

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 717

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A01N 33/12 (2006.01)
A61K 31/01 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A01N 65/00 (2009.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

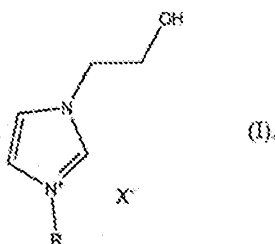
(21) Číslo přihlášky: **2018-386**
(22) Přihlášeno: **01.08.2018**
(40) Zveřejněno: **13.03.2019**
(Věstník č. 11/2019)
(47) Uděleno: **30.01.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **13.03.2019**
(Věstník č. 11/2019)

(56) Relevantní dokumenty:
Kleyi Phumelele E. a kol., : "Preparation and evaluation of quaternary imidazolium-modified for disinfection", Applied Clay Science, vol.95-104, page 127-128, 2016; Norbert Kreuzinger a kol.,: "Methodological approach towards ..substances-quaternary ammonium compounds.", Desanilation, vol.2015, 209-222, 2007.
CZ 295869 B6.

(73) Majitel patentu:
Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec
Králové, Nový Hradec Králové, CZ
(72) Původce:
PharmDr. Ondřej Soukup, Ph.D., Březno, CZ
doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D., Hradec Králové,
Nový Hradec Králové, CZ
PharmDr. Jan Marek, Ph.D., Hradec Králové, Nový
Hradec Králové, CZ
RNDr. Dávid Maliňák, Ph.D., Gíraltovce, SK
(74) Zástupce:
Kania, Sedlák, Smola patentová a známková
kancelář, Mgr. Martina Dvořáková, Mendlovo
náměstí 907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

(54) Název vynálezu:
**1-Alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-
halogenid jako dezinfekční činidlo a
dezinfekční kompozice, která jej obsahuje**

(57) Anotace:
1-Alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid
obecného vzorce I, kde R je C₁₂ - C₁₆ alkyl, X⁻ je anion
vybraný ze skupiny obsahující Cl⁻, Br⁻ nebo I⁻.



CZ 307717 B6

1-Alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid jako dezinfekční činidlo a dezinfekční kompozice, která jej obsahuje

5 Oblast techniky

Vynález se týká látky typu amoniové soli 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium- halogenidu jako dezinfekčního činidla, dezinfekční kompozice, která tuto sůl obsahuje a jejich použití.

10

Dosavadní stav techniky

Odolnost vůči bakteriálním kmenům představuje v současné době jeden z největších problémů v oblasti dezinfekčních přípravků. Netýká se to jen odolnosti vůči antibiotikům, ale také obecně i odolnosti vůči běžně používaným dezinfekčním přípravkům. Mluví se o tzv. multi-rezistentních kmenech, které jsou odolné vůči oběma skupinám antimikrobiálních činidel. Tento trend je výsledkem dlouhodobého používání antibiotik a dezinfekčních přípravků, zvláště v nemocnicích, ve kterých jsou bakterie neustále vystaveny selekčnímu tlaku antibiotik a jsou schopné se stát vůči běžným dezinfekčním přípravkům rezistentními.

20

Odolnost vůči antimikrobiálním sloučeninám je buď primární, vyjádřená absencí (nebo nedostupností) cílové struktury pro dezinfekční přípravek, nebo sekundární, která se postupně vytvoří v původně citlivém kmeni. Příčinou nemocničních infekcí je celá řada bakterií a hub, přítomných v nemocničním prostředí. Pravděpodobnost jejich propuknutí se zvyšuje zvláště u pacientů s oslabeným imunitním systémem. Minimalizace rizika infekce může být dosaženo uplatňováním racionální metodiky pro podávání antibiotik a v případě dezinfekčních přípravků přísným dodržováním kompletních dezinfekčních programů. Klíčovým aspektem je pravidelné obměňování antibiotik a dezinfekčních přípravků, aby se zamezilo vystavování kmenů bakterií a hub jednomu produktu déle, než je kritická doba, po níž se riziko vzniku odolnosti zvyšuje.

30

Kvartérní amoniové sloučeniny mají široké použití. Používají se jako dezinfekční látky, tenzidy, změkčovače textilu nebo antistatická činidla. Benzalkoniové soli (*N*-alkyl, *N*-benzyl, *N,N*-dimethylamin, BAC) s délkou alkylového řetězce C10-C18 se mj. běžně používají v potravinářském průmyslu, protože chrání před kontaminací potravin, léků a jiných produktů různými mikroorganismy, včetně plísní. Prodlužují dobu trvanlivosti a zvyšují bezpečnost (Grillitsch, Gans a kol., 2006). Benzalkoniové soli s C12 řetězcem jsou obvykle velmi účinné proti plísním, s C14 řetězcem zase vůči Gram pozitivním bakteriím a s C16 řetězcem vůči Gram negativním bakteriím (Daoud, Dickinson a kol., 1983). V ČR je běžně používaný přípravek benzalkonium bromid (resp. směs benzalkoniových solí s různou délkou řetězce, Ajatin) pro dezinfekci kůže.

40

Další skupinou sloučenin, která je benzalkoniovým solím strukturně podobná, jsou sloučeniny obsahující heterocyklický kruh mající jako heteroatom dusík či více dusíků. V porovnání s benzalkoniovými solemi, nejsou tyto látky tak široce používány. Nicméně například cetylpyridinium je znám jako účinný dezinfekční a ochranný přípravek, a proto je součástí celé řady léčivých přípravků. Může vytvářet micely a má použití v celé řadě jiných odvětví, například se používá k odstraňování nečistot, v kombinaci s barvivem se používá k barvení textilií atd.

45

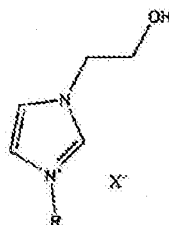
Syntéza či biologická účinnost sloučenin obsahující jiné heterocykly (např. chinolin, nebo isochinolin), jsou v literatuře také popsány. V literatuře byly popsány také substituované *N,N*-alkyl deriváty imidazolu (Kleyi PE a kol 2016).

50

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je nová kvartérní amoniová sůl, vyvinutá jako dezinfekční činidlo aplikovatelné vůči široké škále původců nemocničních bakteriálních a plísňových infekcí a zároveň omezující vznik rezistence vůči dezinfekčním přípravkům.

K tomuto účelu byla proto vyvinuta nová sloučenina typu kvartérní amoniové sole, jmenovitě 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid podle obecného vzorce I



(I),

kde R je C₁₂-C₁₆ alkyl, X⁻ je anion vybraný ze skupiny obsahující Cl⁻, Br⁻ nebo I⁻, případně jiný vhodný anion, zajišťující dostatečnou rozpustnost pro potřeby aplikace. Kvartérní amoniové soli obecného vzorce I podle vynálezu jsou účinnými dezinfekčními činidly proti celé řadě mikroorganismů a virů, tedy Gram-negativním, Gram-pozitivním bakteriím obaleným virům nebo patogenním houbám, vybraným ze skupiny zahrnující *Clostridium difficile*, *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aureobasidium melanogenum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, s výhodou *Staphylococcus aureus* Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, s výhodou Vankomycin rezistentní *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* s výhodou *Klebsiella Ext. Spectrum B-lactamase negativní*, *Klebsiella Ext. Spectrum B-lactamase pozitivní*, *Pseudomonas aeruginosa*, s výhodou *Pseudomonas aeruginosa*, multirezistentní *Yersinia bercovieri*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* nebo obalené viry, s výhodou varicella-zoster vir.

Kvartérní amoniové soli obecného vzorce I podle vynálezu mají výraznou virucidní aktivitu proti obaleným virům, s výhodou varicella-zoster viru.

Termín „obalený vir“ znamená označení viru, který kromě kapsidy má ještě další, lipoproteinový obal, odvozený od membrány hostitelské buňky, v níž se virus replikoval. Může jít o membránu jádra, organely nebo membránu cytoplasmatickou. Obalené viry jsou citlivé na ether a obecně jsou méně odolné k zevnímu prostředí. Obalený vir je vybrán ze skupiny obsahující herpesviry, ortomyxoviry, paramyxoviry, koronaviry.

Kvartérní amoniová sůl podle vynálezu, kde R je s výhodou C₁₄ alkyl, s výhodou 1-(2-hydroxyethyl)-3-tetradecylimidazolium bromid vykazují srovnatelnou nebo lepší dezinfekční účinnost ve srovnání s běžně dostupnou a hojně používanou solí - benzylododecyldimethylamonium (BAC) bromidem. Nicméně významným rozdílem a výhodou od známých, komerčně dostupných dezinfekčních směsí užívaných v současnosti, je potvrzená účinnost proti varicella-zoster viru (VZV neboli lidský herpesvirus 3 (HHV-3)).

Dalším provedením podle vynálezu je dezinfekční kompozice obsahující kvartérní amoniové soli, jejíž podstatou je, že buď obsahuje 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid podle obecného vzorce I, s výhodou kvartérní sůl 1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid, výhodněji 1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid podle vynálezu, nebo jeho kombinaci s alespoň jednou kvartérní amoniovou solí vybranou ze skupiny zahrnující N-

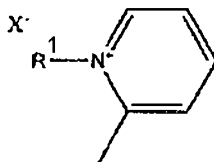
dodecyl-N-(2-hydroxyethyl)morfolinium-halogenid obecného vzorce II,



(II),

kde R je C₁₂ alkyl a X⁻ je anion vybraný ze skupiny obsahující Cl⁻, Br⁻ nebo I⁻ případně jiný vhodný anion, zajišťující dostatečnou rozpustnost pro potřeby aplikace;

a/nebo 1-hexadecyl-2-methylpyridinium-halogenid obecného vzorce III,



(III),

kde R¹ je C₁₆ alkyl a X⁻ je anion vybraný ze skupiny obsahující Cl⁻, Br⁻ nebo I⁻, popřípadě jiný vhodný anion, zajišťující dostatečnou rozpustnost pro potřeby aplikace.

Koncentrace 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenidu podle obecného vzorce I, s výhodou 1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenidu, výhodněji 1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromidu v dezinfekční kompozici podle vynálezu je v rozsahu 0,001 % hmotn. až 1 % hmotn., s výhodou 0,01 % hmotn. až 0,1 % hmotn..

V případě, že dezinfekční kompozice podle vynálezu obsahuje 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid podle obecného vzorce I, s výhodou 1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid, výhodněji 1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid a dále alespoň jednu z kvartérních amoniových solí obecných vzorců II nebo III nebo jejich kombinaci je celková koncentrace kvartérních amoniových solí v rozsahu 0,001 % hmotn. až 1 % hmotn., s výhodou 0,01 % hmotn. až 0,1 % hmotn.

Hmotn. % kvartérních amoniových solí podle vynálezu jsou vztažena k celkové hmotnosti dezinfekční kompozice podle vynálezu.

Také dezinfekční kompozice podle vynálezu vykazaly dle provedených testů vysokou dezinfekční účinnost proti celé řadě mikroorganismů a virů, tedy Gram-negativním, Gram-pozitivním bakteriím, obaleným virům a vybraným patogenním plísním vybraným ze skupiny zahrnující *Clostridium difficile*, *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Exophiala dermatitis*, *Aureobasidium melanogenum*, *Bifusaria dimerum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Enterococcus* spp., s výhodou Vankomycin rezistentní *Enterococcus*., *Klebsiella pneumoniae*, *Penicilium chrysogenum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, s výhodou *Staphylococcus aureus* Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., s výhodou *Klebsiella* Ext. Spectrum B-lactamase negativní, *Klebsiella* Ext. Spectrum B-lactamase pozitivní, *Pseudomonas* spp., s výhodou *Pseudomonas aeruginosa* multirezistentní, *Yersinia bercovieri*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* nebo obalené viry, s výhodou *varicella-zoster* vir.

Kompozice také vykazala zvláště vysokou účinnost obaleným virům, s výhodou *varicella-zoster* viru.

Kompozice podle vynálezu jsou účinné proti vysoce odolným mikroorganismům jako jsou *Aspergillus fumigatus* či *Clostridium difficile*, které běžně způsobují nemocniční infekce. Dezinfekční účinnost připravených kompozic podle vynálezu byla lepší než standardně používaný benzalkonium bromid (Ajatin) obsahující benzalkoniové soli různé délky řetězce při stejné koncentraci (0,1 % hmotn.). Navíc, na rozdíl od benzalkonium bromidu (Ajatinu) byla pozorována účinnost proti obalenému *varicella-zoster* viru (VZV) ze skupiny herpesvirů a prokázala nižší lokální dráždivost na buňkách lidského epidermu. Základní skelet sloučeniny měl podstatný vliv na spektrum dezinfekční účinnosti. Široké spektrum aktivity vůči běžným nemocničním patogenům může být proto dosaženo kombinací sloučenin s odlišným základním skeletem.

Výhodný hmotnostní poměr mezi jednotlivými amoniovými solemi v přípravcích podle vynálezu je v rozsahu 1:4 až 4:1, s výhodou 1:2 až 2:1. První číslice v uvedených rozsazích udává hmotn. díl 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenidu podle vynálezu, s výhodou 1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenidu, výhodněji 1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromidu obecného vzorce I a druhá číslice součet hmotn. dílů ostatních složek kompozice tedy N-dodecyl-N-(2-hydroxyethyl)morfolinium-halogenidu obecného vzorce II a 1-hexadecyl-2-methylpyridinium-halogenidu obecného vzorce III, nebo hmotn. díly jednotlivých složek kompozice tedy N-dodecyl-N-(2-hydroxyethyl)morfolinium-halogenidu obecného vzorce II nebo 1-hexadecyl-2-methylpyridinium-halogenidu obecného vzorce III.

Vzniklý dezinfekční roztok může být na povrch nanášen např. rozprašovačem, ponořením nebo potřením vhodným materiálem, napuštěným směsí. Vhodná je např. aplikační forma roztoku, pěny nebo gelu. Pro tyto účely mohou být použity pro konkrétní formulaci kompozice podle vynálezu další pomocné látky. Pomocné látky jsou vybrány ze skupiny obsahující parfém (zlepšení senzorických vlastností), gelotvorná a adhezivní činidla (zvýšení ulpívání na nehorizontálních površích modifikací reologických vlastností), barvicí složky (kontrola rozsahu ošetřeného povrchu) nebo vhodná rozpouštědla (potenciace dezinfekční účinnosti, prodloužení nebo zkrácení doby zasychání, možnost zvýšení koncentrace účinných složek). Jako rozpouštědlo je možné použít vodu, alkoholy nebo jiná rozpouštědla, ve kterých jsou předmětné kvartérní amoniové soli lépe rozpustné než ve vodě. Takovéto kompozice je možné použít k dezinfekci skla, kovů nebo odolných plastů, jako je PVC apod.

Kompozice podle vynálezu vykazaly v testech silnou dezinfekční účinnost proti testovaným mikrobům ze skupiny gramnegativních a grampozitivních bakterií a patogenních hub, které jsou častým původcem nozokomiálních onemocnění. Dezinfekční účinnost byla testována na kvasinkách (*Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*) a gram-pozitivních (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) neboli Zlatý *Staphylococcus*), enterokoky) a gram-negativních (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakteriích při koncentraci směsi 0,1 % hmotn. za expoziční čas 5 minut. Ve stejné koncentraci byly srovnatelně účinné s benzalkonium bromidem (Ajatinem), který byl zařazen v testu pro srovnání. Po uvedené expozici mikrobi testované směsi resp. benzalkonium bromidu (Ajatinu) nebyl pozorován žádný nárůst bakterií.

Na rozdíl od této běžně užívanému benzalkonium bromidu (Ajatinu) vykazala dezinfekční kompozice podle vynálezu vysokou účinnost proti herpetickým virům (VZV) a sporulujícímu *Clostridium difficile*. Zatímco dezinfekční kompozice podle vynálezu snížila titr viru o cca 4 řády po 5 minutové expozici při koncentraci 0,01 % hmotn., v případě benzalkonium bromidu (Ajatinu) byl pokles pouze cca 2 řády. V případě zamýšleného použití vynálezu v koncentraci 0,1 % hmotn. lze očekávat ještě vyšší účinnost. Dále dezinfekční kompozice podle vynálezu prokázala vyšší účinnost proti sporulujícímu *Clostridium difficile* po 10 min expozici při koncentraci 0,1 % hmotn. oproti benzalkonium bromidu (Ajatinu), který byl v tomto experimentu neúčinný. Účinnost proti *Aspergillus fumigatus* byl v případě benzalkonium bromidu (Ajatinu)

mírně lepší. Dezinfekční kompozice podle vynálezu, však redukovala výskyt této houby oproti kontrole při 5 minutové expozici a koncentraci 0,1 % hmotn.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Příprava 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium bromidu

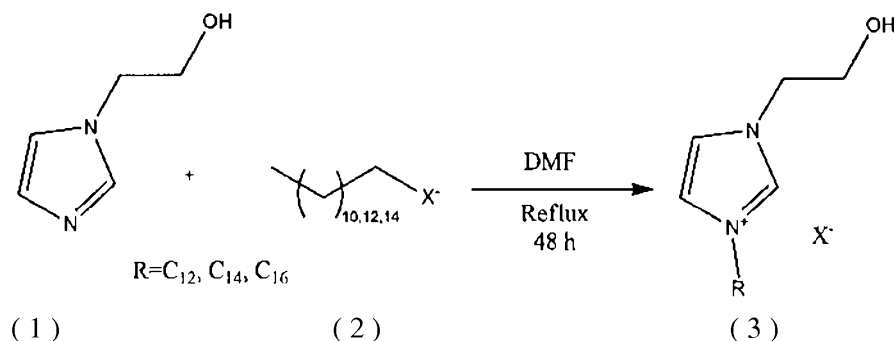


Schéma 1. Příprava 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenidu (3).

1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenidy **3** byly připraven reakcí 1-(2-hydroxyethyl)imidazolu **1** s 1-halogenalkanem (např. 1-bromdodekan, 1-bromtetradekan nebo 1-bromhexadekan **2** v dimethylformamidu (DMF), dle reakčního schématu 1 výše. Reakční směs, 1-(2-hydroxyethyl)imidazolu **1** a příslušné halogenalkany **2** v DMF, byla míchána po dobu 48 h za refluxu. Poté byla reakční směs zchlazena na laboratorní teplotu a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce. Ze získaného odparku byl získán produkt krystalizací z ethylacetátu v podobě olejovité kapaliny ve výtěžku asi 35 % (Tabulka 1).

Tabulka 1 Výtěžek 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenidy **3**

Sloučenina	Alkylový řetězec	Výtěžek (%)	Bod tání (°C)
3a	C ₁₂ H ₂₅	34	-
3b	C ₁₄ H ₂₉	35	*
3c	C ₁₆ H ₃₃	35	-

Výchozí sloučeniny byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (CZ) v nejvyšší dostupné čistotě. Rozpoušedla, dimethylformamid a ethylacetát, byla koupena od Penta chemicals Co. Na tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly použity hliníkové destičky potažené silikagelem Merck silica gel 60 F₂₅₄ analytical plates (mobilní fáze: methanol:voda=10:1). Jednotlivé sloučeniny byly na TLC detekovány pod ultrafialovým světlem o vlnové délce 254 nm. Teplota tání produktu nebyla měřena.

Příklad 2

Suroviny v množstvích, uvedených v tabulce 2 níže, byly rozpuštěny za laboratorní teploty v

deionizované vodě za vzniku roztoku dezinfekční kompozice I. Uvedené jsou také možnosti využití jako dvousložkové kompozice.

5 Tabulka 2

surovina	Kompozice I Množství (mg)	Množství (mg)	Množství (mg)
1-(2-hydroxyethyl)-3-tetradecylimidazolium bromid	33	50	50
N-dodecyl-N-(2-hydroxyethyl)morfoliniumbromid	33	50	-
1-hexadecyl-2-methylpyridinium-bromid	33	-	50
Voda	100000	100000	10000

10

Příklad 3

Mikrobiologické testování 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium bromid

- 15 V tabulkách 3 až 5 je shrnuta antimikrobiální aktivita 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl) imidazolových solí s délkou alkylačního řetězce C12, C14 a C16. Z tabulky 3 níže je patrné, že všechny deriváty inhibovaly růst *C. difficile*. Zejména derivát C14 stojí za pozornost, protože jako jediný po 5 minutové expozici snížil titer VZV o 5 řádů, což výrazně předčilo komerčně dostupné benzalkoniové soli. Obdobně, derivát C14 se jevil jako nejúčinnější proti vláknitým houbám (viz
- 20 tabulka 4), kvasinkám Gramm negativním a s výjimkou *P. aeruginosa* i Gramm pozitivním bakteriím. Ačkoliv účinnost nezajišťovala širokospektré použití, právě vhodná kombinace s výše uvedenými látkami struktury obecných vzorců II a III zajistí širokospektrý účinek na všechny typy mikroorganismů. Účinek této směsi je uveden níže v příkladu 4, kde je porovnán s
- 25 komerčně dostupným prostředkem.

Tabulka 3

1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid	<i>C. difficile</i> (8 min expozice)	Test. Koncentrace / hmotn.% dezinfekce	VZV, 5 min expozice, (dTCD50)	Test. Koncentrace/ hmotn.% dezinfekce
1-dodecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	+	0,5	1,16	0,01
1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	+	0,1	5	0,01
1-hexadecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	+	0,05	0	0,005
Kontrola (90% etanol)	++	0	0	0
Kontrola (voda)	+++	0		

- Kontrola (90% etanol) je nárůst *C. difficile*, kdy kultura byla vystavená pouze 90% etanolu po dobu 40 min a poté kultivována po dobu 24 hod. Kontrola (voda) kdy kultura byla vystavená pouze destilované vodě poté kultivována po dobu 24 hod. Vyhodnocení bylo semikvantitativní dle škály představující míru nárůstu *C. difficile* na kultivační misce dle škály: negativní, ojedinele, +, ++, +++.

Tabulka 4

10

1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid / MIC (μM)	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Exophiala dermatitis</i>	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	<i>Bifusaria dimerum</i>
1-dodecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	1000	300	-	300	-
1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	200	30	65	20	1000
1-hexadecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	300	100	30	55	1000

Tabulka 4 (pokračování)

15

1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid / MIC (μM)	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus niger</i>
1-dodecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	-	1000	-
1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	300	300	-
1-hexadecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	300	200	1000

Tabulka 5

1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid / MIC (μM)	<i>Staphylococcus aureus</i> (C1947)	<i>Methicilin rezistentní Staphylococcus aureus</i> (C1923)	<i>Vankomycin rezistentní Enterococcus</i>	<i>Escherichia coli</i> (A1235)	<i>Klebsiella Ext. Spectrum B-lactamase negativní</i> (C1950)
1-dodecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	3,91	9,77	46,88	31,25	62,5
1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	0,98	2,93	11,72	15,63	15,63
1-hexadecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	0,74	1,47	3,91	3,91	7,81

5

Tabulka 5 (pokračování)

1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid / MIC (μM)	<i>Klebsiella Ext. Spectrum B-lactamase pozitivní</i> (C1934)	<i>Pseudomonas aeruginosa multirezist.</i> (A1245)	<i>Yersinia bercovieri</i> (CNCTC 6230)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (J3474)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (J3552)
1-dodecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	125	1000	31,25	46,88	125
1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	31,25	500	7,81	7,81	15,63
1-hexadecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	15,63	1000	1,95	3,91	7,81

10

Příklad 4

15 Mikrobiologické ověření účinnosti kompozice podle vynálezu a srovnání s komerčně dostupným přípravkem

Kompozice I připravené dle příkladu 2 výše vykazala v testech silnou dezinfekční účinnost proti testovaným mikrobům ze skupiny gramnegativních a grampozitivních bakterií a patogenních hub, které jsou častým původcem nozokomiálních onemocnění. Dezinfekční účinnost byla
20 testována na kvasinkách (*Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*) a gram-pozitivních (Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp) a gram-negativních (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakteriích při koncentraci směsi 0,1% za expoziční čas 5 minut. Ve stejné koncentraci byly srovnatelně účinné s benzalkonium bromidem (Ajatinem), který byl zařazen v testu pro srovnání. Po uvedené expozici mikroba testované směsi resp.
25 benzalkonium bromidu (Ajatinu) nebyl pozorován žádný nárůst bakterií.

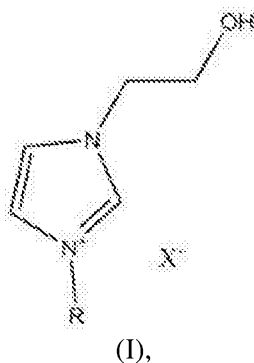
Na rozdíl od této běžně užívanému benzalkonium bromidu (Ajatinu) vykazala dezinfekční kompozice podle vynálezu vysokou účinnost proti herpetickým virům (VZV) a sporulujícímu

Clostridium difficile. Zatímco samotný derivát 1-(2-hydroxyethyl)-3-tetradecylimidazolium bromid snížil titr viru o 5 řádů po 5 minutové expozici, dezinfekční kompozice podle vynálezu snížila titr viru o cca 4 řády, v případě standardního benzalkonium bromidu (Ajatinu) byl pokles pouze cca 2 řády, vše při koncentraci 0,01 % hmotn. V případě zamýšleného použití vynálezu v koncentraci 0,1 % hmotn. lze očekávat ještě vyšší účinnost. Dále dezinfekční kompozice podle vynálezu prokázala vyšší účinnost proti sporulujícímu *Clostridium difficile* po 10 min. expozici při koncentraci 0,1 % hmotn. oproti benzalkonium bromidu (Ajatinu), který byl v tomto experimentu neúčinný. Účinnost proti *Aspergillus fumigatus* byl v případě benzalkonium bromidu (Ajatinu) mírně lepší. Dezinfekční kompozice podle vynálezu, však redukovala výskyt této houby oproti kontrole při 5 minutové expozici a koncentraci 0,1 % hmotn..

Dále byly dále provedeny testy kožní dráždivosti. Negativní výsledek kožní dráždivosti je nezbytnou podmínkou pro jejich praktické využití. Dezinfekční směsi byly hodnoceny ve dvou následných krocích, vyžadovaných platnou legislativou. Proběhlo testování dle OECD 439 - provedení testu „*In vitro* skin irritation“ na kožním modelu lidské kůže Epiderm. Testuje se stupeň poškození rekonstruovaných epidermálních buněk po 60 min. expozici testované látky a následnému zhodnocení viability těchto buněk pomocí běžného MTT testu. Kompozice I podle příkladu 2 o koncentraci 0,1 % hmotn. neprokázala téměř žádnou kožní toxicitu, čímž vykázala lepší bezpečnost než komerčně dostupný standard benzalkonium bromidu (Ajatin) 0,1 % hmotn., který po 60 minutové expozici vedl k cca 50 % úmrtí kožních buněk v tomto modelu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. 1-Alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid pro použití jako dezinfekční činidlo obecného vzorce I



kde R je C₁₂ - C₁₆ alkyl, X⁻ je anion vybraný ze skupiny obsahující Cl⁻, Br⁻ nebo I⁻, jako dezinfekční činidlo proti virům a mikroorganismům vybraným ze skupiny sestávající z *Clostridium difficile*, *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aureobasidium melanogenum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, s výhodou *Staphylococcus aureus* Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., s výhodou *Vankomycin* rezistentní *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. s výhodou *Klebsiella* Ext. *Spectrum B-lactamase* negativní, *Klebsiella* Ext. *Spectrum B-lactamase* pozitivní, *Pseudomonas aeruginosa*, s výhodou *Pseudomonas aeruginosa* multirezistentní, *Yersinia bercovieri*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* nebo obalené viry, s výhodou *varicella-zoster vir*.

2. 1-Alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid podle nároku 1, kterým je 1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid, s výhodou 1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid.

3. Dezinfekční kompozice proti virům a mikroorganismům vybraným ze skupiny sestávající z

Clostridium difficile, *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aureobasidium melanogenum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, s výhodou *Staphylococcus aureus* Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., s výhodou Vankomycin rezistentní *Enterococcus*,
 5 *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. s výhodou *Klebsiella* Ext. Spectrum B-lactamase negativní, *Klebsiella* Ext. Spectrum B-lactamase pozitivní, *Pseudomonas aeruginosa*, s výhodou *Pseudomonas aeruginosa* multirezistentní, *Yersinia bercovieri*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* nebo obalené viry, s výhodou varicella-zoster vir, **vyznačující se tím**, že obsahuje 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid podle kteréhokoliv z
 10 nároků 1 nebo 2.

4. Dezinfekční kompozice podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že koncentrace 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenidu je v rozsahu 0,001 % hmotn. až 1 % hmotn., s výhodou 0,01 % hmotn. až 0,1 % hmotn.

15

5. Dezinfekční kompozice podle nároku 3 nebo nároku 4, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje alespoň jednu kvartérní amoniovou sůl vybranou ze skupiny zahrnující N-dodecyl-N-(2-hydroxyethyl)morfolinium-halogenid obecného vzorce II,

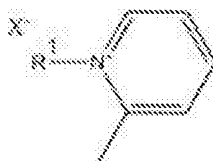


20

(II),

kde R je C_{12} alkyl a X^- je anion vybraný ze skupiny obsahující Cl^- , Br^- nebo I^- .

25 a/nebo 1-hexadecyl-2-methylpyridinium-halogenid obecného vzorce III,



(III),

30 kde R^1 je C_{16} alkyl a X^- je anion vybraný ze skupiny obsahující Cl^- , Br^- nebo I^- .

6. Dezinfekční kompozice podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že hmotnostní poměr mezi amoniovými solemi je v rozsahu 1:4 až 4:1, s výhodou 1:2 až 2:1.

35 **7.** Dezinfekční kompozice podle nároku 5 nebo nároku 6, **vyznačující se tím**, že celková koncentrace kvartérních amoniových solí je v rozsahu 0,001 % hmotn. až 1 % hmotn., s výhodou 0,01 % hmotn. až 0,1 % hmotn.

8. Dezinfekční kompozice podle kteréhokoliv z nároků 3 až 7, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje alespoň jednu pomocnou látku vybranou ze skupiny obsahující parfémy, gelotvorná činidla, adhezivní činidla, barviva, nebo rozpouštědla.

40

9. Dezinfekční kompozice podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že je ve formě roztoku, pěny nebo gelu.

45