



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 299 416 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 L 2/18

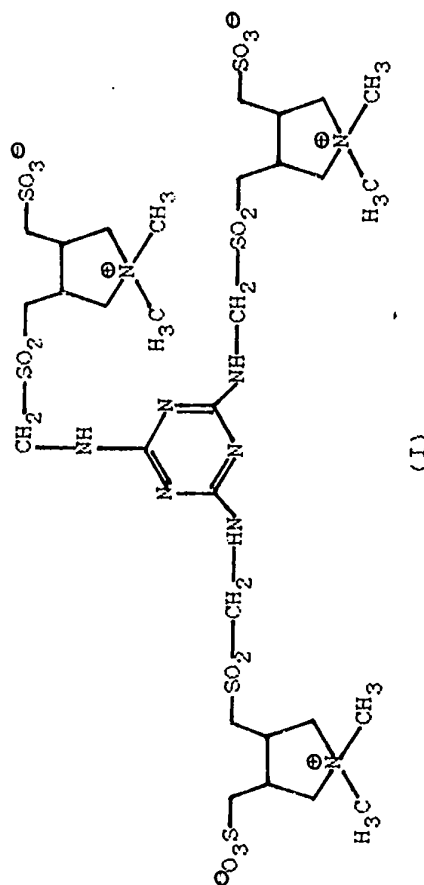
DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD A 61 L / 336 605 3	(22)	28. 12. 89	(44)	16. 04. 92
(71)	Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE				
(72)	Ohme, Roland, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Ballschuh, Detlef, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Seibt, Horst, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Nordheim, Willy, Dr. habil. Dipl.-Ing.; Bräuninger, Siegfried, Dr. Dipl.-Biol.; Fischer, Ingeborg, Dipl.-Ing.; Krüger, Erika; Jülich, Wolf-Dieter, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Kramer, Axel, Dr. sc. med.; Weuffen, Wolfgang, OMR Prof. Dr. sc. med. Dr. rer. nat., DE				
(73)	Institut für Chemische Technologie, Rudower Chaussee 5, O - 1199 Berlin; Robert-Koch-Institut, Britzer Straße 1-3, O - 1190 Berlin; Landeshygiene Institut Greifswald, Lange Reihe 2, O - 2200 Greifswald; Zentralinstitut für Organische Chemie, O - 1199 Berlin; Ernst-Moritz-Arndt-Universität, O - 2200 Greifswald, DE				
(74)	Akademie der Wissenschaften, Institut für Chemische Technologie, Rudower Chaussee 5, O - 1199 Berlin, DE				
(54)	Desinfektionsmittellösung zur Inaktivierung von Keimen				

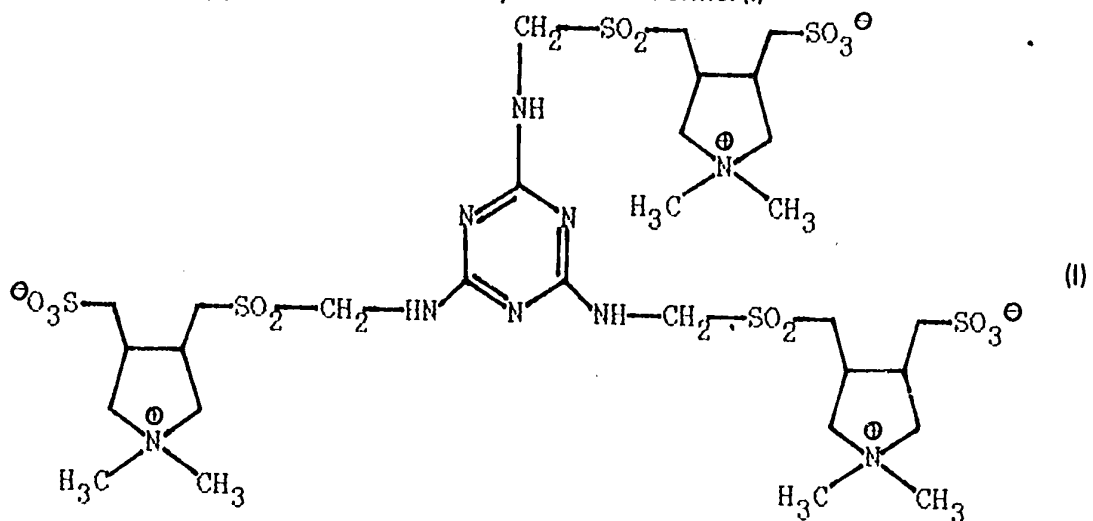
(55) Keimminderung; Desinfektion; desinfizierende Reinigung; synergistischer Effekt; Sulfobetaine; Sulfone; Viren; Bakterien; Pilze; parasitische Protozoen; Pyrrolidinium-betaine; Melamin

(57) Die Erfindung betrifft eine Desinfektionsmittellösung zur Desinfektion und zur desinfizierenden Reinigung. Es wird das polyfunktionelle Amidomethyl-sulfon-pyrrolidinium-sulfomethyl-betain der Formel (I) verwendet, welche durch Alkohol in ihrer desinfizierenden Wirkung deutlich synergistisch verstärkt werden. Erfindungsgemäß wird eine umfassende keimmindernde Wirkung gegen Viren, Bakterien, Pilze, parasitische Protozoen und Helminthen erreicht, welche sowohl zur Hautdesinfektion als auch zur Desinfektion von glatten und rauen Oberflächen eingesetzt werden kann. Im Gegensatz zu Peressigsäure erfolgt keine Abschwächung durch Blut. Herkömmliche Desinfektionsmittel mit sauren, oxydierenden, hautreizenden, sensibilisierenden oder korrosiven Eigenschaften können ersetzt werden. Formel (I)



Patentansprüche:

1. Desinfektionsmittellösung zur Inaktivierung von Keimen, dadurch gekennzeichnet, daß die Keimminderung, keimmindernde Reinigung und/oder Desinfektion durch das polyfunktionelle Anidomethyl-sulfon-pyrrolidinium-sulfomethyl-betain der Formel (I)



erfolgt, welches in Wasser in Konzentrationen von 0,01 bis 2 Gew.-% angewandt werden kann oder zur synergistischen Wirkungssteigerung in gleicher Konzentration in Wasser/Alkoholmischungen mit einem Anteil von 20 bis 99 Vol.-% Wasser und 1 bis 80 Vol.-% Alkohol gelöst wird.

2. Desinfektionsmittellösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Alkohol Ethanol oder ein Propanol verwendet werden.
3. Desinfektionsmittellösung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur Hautdesinfektion mit spezifischer Wirksamkeit gegen Hepatitis-B-Viren der Wirkstoff der Formel (I) in Wasser/Alkohol-Mischungen mit einem Alkoholgehalt von 30 bis 80 Vol.-% gelöst wird.
4. Desinfektionsmittellösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die vollständige Auflösung von Blutverschmutzungen der Wirkstoff der Formel (I) im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 2 Gew.-% eingesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Anwendung bezieht sich auf eine Keimabtötung/Inaktivierung von Keimen mit breiter Wirkung im human- und veterinärmedizinischen Bereich sowie in der Lebensmittelindustrie.

Die Anwendung ist für Einrichtungen möglich, in denen Maßnahmen für eine multivalente Keimminderung, eine keimmindernde Reinigung bzw. Desinfektion notwendig sind.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Multivalente Mittel zur Keimabtötung, die sich gleichzeitig durch Anwenderfreundlichkeit, hohe Effektivität sowie durch toxikologische und ökologische Kriterien auszeichnen, das Kapillarproblem berücksichtigen und die nicht zuletzt ökonomisch günstig herstellbar sind, existieren bisher noch nicht. Aufgrund der Verschiedenartigkeit der Keime, der Anwendungsgebiete, Produkte und Prozesse oder der Verträglichkeit und Umweltbelastung durch Desinfektionsmittel ist das Gebiet sehr unübersichtlich und verbesserungsbedürftig. Eine Gliederung nach chemischen Stoffklassen mit Bezug auf die entsprechenden Anwendungsgebiete ist auch schwer möglich. Andererseits werden wegen der Unterschiedlichkeit der Keime die eingesetzten Desinfektionsmittel auch variabel gehalten, und die chemischen Wirkstoffe kommen oft untereinander kombiniert oder zusammen mit physikalischen Mitteln (z.B. Temperaturerhöhung) zum Einsatz.

Wegen der Vielseitigkeit der Anwendungskriterien sind daher für die einzelnen Desinfektionsverfahren und besonders Desinfektionsaufgaben (Hände-, Haut-, Instrumentendesinfektion usw.) die einzelnen Desinfektionsmittel angepaßt. Die Forderungen nach schneller und sicherer Desinfektion sind schwer in Einklang zu bringen mit der Forderung nach Verträglichkeit, der Forderung nicht korrosiv zu wirken und anderen ökologischen und ökonomischen Gesichtspunkten wie Haltbarkeit, Lagerfähigkeit, Geruchsbelästigung, Hautirritation und Handhabbarkeit. Nach dem Stand der Technik werden hohe Wirksamkeit und Sicherheit mit Nachteilen in der Handhabung begleitet. Bei der Suche nach neuen, sicheren Desinfektionsmitteln sind antivirale Mittel bisher nicht umfassend genug bearbeitet worden, wodurch die oben genannten Nachteile für die Virusdesinfektion in besonderem Maße bestehen und die Palette der einsetzbaren antiviralen Desinfektionsmittel noch klein ist. Bei chemischen Keimabtötungsverfahren wurden bisher folgende Mittel angewandt (HORN, PRIVORA, WEUFFEN, „Handbuch der Desinfektion und Sterilisation“ Band 1 bis 5, Verlag Volk und Gesundheit 1972 bis 1984):

- Aldehyde bzw. Gemische von Aldehyden;
- Alkohole, besonders Ethanol und die Propanole;
- Halogenverbindungen, besonders Jodverbindungen und Hypochlorite;
- Lactone;
- Metallverbindungen (Quecksilberchlorid, Kupfersulfat);
- Oxydantien (Peressigsäure, Ozon), Epoxide;
- Phenole, Xylenole;
- Quartäre Ammoniumverbindungen;
- spezielle Tenside, z. B. Carbobetaine,

wobei sich neue Wirkstofftypen für Desinfektionsmittel bisher nicht durchgesetzt haben.

Von den genannten Verbindungen haben z. B. Peressigsäure und Aldehyde einen sehr breiten Wirkungsbereich. Diese Substanzen sind aber in der Regel toxisch, lagerinstabil und/oder weisen hohe Korrosivität auf. Dazu kommt eine rasche Inaktivierung der Peressigsäure durch Blut, was zu einer erheblichen Wirkungseinschränkung führt. Formaldehyd führt aufgrund seiner sensibilisierenden Wirkung zu Berufserkrankungen. Sporenabtötende Präparate wie Perameisensäure und Ethylenoxid sind als besonders toxisch, z. T. als cancerogen einzuordnen. Phenole besitzen deutliche Lücken im Wirkungsspektrum und sind in der Regel unangenehm geruchsintensiv. Hypochlorite werden ungeachtet der erheblichen Anwenderunfreundlichkeit eingesetzt. Die Wirkung von Alkoholen gegen Hepadnaviren ist nicht sicher beweisbar, deshalb werden sie in Risikobereichen mit anderen Wirkstoffen eingesetzt. Auch bei den bisher verwendeten kationischen Tensiden und den Carbobetainen bestehen Wirkungslücken.

Wirkung gegen ausgewählte Viren wurden nachgewiesen für:

- Aldehyde (Formaldehyd, Glutaraldehyd);
- Alkohole (Ethanol, Propanol);
- Halogenverbindungen (besonders Hypochlorite);
- Peressigsäure;
- einige zwitterionische Detergentien.

Bei der Bewertung von Desinfektionsmitteln zur Keimabtötung stellen Viren und Bacteriensporen ein Hauptkriterium dar.

Als Testviren sind sehr häufig eingesetzt worden:

Influenzaviren, Vaccinaviren, Poliomyelitisviren;

dann folgen:

Coxsackieviren, ECHO-Viren, Adenoviren, Herpesviren.

Influenza- und Vaccinaviren sind in ihrem Verhalten gegenüber Desinfektionsmitteln als etwa gleich zu betrachten – trotz z. B. unterschiedlicher Ätherresistenz.

Als besonders resistent gelten Hepadnaviren.

Ziel der Erfindung

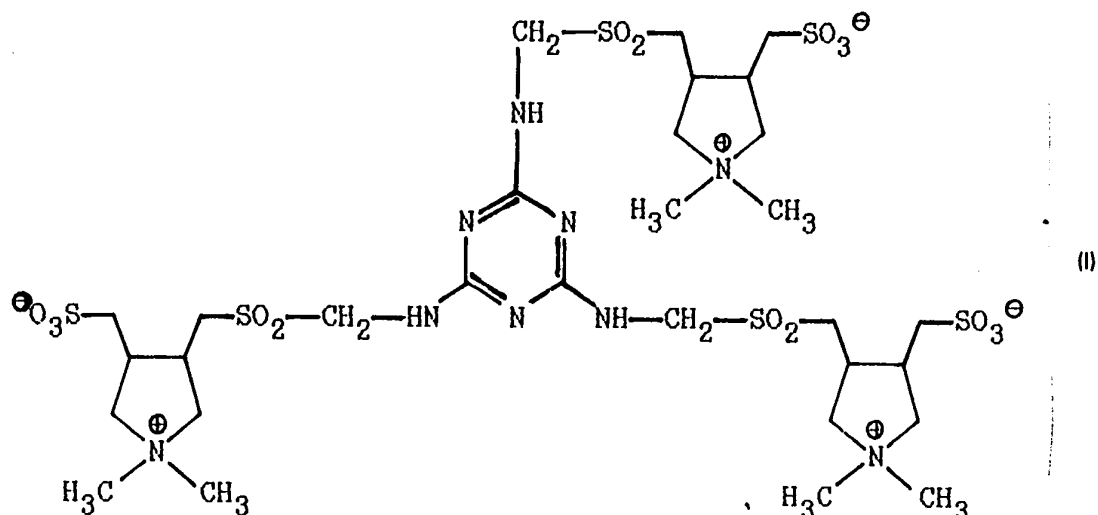
Ziel der Erfindung sind solche Desinfektionsmittellösungen, die eine multivalente Keimabtötung auf chemischem bzw. physikochemischem Wege bei Beachtung anwendungstechnischer Kriterien erlauben, und zwar gleichzeitig gerichtet gegen Bakterien, Pilze und Viren sowie gegen andere Keime, wobei unter Anpassung an unterschiedliche Anwendungsbedingungen eine sichere Keimabtötung erreicht und einer toxischen Schädigung beim Anwender entgegengewirkt wird.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe, die durch die Erfindung gelöst wird, besteht darin, solche Desinfektionsmittellösungen zu finden, durch die eine multivalente Keimabtötung/Inaktivierung von Keimen ohne Reaktivierung der Keime erreicht wird. Diese Desinfektionsmittellösungen sind ausgerichtet auf

- hohe Wirksamkeit gegen Viren, Bakterien, Sporen und Wurmeier;
- Anwendungsfreundlichkeit (wenig bzw. nicht hautreizend, keine Korrosionswirkung, gewisse Reinigungswirkung, geringe Geruchsbelästigung, Wasserlöslichkeit);
- günstige Eigenschaften (toxikologische, cancerogene, mutagene, teratogene und ökologische Kriterien);
- Berücksichtigung des Kapillarproblems bzw. des Eindringens in Poren bzw. rauhe Flächen;
- Schmutzauflösung; Auflösung von Blutbeimengungen;
- ökonomische und rohstoffseitige Produzierbarkeit.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Keimminderung/Desinfektion durch ein polyfunktionelles Amidomethyl-sulfon-pyrrolidinium-sulfomethyl-betain der Formel (I),



welches durch Erwärmen von 1,1-Dimethyl-3-sulfin säuremethyl-4-sulfomethyl-pyrrolidiniumbetain (hergestellt nach DD-PS 225 128), Formaldehyd und Melamin im Molverhältnis 3:3:1 in Wasser auf 100°C sehr einfach hergestellt werden kann, in wäßrigen Lösungen in Gesamtkonzentrationen zwischen 0,01 bis 2 Gew.-%, welche zur synergistischen Wirkungssteigerung Ethanol oder ein Propanol enthalten können, vorgenommen wird.

Im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 2 Gew.-% Wirkstoff wird eine vollständige Auflösung von Blutverschmutzungen erreicht. Überraschenderweise wurde gefunden, daß bereits wäßrige Lösungen in geringen Konzentrationen eine starke Inaktivierung verschiedener Keime bewirken, während hochresistente Keime (z. B. Hepatitis-B-Viren) durch die Kombination der polyfunktionellen Sulfobetaine mit Alkoholen (Ethanol, Propanole) inaktiviert werden; ein solcher synergistischer wirkungssteigernder Effekt tritt erfindungsgemäß in Lösungen ein, welche 20 bis 99 Vol.-% Wasser und 1 bis 80 Vol.-% Alkohol enthalten. Gegen Hepatitis-B-Viren werden 30 bis 80 Vol.-% Ethanol oder Propanol in Kombination mit den erfindungsgemäßen Sulfobetainen eingesetzt. Durch diese günstige Kombinierbarkeit ist es möglich, die Desinfektionsmittellösung zur multivalenten Keimtötung unterschiedlichsten Anwendungsbedingungen anzupassen. Dadurch ist es auch möglich, spezifische Wirkungen gegen Bakterien, Sporen, Pilze, Viren, parasitische Protozoen und Wurmeier zu erzielen. Die erfindungsgemäße Desinfektionsmittellösung eignet sich zur Hautdesinfektion ebenso wie zur Keimminderung auf harten oder rauen Oberflächen, beispielsweise Geräten, lackierten Flächen, Metallen, Emaille und Keramik.

Sie wirkt nicht hautreizend, nicht korrosiv, zeigt keinen unangenehmen Geruch, ist nicht toxisch und sowohl als Substanz als auch in Lösung unbegrenzt lagerfähig. Mit anderen wäßrigen oder wäßrig-alkoholischen Mitteln ist sie im Bedarfsfalle kombinierbar. Durch vorgenanntes Eigenschaftsbild ist sie herkömmlichen Desinfektionslösungen in Wirkung und Gebrauchswert überlegen und kann kostengünstig hergestellt werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Zu einem Mikroorganismengemisch mit 10^8 Keimen/ml in stark viskosem Nährmedium aus *Bacillus subtilis*, *Endomycopsis bispora* einschließlich deren Sporen, wird das polyfunktionelle Amidomethyl-sulfon-pyrrolidinium-sulfomethyl-betain der Formel (I) in einer Endkonzentration von 0,2 Gew.-% zugemischt und 30 Minuten inkubiert. Nach der Entaktivierung des Wirkstoffes durch Verdünnen mit sterilem Leitungswasser erfolgt die Prüfung auf Sterilität mit den Nährböden gemäß Arzneibuch-DDR, Band I, X, 4.0.1. ff. und 7.0.1. ff.

Ergebnisse:

- mit dem Wirkstoff der Formel (I): steril
- Kontrolle ohne Wirkstoff: Keimwachstum

Beispiel 2

Zu Hühnerblut, das 10 Vol.-% Citratpuffer enthält, werden Influenzaviren Typ A Stamm A/PR/8/34 in Allantoisflüssigkeit gegeben. Nach gründlichem Vermischen wird dazu ein solches Volumen einer 10%igen Lösung von Amidomethyl-sulfon-pyrrolidinium-sulfomethyl-betain der Formel (I) in 10%iges Ethanol gegeben, daß die Endkonzentration an Wirkstoff 0,25 Gew.-% beträgt. Nach erneutem Durchmischen und einer Einwirkungszeit von 10 Minuten wird durch Zugabe des mindestens 100fachen Volumens einer gepufferten NaCl-Lösung entaktiviert.

Damit werden nach den üblichen Verfahren für die Vermehrung von Influenzaviren vorbebrütete Hühnereier beimpft. Von diesen Eiern wird nach einer Inkubationszeit von mindestens 48 Stunden Allantoisflüssigkeit steril entnommen und die Virusvermehrung im Vergleich zur mit NaCl-Lösung beimpften Kontrolle und zu den Bruteiern ohne Wirkstoff mit Hilfe des Hämagglutinationstestes vergleichend beurteilt.

Ergebnisse:

- mit Wirkstoff der Formel (I): keine Virusvermehrung
- ohne Wirkstoff: volle Virusvermehrung

Die Prüfung der Inaktivierung wurde nach den „WHO-Requirements für Influenza Vaccine (Inactivated)“ durchgeführt.

Beispiel 3

Zu einer gepufferten Virussuspension, die mindestens 10^4 infektiöse Einheiten pro ml Adenovirus (human) Typ 2 enthält, wird ein solches Volumen einer 10%igen Lösung des polyfunktionellen Amidomethyl-sulfon-pyrrolidinium-sulfomethyl-betains der Formel (I) in steriles Leitungswasser gegeben, daß die Endkonzentration an Wirkstoff 0,4% beträgt.

Nach dem Durchmischen und einer Einwirkungszeit von 30 Minuten wird durch Zugabe des mindestens 100fachen Volumens einer lactalbuminhaltigen Phosphatpufferlösung entaktiviert.

Damit wird nach den üblichen Verfahren eine für die Vermehrung dieser Adenoviren geeignete permanente Zelllinie beimpft. Von jedem Kulturgefäß werden mehrere Subkulturen angelegt und die Virusreplikation im Vergleich zur unbeimpften Kontrolle und zu den Zellkulturen mit Adenovirus ohne Wirkstoff mit Hilfe des cytopathischen Effekts (CPE) sowie der Immunfluoreszenz vergleichend beurteilt.

Ergebnisse:

- mit Wirkstoff der Formel (I): kein CPE
- ohne Wirkstoff: CPE

Beispiel 4

Inaktivierung von Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) im Suspensionstest:

Gleiche Teile eines HBsAg-haltigen Serumpools in verschiedenen Verdünnungen und des zu prüfenden Desinfektionsmittels werden gemischt. Nach einer Einwirkungszeit von 30 Minuten werden die Proben durch eine Verdünnung von 1:100 inaktiviert. Die Bestimmung der Restaktivität des HBsAg erfolgt mit einem Radioimmunoassay im Vergleich zu einem Kontrollansatz.

Ergebnisse:

	Rest- aktivität	Kontroll- ansatz = 100% Serumpool 1:50
	Serumpool unverd.	
0,1% Wirkstoff der Formel (I) in 70%igem Ethanol (I:II = 4:1)	10%	8%
0,1% in Wasser	90%	65%

Beispiel 5

Mäuseschwänzentest:

10 mm lange Schwanzstücke werden nach gründlicher Vorreinigung 5 Minuten in einem HBsAg-haltigen Serumpool eingelegt und 30 Minuten bei Zimmertemperatur angetrocknet. Zum Desinfektionsversuch werden die Schwanzstückchen einzeln in 50-ml-Meßbecher, deren Boden mit Glasperlen bedeckt ist, eingelegt, 1 ml Desinfektionslösung [0,1%ige Lösung des Amidomethyl-sulfon-pyrrolidinium-sulfomethyl-betains der Formel (I) in 50%igem n-Propanol] zugegeben und 2 bzw. 30 Minuten apparativ geschüttelt. Danach wird die Probe 1:50 verdünnt und die Restaktivität des HBsAg mit einem Radioimmunoassay bestimmt. Die Schwanzstücke werden mit 3 ml physiologischer Kochsalzlösung übergossen und erneut 5 Minuten geschüttelt. Die Restaktivität in der Spülflüssigkeit wird wiederum mit einem Radioimmunoassay bestimmt.

Ergebnisse:

Restaktivität des HBsAg; (Kontrolle = 100%)

Einwirkungszeit 2 min		Einwirkungszeit 30 min	
Desinfektions- Lösung	Spül- Lösung	Desinfektions- Lösung	Spül- Lösung
9%	2,5%	6%	1%

Beispiel 6

Meerschweinchenhauttest

Aus rasierter Rückenhaut von Meerschweinchen ausgestemmte Fellstücke werden um Knöpfe mit einer planen Oberfläche gelegt (Durchmesser 2,5 cm), auf der Rückseite mit chirurgischem Nahtmaterial vernäht und durch in die Knopflöcher eingeführte Holzstäbchen fixiert. Für einen Test werden jeweils 2 derart präparierte Keimträger benötigt.

Ein Keimträger wird mit 0,05 ml HBsAg-haltigem Serum beschickt und 30 Minuten bei Raumtemperatur angetrocknet. Danach werden 0,5 ml der zu prüfenden Desinfektionslösung hinzugefügt und mit Hilfe des zweiten Keimträgers waschende Bewegungen ausgeführt. Nach einer Einwirkungszeit von 2 bzw. 30 Minuten wird die Desinfektionslösung abgewaschen und anschließend die Keimträger 5 Minuten mit 3 ml 0,9%iger Kochsalzlösung gespült. Die Restaktivität des HBsAg wird mit einem Radioimmunoassay bestimmt.

Ergebnisse:

0,1%ige Lösung von Amidomethyl-sulfon-pyrrolidinium-sulfomethyl-betain der Formel (I) in 90%igem n-Propanol; Restaktivität des HBsAg.

Kontrollsubstanz = 100 %

Einwirkungszeit 2 min	Einwirkungszeit 30 min
6%	2%

Beispiel 7

Herstellung des polyfunktionellen Amidomethyl-sulfon-pyrrolidinium-sulfomethyl-betains der Formel (I):

Es wird Melamin mit 1,1-Dimethyl-3-sulfinsäuremethyl-4-sulfomethyl-pyrrolidinium-betain (hergestellt nach DD PS 225 128) und Formaldehyd in Wasser im Molverhältnis 1:3:3 umgesetzt.

102,3 g (0,3 mol) 80%ige Sulfinsäurekomponente werden in 361 ml Wasser mit 33 ml (0,3 mol) 30%ige Formalinlösung 1 Stunde bei 60°C gerührt; die Lösung wird danach mit 12,61 g (0,1 mol) Melamin versetzt und 30 min auf 80 bis 100°C erwärmt. Nach Auflösung wird zur Klärung filtriert und im Vakuum eingeengt. Man erhält 95,2 g farbloses glasiges Festprodukt, welches bei 270 bis 280°C unter Zersetzung schmilzt. Es ist in Wasser sehr leicht löslich.

