либо теории, авторы изобретения предполагают, что реакционная способность исходных продуктов, которую следует приписывать мезомерной стабилизации переходного состояния во время нуклеофильного замещения у бензильной или аллильной метиленовой группы, вместе с повышенной реакционной способностью первоначально образующихся, однократно замещенных продуктов присоединения азота ведет к двойному замещению азота, так что можно предположить, что обнаруживаются сходства по меньшей мере у большинства известных бензильных и аллильных структур, т.е. у структур с метиленовыми группами, которые соединены с ароматическим кольцом или с двойными связями, или также с их комбинациями, т.е. в случае циннамильных структур, у которых в отношении бензильного радикала, очевидно, вступает в действие известный принцип винилологии (ср. с приведенным ниже примером 8). Последнее, конечно, применимо также к сопряженным двойным связям в алифатическом радикале, таким как, например, в случае бутадиена вместо этилена. По этой причине также возможные другие заместители у этих ароматических колец и двойных связей не особенно ограничивают, если таким образом не поднимается степень ароматизации соответствующих колец или электронная плотность в ароматическом кольце или у двойной связи не изменяется значительно, особенно в случае таутомерных эффектов, таких как, например, кетоенольный эффект, имин-енамин эффект и т.д.

В указанных структурах с формулами (I)-(III) элементы гуанидина или аминогуанидина через двойные встроенные в цепь атомы азота располагаются снаружи цепи, при этом большинство образованных видов олигомеров в соответствии с спектроскопическим анализом имеют типы структур с формулами (I), (II) или (III).

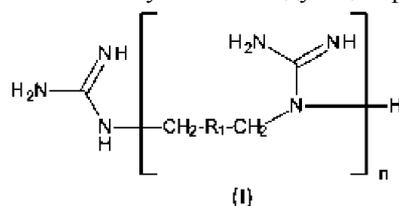
Полученный тип соединения новых полигуанидинов подтверждается с помощью НМВС-NMR: таким образом, например, у полиаминогуанидина из примера 1 обнаруживают соответствующие дальнейшее взаимодействие соединенных через азот бензильных CH_2 -протонов (АВ-система 3,8 и 4,2 ч./млн) через которые в олигомерную цепь встроенные атомы N, а также оба бензильных атома углерода (64 ч./млн). В качестве подтверждения наличия сильно разветвленных побочных компонентов (~15% согласно ^1H -ЯМР) обнаружили другие сигналы, которые коррелируют с бензильным кольцом другого, расположенного с другой стороны от имино-функциональности азота гуанидина (АВ-система 4,3 и 4,5 ч./млн, НМВС-сигналы дальних взаимодействий в области углерода гуанидина при 160 ч./млн). Другие группы NMR-сигналов (^1H -смещение при 8 ч./млн, ^{13}C -смещение при 150 ч./млн) бензильной имино-функциональности коррелируют с подвешенным олигомером окислительного типа по Соммелету, что согласуется с данными масс-спектрологии (двойная линия типа m/z [M-2] для всех олигомеров).

От данных новых типов структур изобретатели ожидают даже еще большей антимикробной активности, чем от их более ранних полиаминогуанидинов, что также можно подтвердить, как, например, подтверждается в нижеследующих примерах вариантов осуществления данного изобретения: биоцидная активность значительно повышена, в то время как токсичность еще немного снижается.

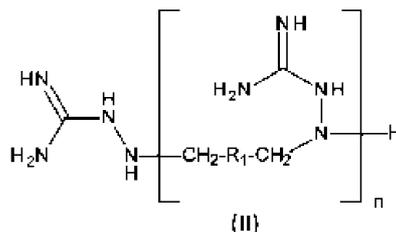
Последнее, как предполагают изобретатели, без привязки к какой-либо теории, следует приписывать, среди прочего, в противоположность более ранним полиаминогуанидинам более высокой средней длине цепи, а также более низкому содержанию остаточных мономеров.

Для оптимизации условий реакции, для того чтобы найти как можно более хороший компромисс между продолжительностью реакции, длиной цепи и содержанием остаточных мономеров, изобретатели провели серию опытов с различным соотношением между бензильными или аллильными производными ВА и гуанидином G, разными температурами, а также с разной продолжительностью реакции и обнаружили, что при соотношении ВА/G немного меньше 2 полученные продукты показывают лучшие биологические результаты, при этом реакционную смесь предпочтительно сначала от 2 до 3 ч нагревают до температуры примерно 150-170°C и затем от 1 до 2 ч до температуры 180-190°C.

Во втором аспекте данного изобретения с помощью данного изобретения предоставляются новые полигуанидиновые полимеры, которые соответствуют нижеследующим формулам (I)-(III), а именно полигуанидиновый олигомер, который соответствует нижеследующей формуле (I)



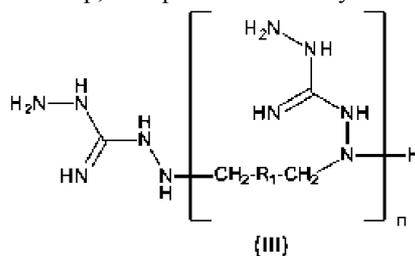
или имеет образующуюся посредством замыкания кольца при отщеплении гуанидина циклическую структуру, или содержит соль указанного полигуанидина;
полигуанидиновый олигомер, который соответствует нижеследующей формуле (II):



или имеет образующуюся посредством замыкания кольца при отщеплении аминоганидина циклическую структуру,

или содержит соль указанного полигуанидина;

а также полигуанидиновый олигомер, который соответствует нижеследующей формуле (III):



или имеет образующуюся посредством замыкания кольца при отщеплении диаминогуанидина циклическую структуру,

или содержит соль указанного полигуанидина;

где R₁ представляет собой ароматическую кольцевую систему по меньшей мере с одним ароматическим кольцом, которое необязательно содержит один или несколько атомов азота в качестве гетероатомов, и которое необязательно замещено одной или двумя винильными группами, к которым присоединены группы -CH₂-X, либо представляет собой этилен, а в предпочтительном варианте осуществления его выбирают из двухвалентных радикалов с необязательным замещением, которые представляют собой бензол, дивинилбензол, фуран, пиррол, тиофен, пиридин, бифенил, флуорен и этилен, еще предпочтительнее выбирают из двухвалентных радикалов, которые представляют собой бензол, дивинилбензол, пиридин, бифенил и этилен, которые уже показали хорошие результаты.

По причине высокого антимикробного действия новых структур данное изобретение в третьем аспекте предоставляет определенный выше полигуанидиновый олигомер для применения в качестве антибиотика и/или противоиного средства, предпочтительно для борьбы с бактериальными, вирусными и грибковыми инфекциями у людей или животных. При этом полигуанидин может служить для местного или системного применения, предпочтительно для применения в форме лекарственных средств или фармацевтических композиций.

Альтернативно к этому новые полигуанидины также можно применять как антимикробные средства *ex vivo* (вне организма), предпочтительно в качестве активной составляющей антимикробных слоев, покрытий, пленок или мембран или т.п.

Таким образом, в четвертом аспекте данное изобретение предоставляет фармацевтическую композицию для борьбы с бактериальными, вирусными и грибковыми инфекциями у людей и животных, которая включает по меньшей мере один новый полигуанидиновый олигомер в качестве противоиного средства и предпочтительно по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель и при необходимости один или несколько адъювантов и/или один или несколько других действующих веществ.

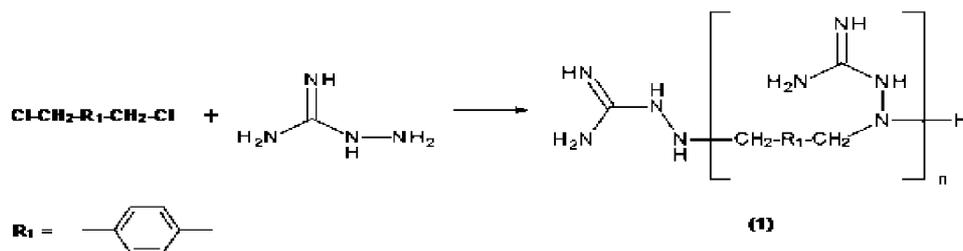
Предпочтительно фармацевтическая композиция включает по меньшей мере одно другое действующее вещество, которое также имеет антимикробное действие для того, чтобы это действие усилить и воспользоваться возможным синергическим эффектом. При этом данное по меньшей мере одно другое действующее вещество может также быть эффективным против других болезней, чем бактериальные инфекции. Только в качестве примера можно упомянуть противодиарейные средства и так называемые желудочные средства.

Далее данное изобретение описано подробнее с помощью неограничивающих примеров.

Примеры

Пример 1.

Получение полиаминогуанидина (1)



α, α' -Дихлор-*p*-ксилол (880 мг, 5,03 ммоль) и 1,95 экв. гидрохлорида амингуанидина (1083 мг, 9,80 ммоль) в открытом реакционном сосуде при перемешивании сначала 3 ч нагревали до 160°C, затем 2 ч до 180°C. После охлаждения реакционной смеси ниже 80°C к продуктам реакции добавляли примерно десятикратное количество воды и после основательного перемешивания с помощью мешалки или ультразвуковой обработки получали прозрачный слегка желтоватый раствор со следами твердых компонентов. Их через 0,2-МКМ-ПФТЕ-мембрану отфильтровывали и затем концентрировали выпариванием для того, чтобы получить полигуанидин (1) в виде желтоватого, аморфного твердого вещества.

Для анализа пробу растворяли в десятикратном количестве D₂O. При получении ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектров для сравнения добавляли DSS (4,4-диметил-4-силапентан-1-сульфоновая кислота) в качестве инертного стандарта:

¹H-ЯМР (D₂O), δ (ч./млн): 3,72-3,91 (ad, CH_{2A}-N(Gua)-CH_{2A}, J_{A,B}=12,4 Гц, CH_{2A} цепь), 3,93-4,05 (as, CH₂-NH-Gua, CH₂ конечный), 4,10-4,23 (ad, CH_{2B}-N(Gua)-CH_{2B}, J_{A,B}=12,4 Гц, CH_{2B} цепь), 4,29-4,39 (m, CH_{2A} α -Gua), 4,45-4,52 (m, CH_{2B} α -Gua), 7,30-7,83 (m, =CH Ar), 8,08 (as, N=CH).

¹³C-NMR (D₂O), δ (ч./млн): 46,25, 46,56, 46,94 (CH₂ α -Gua), 56,90, 56,97, 57,03 (CH₂ конечный), 63,87, 64,02 (CH₂-N(Gua)-CH₂ цепь), 128,93, 129,04, 129,57, 129,63, 129,78, 129,84, 130,20, 130,32, 130,49, 130,66, 132,10, 132,17, 132,30, 132,40, 132,62, 132,67, 132,75, 132,83, 132,92, 133,20 (CH Ar), 135,02, 135,19, 137,54, 137,92, 138,13, 138,50, 139,07, 139,23, 141,31, 142,53 (C_q Ar), 150,21, 151,05, 151,12 (N=CH), 157,60, 159,67, 159,73, 160,85 (C_qGua).

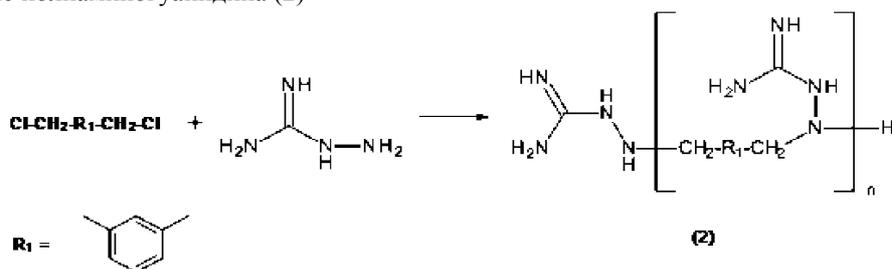
NMR-сигналы в области 3,72-3,91 и 4,10-4,23 ч./млн (¹H-ось) и при 64,02 ч./млн (¹³C-ось) подтверждают наличие дважды замещенного атома азота амингуанидина.

MALDI-MS-MALDI-TOF (в режиме положительных ионов (подавление матрицы выкл.)); Scan 20-3000 m/z (дефлексия выкл.);

Матрица: АСН (α -циано-4-гидроксикоричная кислота); (m/z): 247,3, 249,3, 251,4, 425,3, 427,3, 601,4, 603,4, 777,5, 779,5, 953,7, 955,7, 1129,8, 1131,9, 1306,0, 1308,0, 1482,1, 1484,1, 1658,0, 1660,0, 1834,1, 1836,1, 2010,2, 2012,2, 2186,3, 2188,3, 2362,4.

Пример 2.

Получение полиаминогуанидина (2)



Аналогичным образом, как в примере 1, из α, α' -дихлор-*m*-ксилола и гидрохлорида амингуанидина получали полигуанидин (2) в виде желтоватого, аморфного, полностью растворимого в воде твердого вещества.

¹H-ЯМР (D₂O) δ (ч./млн): 3,73-3,92 (ad, CH_{2A}-N(Gua)-CH_{2A}, J_{A,B}=12,7 Гц, CH_{2A} цепь), 3,94-4,05 (as, CH₂-NH-Gua, CH₂ конечный), 4,10-4,23 (ad, CH_{2B}-N(Gua)-CH_{2B}, J_{A,B}=12,7 Гц, CH_{2B} цепь), 4,29-4,38 (m, CH_{2A} α -Gua), 4,45-4,53 (m, CH_{2B} α -Gua), 7,23-7,85 (m, =CH Ar), 8,10 (as, N=CH).

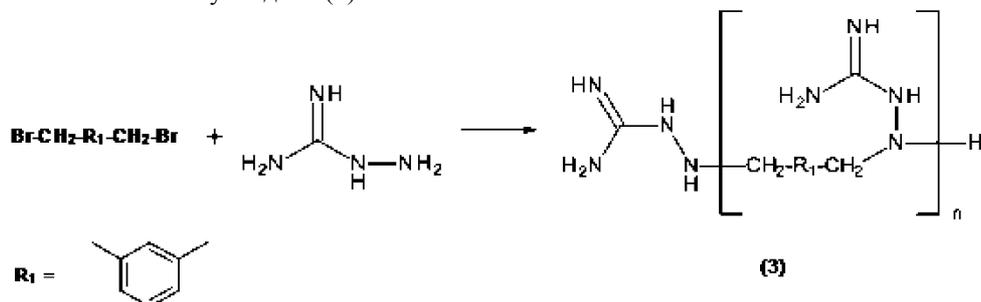
¹³C-ЯМР (D₂O), δ (ч./млн): 46,36, 46,66, 47,01 (CH₂ α -Gua), 57,01, 57,04, 57,12, 57,14 (CH₂ конечный), 63,94 (CH₂-N(Gua)-CH₂ цепь), 129,63, 129,75, 130,09, 130,20, 130,83, 131,38, 131,44, 131,53, 131,57, 131,67, 131,82, 131,89, 132,18, 132,34, 132,73, 133,52, 134,23, 134,52, 135,29 (CH Ar), 135,72, 135,81, 136,12, 138,59, 138,69, 138,73, 139,13, 139,77, 139,90, 140,30 (C_q Ar), 151,24 (N=CH), 157,67, 159,78, 159,81, 160,86 (C_qGua).

NMR-Сигналы в области 3,73-3,92 и 4,10-4,23 ч./млн (¹H-ось) и при 63,94 ч./млн (¹³C-ось) подтверждают наличие дважды замещенного атома азота амингуанидина.

MALDI-MS-MALDI-TOF (m/z): 247,3, 249,3, 251,4, 425,3, 427,3, 601,4, 603,4, 777,5, 779,5, 953,7, 955,7, 1129,8, 1131,9, 1306,0, 1308,0, 1482,1, 1484,1, 1658,0, 1660,0, 1834,1, 1836,1, 2010,2, 2012,2, 2186,3, 2188,3.

Пример 3.

Получение полиаминогуанидина (3)



Аналогичным образом, как в примере 2, из 132 мг (0,5 ммоль) α, α' -дибром-м-ксилола (вместо дихлор-производных), а также 1,75 экв. гидрохлорида амингуанидина (97 мг, 0,88 ммоль) получали полигуанидин (3) в виде коричневого, аморфного, водорастворимого твердого вещества.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O), δ (ч./млн): 3,63-3,95 (m, $\text{CH}_{2\text{A}}\text{-N(Gua)-CH}_{2\text{A}}$, $\text{CH}_{2\text{A}}$ цепь), 3,95-4,08 (as, $\text{CH}_2\text{-NH-Gua}$, CH_2 конечный), 4,13-4,24 (ad, $\text{CH}_{2\text{B}}\text{-N(Gua)-CH}_{2\text{B}}$, $J_{\text{A,B}}=12,5$ Гц, $\text{CH}_{2\text{B}}$ цепь), 4,31-4,40 (m, $\text{CH}_{2\text{A}}$ α -Gua), 4,47-4,55 (m, $\text{CH}_{2\text{B}}$ α -Gua), 7,17-7,86 (m, =CH Ar), 8,12 (as, N=CH).

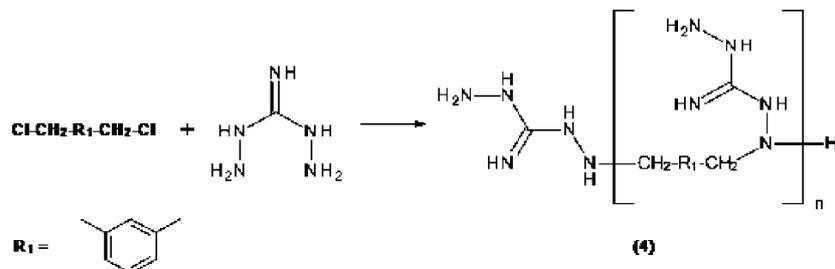
$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O), δ (ч./млн): 46,38, 46,64, 46,99 (CH_2 α -Gua), 56,98, 57,11, 57,48 (CH_2 конечный), 63,90 ($\text{CH}_2\text{-N(Gua)-CH}_2$ цепь), 128,58, 129,08, 129,64, 129,76, 130,05, 130,20, 130,81, 130,98, 131,35, 131,41, 131,51, 131,71, 131,80, 131,87, 132, 16,132,33, 132,69, 133,49, 134,21, 134,51, 135,29 (CH Ar), 135,66, 135,76, 136,06, 138,68, 138,98, 139,07, 139,25, 139,72, 139,85, 140,25 (C_q Ar), 150,46, 151,29 (N=CH), 159,73, 160,84 (C_q Gua).

NMR-сигналы в области 3,63-3,95 и 4,13-4,24 ч./млн (^1H -ось) и при 63,90 ч./млн (^{13}C -ось) подтверждают наличие дважды замещенного атома азота амингуанидина.

MALDI-MS-MALDI-TOF (m/z): 247,3, 249,3, 251,4, 425,3, 427,3, 601,4, 603,4, 777,5, 779,5, 953,7, 955,7, 1129,8, 1131,9, 1306,0, 1308,0, 1482,1, 1484,1, 1658,0, 1660,0, 1834,1, 1836,1, 2010,2, 2012,2, 2186,3, 2188,3.

Пример 4.

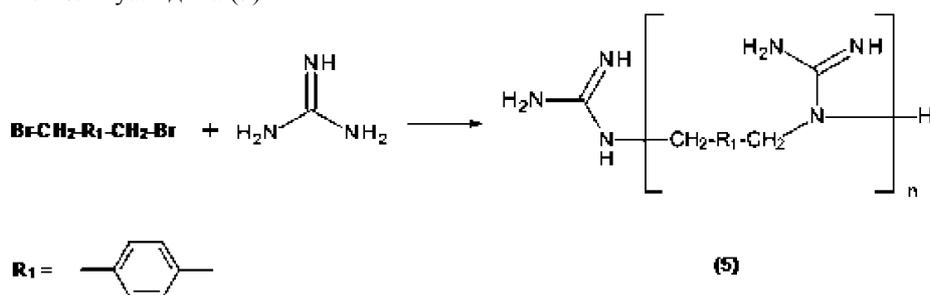
Получение полидиаминогуанидина (4)



По аналогии с примером 2 из 88 мг (0,5 ммоль) α, α' -дихлор-м-ксилола и 1 экв. гидрохлорида диаминогуанидина (68 мг, 0,5 ммоль) получали полигуанидин (4) в виде желтоватого, аморфного, водорастворимого твердого вещества.

Определение структуры с помощью ^1H - и ^{13}C -ЯМР, кроме присутствия обнаруженных в примерах с 1 по 3 типов продуктов, показало также присутствие большого количества сильно разветвленных компонентов, у которых другой азот гуанидина с другой стороны, чем имино-функциональность, является бензилированным.

Пример 5.
Получение полигуанидина (5)

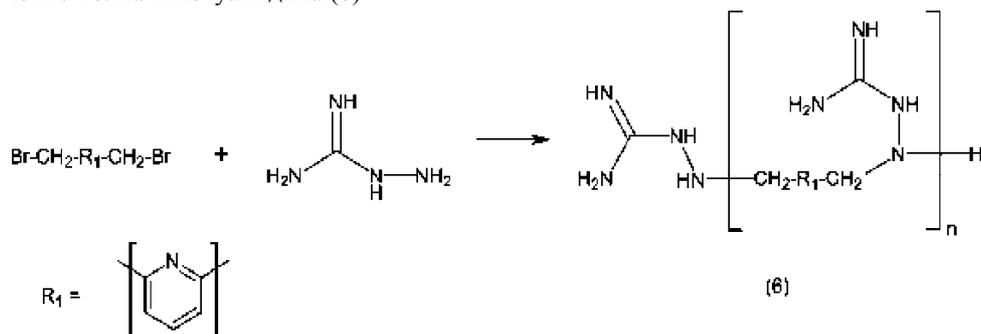


По аналогии с примером 3 из 132 мг (0,5 ммоль) α,α' -дибром-*p*-ксилола и 1,75 экв. гидрохлорида гуанидина (83 мг, 0,88 ммоль) получали полигуанидин (5) в виде водорастворимого, красноватого, аморфного твердого вещества.

Определение структуры с помощью ^1H - и ^{13}C -ЯМР, кроме присутствия обнаруженных в примерах с 1 по 3 типов продуктов, показало также присутствие большого количества сильно разветвленных компонентов, у которых другой азот гуанидина с другой стороны, чем имино-функциональность, является бензилированным.

MALDI-MS-MALDI-TOF (m/z): 355,3, 382,3, 516,4, 543,4, 677,3, 704,5, 838,5, 865,5, 999,6, 1026,6, 1160,7, 1187,7, 1321,8, 1348,8, 1483,9, 1510,9, 1672,0, 1833,1, 1995,2.

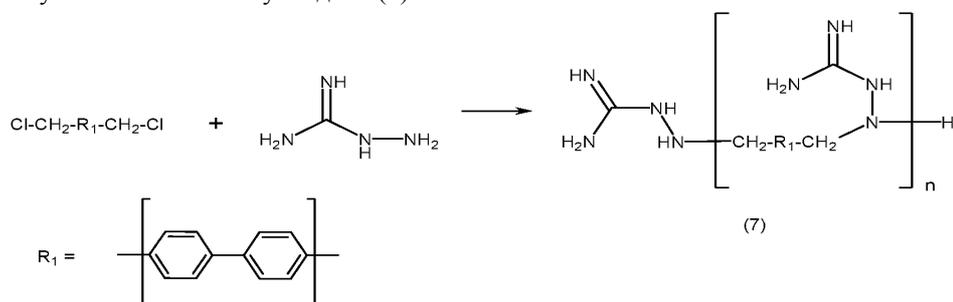
Пример 6.
Получение полиаминогуанидина (6)



2,6-бис-(Бромметил)пиридин (265 мг, 1 ммоль) и 1,95 экв. гидрохлорида амингуанидина (216 мг, 1,95 ммоль) в открытом реакционном сосуде при перемешивании сначала 1,5 ч нагревали до 160°C, затем 1,5 ч до 180°C. После охлаждения реакционной смеси до 80°C к продуктам реакции добавляли воду (4,81 мл) и после основательного перемешивания с помощью мешалки или ультразвуковой обработки, а также фильтрации через 0,2-мкм-ПФТЕ-мембрану получали прозрачный темно-коричневый раствор.

MALDI-MS-MALDI-TOF (m/z): 248,4, 250,4, 252,4, 421,4, 423,4, 425,4, 427,4, 429,4, 598,4, 600,4, 602,4, 604,4.

Пример 7.
Получение полиаминогуанидина (7)



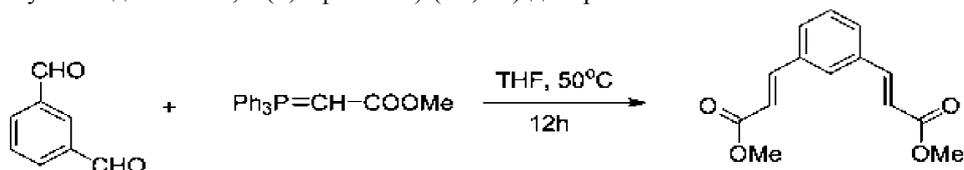
По аналогии с примером 2 из 4,4'-бис-(хлорметил)бифенила (251 мг, 1 ммоль), а также 1,95 экв. гидрохлорида амингуанидина (216 мг, 1,95 ммоль) получали полигуанидин (7) в виде желтоватого, аморфного твердого вещества, которое, за исключением небольшого количества твердого осадка, легко растворимого в воде.

MALDI-MS-MALDI-TOF (m/z): 323,4, 325,4, 327,4, 575,4, 577,4, 579,4, 827,6, 829,6, 831,6.

Пример 8.

Получение полиаминогуанидина (8).

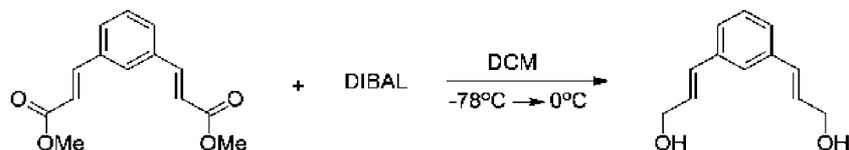
8.1. Получение диметил-3,3'-(1,3-фенилен)-(2E,2'E)-диакрилата



К раствору 0,75 ммоль изофталевого альдегида в 10 мл THF при удалении воздуха добавляли раствор 2,05 экв. (метоксикарбонилметил)трифенилфосфорана (1,54 ммоль) в 15 мл THF. Реакционную смесь 12 ч перемешивали при 50°C и уплотняли. После хроматографической очистки (силикагель, дихлорметан) получили 0,62 ммоль (83% от теоретического) белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ (ч./млн): 3,82 (s, 6H), 6,47 (d, J=16 Гц, 2H), 7,42 (dd, J=7,7+7,7 Гц, 1H), 7,54 (dd, J=7,7+1,7 Гц, 2H), 7,64 (t, J=1,7 Гц, 1H), 7,69 (d, J=16 Гц, 2H).

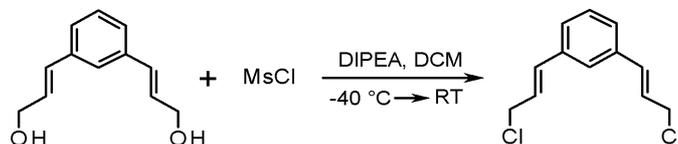
8.2. Получение (2E'E)-3,3'-(1,3-фенилен)-бис-(проп-2-ен-1-ол)



В сосуде Шленка 1,50 ммоль диметил-3,3'-(1,3-фенилен)-(2E,2'E)-диакрилата растворяли в 30 мл не содержащего соды дихлорметана. При -78°C 4,5 экв. диизобутилалюминийгидрида в виде 1 М раствора в толуоле (6,75 мл) медленно добавляли по каплям. Реакционную смесь 2 ч при -78°C перемешивали и затем при 0°C гидролизовали с метанолом. Образующийся осадок отфильтровывали, фильтрат уплотняли и хроматографически очищали (силикагель, DCM:EE 1:1), при этом выделяли 1,05 ммоль (70% от теоретического) белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ (ч./млн): 4,26 (m, 4H), 6,33 (dm, J=16 Гц, 2H), 6,56 (br,d, J=16 Гц, 2H), 7,22 (m, 3H), 7,34 (br s, 1H).

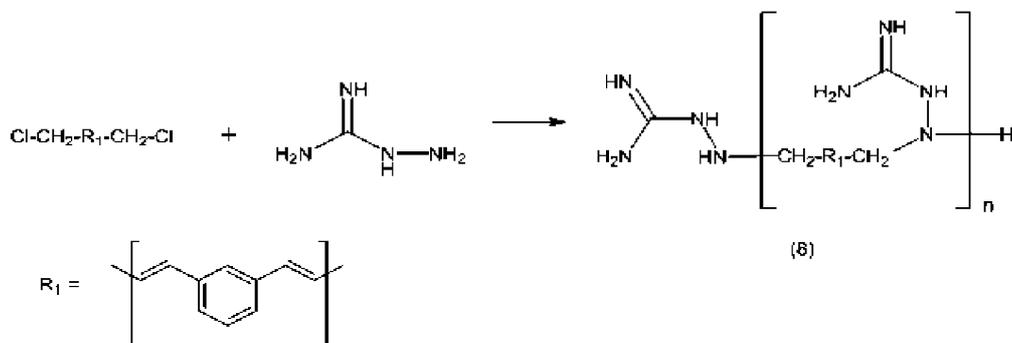
8.3. Получение 1,3-бис-((E)-3-хлорпроп-1-ен-1-ил)бензола



В сосуд Шленка помещали 0,95 ммоль диметил-3,3'-(1,3-фенилен)-(2E,2'E)-диакрилата и 3 экв. диизопропилэтиламина (DIPEA, 2,85 ммоль) в 20 мл дихлорметана и охлаждали до -40°C, после чего добавляли 2,38 ммоль метансульфонилхлорида и реакционную смесь при комнатной температуре 12 ч перемешивали. После сливания растворителя неочищенный продукт очищали хроматографически (силикагель, DCM), при этом выделяли 0,57 ммоль (60% от теоретического) белого кристаллического твердого вещества.

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ (ч./млн): 4,25 (dd, J=7,1+1,2 Гц, 4H), 6,34 (dt, J=15,7+7,1 Гц, 2H), 6,65 (dt, J=15,7+1,2 Гц, 2H), 7,30 (m, 3H), 7,40 (m, 1H).

8.4. Получение полиаминогуанидина (8)



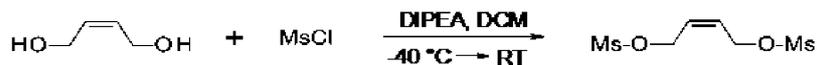
Таким же образом, как в примере 2, из 1,3-бис-((E)-2-хлорвинил)бензола (200 мг, 1 ммоль) и 1,95 экв. гидрохлорида аминогуанидина (216 мг, 1,95 ммоль) получали полигуанидин (8) в виде желтоватого, полупрозрачного водорастворимого геля.

MALDI-MS-MALDI-TOF (m/z): 303,3, 531,4, 759,6, 833,7, 987,8, 1061,9, 1216,0.

Пример 9.

Получение полиаминогуанидина (9).

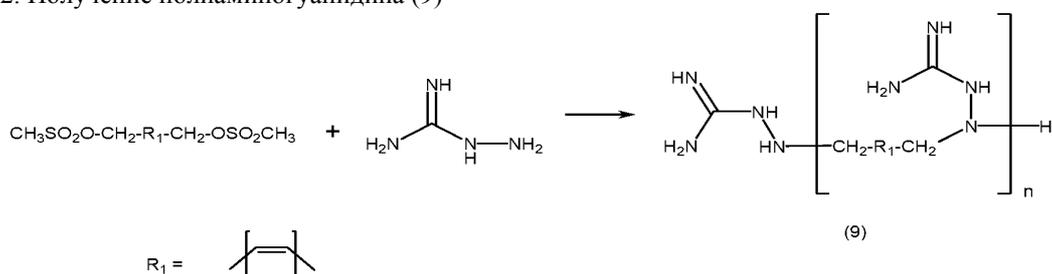
9.1. Получение цис-1,4-бис-(метилсульфонилокси)бут-2-ена



10 г цис-бут-2-ен-1,4-диол (113 ммоль) и 3,0 эквивалент диизопропилэтиламина (44 г, 340 ммоль, 60 мл) растворяли в 250 мл дихлорметана и в атмосфере аргона охлаждали до -40°C , после чего порциями добавляли 2,4 экв. метансульфонилхлорида (30,9 г, 270 ммоль, 20,9 мл) и реакционную смесь в течение 1 ч нагревали до 10°C . Прозрачный, желтый раствор выливали в 500 мл ледяной воды и органическую фазу промывали еще 500 мл холодной воды, затем 200 мл 2н. HCl, затем дважды в 200 мл насыщенного раствора NaHCO_3 и, наконец, еще дважды в 200 мл воды. Раствор продукта в дихлорметане сушили с помощью Na_2SO_4 и растворитель декантировали в вакууме до получения белого преципитата, после чего добавляли минимальное количество дихлорметана для того, чтобы снова получить прозрачный раствор. После добавления 25 мл диэтилового простого эфира продукт при -20°C выкристаллизовывали из раствора, после чего выделяли 10 г цис-1,4-бис-(метилсульфонилокси)-бут-2-ена в виде кристаллического белого твердого вещества.

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ (ч./млн): 3,04 (s, 3H), 4,84 (m, 2H), 5,95 (m, 1H).

9.2. Получение полиаминогуанидина (9)

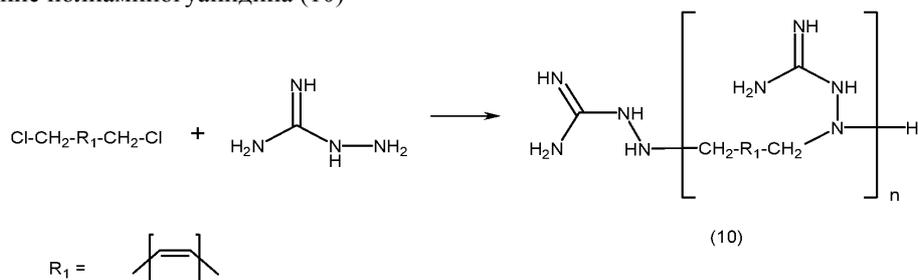


цис-1,4-бис-(Метилсульфонилокси)бут-2-ен (246 мг, 1 ммоль) и 1,95 экв. гидрохлорида аминогуанидина (216 мг, 1,95 ммоль) в закрытом реакционном сосуде в атмосфере аргона при перемешивании сначала 3 ч нагревали до 160°C , затем 2 ч до 180°C . После охлаждения реакционной смеси ниже 80°C к продуктам реакции добавляли воду (4,67 мл) и, таким образом, получали прозрачный красно-желтый раствор.

MALDI-MS-MALDI-TOF (m/z): 201,3, 251,3, 253,3, 297,2, 325,3, 327,3, 349,2, 377,3, 423,3, 451,3, 453,3, 519,3.

Пример 10.

Получение полиаминогуанидина (10)

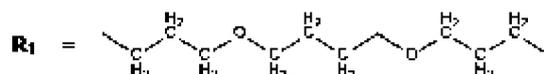
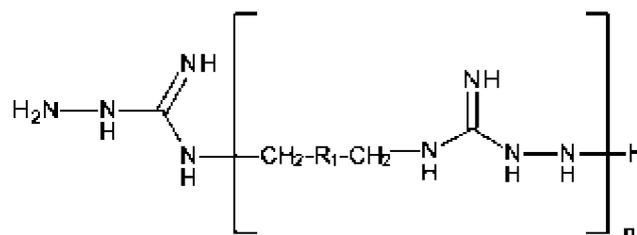


1,4-Дихлор-2-бутен (262 мг, 1,3 ммоль) и 1,95 экв. гидрохлорида аминогуанидина (216 мг, 1,95 ммоль) в закрытом реакционном сосуде в атмосфере аргона при перемешивании и при повторной смене атмосферы (трижды в час) на свежий аргон сначала 2 ч нагревали до 150°C , затем 1 ч до 170°C . После охлаждения реакционной смеси ниже 80°C к продуктам реакции добавляли воду (4,67 мл) и, таким образом, получали прозрачный желто-красный раствор.

MALDI-MS-MALDI-TOF (m/z): 201,3, 251,3, 253,3, 297,2, 325,3, 327,3, 377,3, 423,3, 451,3, 453,3.

Сравнительный пример 1.

Получение полиаминогуанидина из диамина и аминогуанидина



23 ммоль гидрохлорида 1, 3-диаминогуанидина и 24 ммоль 4,9-диоксадодекан-1,12-диамина в закрытом трубной-сушилкой реакционном сосуде 90 мин при перемешивании нагревали до 120°C, затем температуру за 100 мин повышали до 180°C, из этих 100 мин последние 45 мин проходили при пониженном давлении (50 мбар). После охлаждения реакционной смеси ниже 80°C к гелеобразному продукту реакции добавляли 25 мл воды. Через несколько часов получали прозрачный раствор.

Из образца, полученного в растворе, выпаривали воду и полученный остаток сушили в вакууме, при этом получали красноватую вязкую жидкость. Эту жидкость растворяли в 2 мл D₂O (со степенью дейтеризации >99,5%) и получали ¹H-ядерно-резонансные спектры (¹H-ЯМР). Положение таким образом различных групп протонов метилена в радикале R₁ в продукте является следующим:

¹H-ЯМР (D₂O) δ (ч./млн): 1,54-1,67 (m, OCH₂CH₂CH₂CH₂O), 1,80-1,95 (m, NCH₂CH₂), 3,23-3,38 (m, NCH₂), 3,42-3,65 (m, CH₂CH₂OCH₂CH₂).

Это подтверждает структуру применяемых компонентов диаминов, 4,9-диоксадодекан-1,12-диамина.

Пример 11.

Определение активности: антимикробное/противогрибковое/противовирусное действие.

Активность новых соединений проверяли в многократно проведенных системах скрининга. Антибактериальную и противогрибковую активность изучали с помощью МНК-теста. МНК представляет собой "минимальную концентрацию ингибитора" (англ.: MIC-"minimal inhibitory concentration") и обозначает наименьшую концентрацию вещества, при которой невооруженным глазом не различается никакого размножения микроорганизмов. Определение МНК происходит так называемым способом титрования, при котором вещество разбавляют и затем добавляют возбудитель.

Как правило, таким образом определяют концентрацию антибиотика, которая еще сдерживает рост штаммов бактерий. МНК указывают в микрограммах на миллиметр (мкг/мл) или в об.%, а разбавление происходит с шагом log₂. В данном случае исходную концентрацию 1% каждый раз разбавляли в два раза, вследствие чего получались испытательные концентрации 0,5, 0,25, 0,125% и т.д. Следовательно, более низкое значение отражает лучшую активность в качестве противоинфекционного средства.

Испытания проводились в соответствии с требуемыми стандартами EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) и согласно предписаниям AFST ("Antifungal Susceptibility Testing") European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID).

Система скрининга для вирусов представляла собой инфекционную систему, у которой клетки хозяина инфицировали *in vitro* и испытуемое вещество добавляли перед или после инфицирования и определяли их активность. Все эти испытания проводили согласно внутренним стандартным инструкциям фирмы SeaLife Pharma для лекарственных средств, при этом применяли аналогичный ряд разбавлений, как в антибактериальных/противогрибковых испытаниях.

В приведенных далее табл. 1-3 даны результаты испытаний относительно противоинфекционного действия новых соединений по изобретению из примеров 1, 3-5 и сравнительного примера 1 против нескольких мультирезистентных бактерий и грибов, а также вирусов. Данные являются средними значениями многократных измерений.

Очевидно, что новые соединения по изобретению показали отличную активность как против грамположительных, так и против грамотрицательных возбудителей.

Пример 12.

Испытания на токсичность приведены далее на фиг. 1 и показывают, что новые полигуанидины по изобретению в тех концентрациях, при которых они обладают отличной антимикробной активностью, одновременно имеют крайне низкую токсичность, что следует из содержания выживших клеток в подвергнутой испытанию клеточной линии HaCaT в качестве модели клеток на оси Y.

Таблица 1

Действие против грамположительных и грамотрицательных возбудителей

| MIC[%] | MRSA | Enterococcus | Streptococcus pneumoniae | Staphylococcus epidermis | E. coli | Klebsiella pneumoniae | Enterobacter | Pseudomonas aeruginosa | Clostridium def. | Salmonella |
|------------------------|---------|--------------|--------------------------|--------------------------|---------|-----------------------|--------------|------------------------|------------------|------------|
| Пример 1 | >0,0016 | >0,0002 | >0,0016 | >0,0008 | >0,0016 | >0,025 | >0,003 | >0,003 | >0,0008 | >0,003 |
| Пример 2 | >0,0008 | >0,0008 | >0,0008 | >0,0002 | >0,0025 | >0,025 | >0,0008 | >0,0016 | >0,0004 | >0,0008 |
| Пример 3 | >0,0004 | >0,0008 | >0,0008 | >0,0004 | >0,0008 | н.о | >0,0016 | >0,003 | >0,0004 | >0,0008 |
| Пример 4 | >0,003 | >0,003 | >0,003 | >0,0016 | >0,0063 | н.о | >0,0125 | >0,0125 | >0,003 | >0,0125 |
| Пример 5 | >0,0008 | >0,0002 | >0,0004 | >0,0004 | >0,0016 | >0,0125 | >0,0016 | >0,003 | >0,0004 | >0,0016 |
| Пример 6 | >0,025 | >0,0125 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,05 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,05 |
| Пример 7 | >0,0002 | >0,0002 | >0,0002 | >0,0002 | >0,0008 | >0,0004 | >0,0008 | >0,0008 | >0,0008 | >0,0008 |
| Пример 8 | >0,0004 | >0,0004 | >0,0004 | >0,0004 | >0,0008 | >0,0008 | >0,0008 | >0,0008 | >0,0008 | >0,0008 |
| Пример 9 | >0,0125 | >0,003 | >0,0125 | >0,0125 | >0,0008 | >0,0008 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,025 |
| Пример 10 | >0,0125 | >0,0125 | >0,0125 | >0,0125 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,025 |
| Сравнительный пример 1 | >0,001 | >0,008 | >0,004 | >0,001 | >0,016 | >0,02 | >0,008 | >0,02 | н.о | >0,03 |

Таблица 2

Действие против грибов и дрожжей

| MIC[%] | Candida albicans | Candida papillosis | Candida glabrata | Candida krusei | Aspergillus terreus | Aspergillus fumigates | Fusarium rosei | Trichophyton sp. | Alternaria sp. | Microsporum canis | Dematiacea sp. |
|------------------------|------------------|--------------------|------------------|----------------|---------------------|-----------------------|----------------|------------------|----------------|-------------------|----------------|
| Пример 1 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,025 |
| Пример 2 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,05 | >0,05 | >0,025 | >0,025 | >0,05 | >0,025 | >0,05 |
| Пример 3 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,05 | >0,05 | >0,025 | >0,025 | >0,05 | >0,025 | >0,05 |
| Пример 4 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,1 | >0,1 | >0,1 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,1 |
| Пример 5 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,05 | >0,05 | >0,025 | >0,025 | >0,05 | >0,025 | >0,05 |
| Пример 6 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | | | | |
| Пример 7 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,05 | >0,05 | >0,025 | | | | |
| Пример 8 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,025 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | | | | |
| Пример 9 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | | | | |
| Пример 10 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | | | | |
| Сравнительный пример 1 | >0,008 | >0,03 | >0,02 | >0,02 | >0,02 | >0,03 | >0,03 | >0,02 | >0,02 | >0,03 | >0,02 |

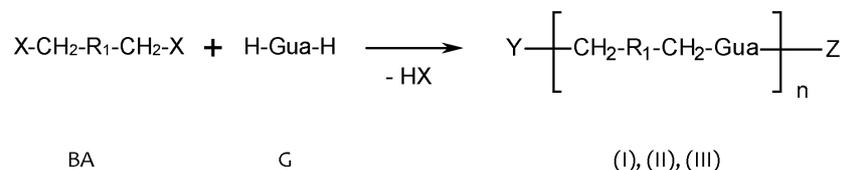
Таблица 3

Действие против вирусов

| MIC [%] | Influenza A | Influenza B | Humanes Rhinovirus |
|------------------------|-------------|-------------|--------------------|
| Пример 1 | >0,0016 | >0,0016 | >0,0016 |
| Пример 2 | >0,0016 | >0,0016 | >0,0016 |
| Пример 3 | >0,0016 | >0,0016 | >0,0016 |
| Пример 4 | >0,003 | >0,003 | >0,003 |
| Пример 5 | >0,0016 | >0,0016 | >0,0016 |
| Пример 6 | >0,025 | >0,05 | >0,025 |
| Пример 7 | >0,0016 | >0,0016 | >0,0016 |
| Пример 8 | >0,0032 | >0,0016 | >0,0032 |
| Пример 9 | >0,0125 | >0,0125 | >0,0125 |
| Пример 10 | >0,0125 | >0,0125 | >0,0125 |
| Сравнительный пример 1 | >0,035 | >0,008 | >0,008 |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения продукта поликонденсации гуанидина, амингуанидина или диаминогуанидина G с одним или несколькими бензильными или аллильными производными ВА по следующей схеме реакции:



где каждый X независимо представляет собой уходящую группу;

каждый R₁ независимо представляет собой ароматическую кольцевую систему с одним или двумя ароматическим(и) кольцом(ами), которое необязательно содержит один или несколько атомов азота и которое необязательно замещено одной или двумя винильными группами, к которым присоединены группы -CH₂-X, либо представляет собой этилен;

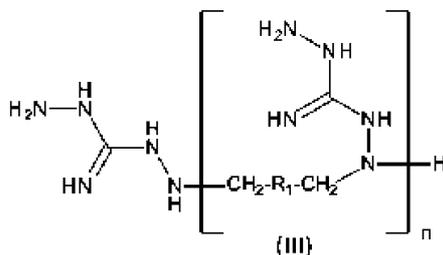
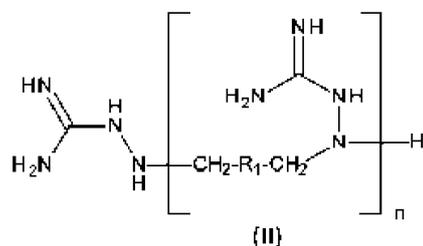
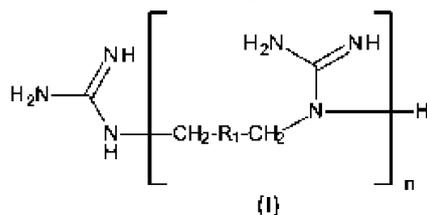
Gua представляет собой радикалы гуанидиндиил-, амингуанидиндиил- или диаминогуанидиндиил-;

Y представляет собой H-Gua;

Z представляет собой H или

Y и Z вместе соединены химической связью с образованием циклической структуры,

при этом по меньшей мере одно бензильное или аллильное производное ВА подвергается реакции поликонденсации с избытком гуанидина, амингуанидина или диаминогуанидина G с отщеплением HX для того, чтобы образовался полигуанидиновый олигомер с нижеследующей формулой (I), (II) или (III):



или циклическая структура, образующаяся посредством замыкания кольца с отщеплением соответствующего гуанидина, или соль полигуанидина.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что R₁ выбирают из двухвалентных радикалов бензола, дивинилбензола, пиридина, бифенила и этилена.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что уходящую группу выбирают из хлора, брома, йода, мезилата, трифлата и тозилата.

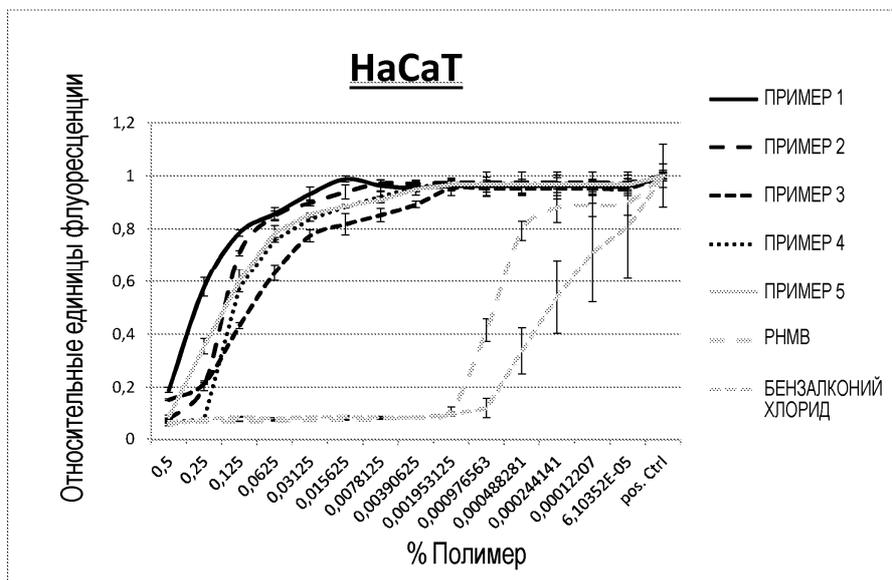
4. Способ по одному из пп.1-3, отличающийся тем, что по меньшей мере одно бензильное или аллильное производное ВА взаимодействует с гуанидином, амингуанидином или диаминогуанидином G посредством нагревания реагентов до температуры выше их температуры плавления.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что реакцию проводят в течение по меньшей мере 2 ч.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что реакцию проводят в течение по меньшей мере 3 ч.

которая содержит полигуанидиновый олигомер по любому из пп.7-10 в качестве противоионного средства.

Испытания на токсичность клеточной линии HaCaT



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2