

726.

Licenční smlouva

Fakultní nemocnice Hradec Králové, se sídlem Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové – Nový Hradec Králové

IČ: 00179906

DIČ: CZ00179906

bankovní spojení: ČNB, 24639511/0710

zastoupená: prof. MUDr. Vladimírem Paličkou, CSc., dr. h. c., ředitelem

jméno osoby a emailová adresa pro komunikaci: [REDACTED]

dále jen „**Poskytovatel**“ na straně jedné

a

GR - NANO a.s., se sídlem Vojtěšská 211/6, Nové Město (Praha 1), 110 00 Praha

IČ: 08056510

DIČ: CZ08056510

Zapsána v obchodním rejstříku u Městského soudu v Praze, oddíl B, vložka 24332,

bankovní spojení: **Fio banka a.s. ,pobočka Česká Lípa** , číslo účtu: 2801618942/2010

zastoupená: Dr. Janem Šarochem, statutárním ředitelem společnosti GR – NANO a.s.

jméno osoby a emailová adresa pro komunikaci: Dr. Jan Šaroch, 1topnanofiltr1@gmail.com

dále jen „**Nabyvatel**“ na straně druhé

uzavírají tímto Licenční smlouvu dle ustanovení § 2358 a násl. zákona č. 89/2012 Sb., občanský zákoník, v platném znění.

Strany této smlouvy se níže mohou souhrnně označit též jako „Smluvní strany“.

Smluvní strany, vědomy si svých závazků v této smlouvě obsažených a s úmyslem být touto smlouvou zavázány, dohodly se na následujícím znění smlouvy.

1. Úvodní ustanovení

- 1.1. Poskytovatel má znalosti a dovednosti v oblasti výzkumu, vývoje a testování dezinfekčních prostředků.
- 1.2. Poskytovatel vytvořil v rámci své činnosti duševní vlastnictví v rozsahu popsaném v článku 2.1. této smlouvy, na které touto smlouvou poskytuje Nabyvateli výhradní licenci za podmínek v této smlouvě dále uvedených.
- 1.3. Nabyvatel, předmětem jehož podnikání je:
 - výzkum, vývoj nových produktů v oblasti průmyslu, zdravotnictví, ochrany životního prostředí atd.

- uvedení nových výrobků do výroby v průmyslovém měřítku
- uvedení nových výrobků na světový trh
vyjadřuje tímto svůj záměr dokončit vývoj a uvést na trh nový dezinfekční prostředek (dále jen „Licencovaný produkt“), využívající duševní vlastnictví Poskytovatele uvedené v čl. 2.1. této smlouvy (dále jen „Licencovaná technologie“).

- 1.4. Nabyvatel v plném rozsahu uznává práva Poskytovatele na duševní vlastnictví vymezené v čl. 2.1. této smlouvy a zavazuje se užívat tuto licenci v souladu s níže uvedenými podmínkami.

2. Předmět licence

- 2.1. Předmětem licence duševního vlastnictví Poskytovatele je následující:
- související know how Poskytovatele specifikované v příloze č. I. této smlouvy
 - technické řešení chráněné Patentem č. 307 717, platném od 1. 8. 2018, vydaném na základě rozhodnutí Úřadu průmyslového vlastnictví o udělení patentu ze dne 30. 1. 2019 (kopie patentu je uvedena v příloze II. této smlouvy),
 - technické řešení, které je předmětem užitého vzoru č. 32359, platném od 1. 8. 2018, vydaném na základě osvědčení Úřadu průmyslového vlastnictví ze dne 26. 11. 2018 (kopie užitého vzoru je uvedena v příloze III. této smlouvy),
- 2.2. Licence je poskytována jako výhradní, s celosvětovou platností.
- 2.3. Za poskytnutí licence náleží Poskytovateli odměna uvedená v článku III. této smlouvy.

3. Odměna, platby Nabyvatele a platební podmínky

- 3.1. Nabyvatel se v souladu s ustanovením článku I. a II. této smlouvy zavazuje platit Poskytovateli odměnu za poskytnutou licenci v podobě jednorázového licenčního poplatku uvedeného v bodu 3. 2. této smlouvy a zároveň v podobě pravidelných ročních licenčních poplatků, vyplácených od data uvedení Licencovaného produktu na trh dle podmínek v bodu 3.3. této smlouvy.
- 3.2. Jednorázový licenční poplatek činí 180 000 Kč (sto osmdesát tisíc korun českých) a je splatný do třiceti dnů od účinnosti této smlouvy na bankovní účet Poskytovatele uvedený v záhlaví této smlouvy na základě daňového dokladu vystaveného nabyvatelem navýšeného o DPH v zákonné výši.
- 3.3. Výše pravidelných ročních licenčních poplatků od data uvedení Licencovaného produktu na trh bude vypočítávána z čistého obrátu Nabyvatele za prodej Licencovaného produktu, přičemž minimální výše těchto pravidelných ročních licenčních poplatků za podmínek uvedených dále bude činit 150 000 Kč (sto padesát tisíc korun českých) - tzv. Minimální licenční poplatek. Výše pravidelných ročních licenčních poplatků bude odpovídat 6,5% (šest a půl procenta) hodnoty čistého obrátu plně uhrazeného odběratelem (tj. z tržeb za prodej Licencovaného produktu ze závodu Nabyvatele prvnímu odběrateli, jež nebude propojenou osobou s Nabyvatelem, vše bude vypočítáváno z cen bez DPH, dopravy a příp. dalších zákonných poplatků). Do hodnoty čistého obrátu se nezahrnují poskytnuté demo vzorky, vzorky na testování a pro jiné účely neprodávané se ziskem třetím osobám. Nabyvatel je povinen zaplatit Poskytovateli Minimální licenční poplatek v příslušné výši namísto licenčního poplatku vypočteného z čistého obrátu vždy v případě, že takový vypočtený licenční poplatek nedosáhne výše sjednaného minimálního licenčního poplatku.

- 3.4. Nabyvatel je povinen vést průkaznou evidenci o výrobě a prodeji Licencovaného produktu a vždy do 28. 2. po skončení kalendářního roku, jehož obrat je předmětem výpočtu, zaslat Poskytovateli mailovou zprávou na kontakt uvedený v záhlaví této smlouvy přehled prodejů za dané období s vyčíslením výše čistého obratu, výše plateb a z toho vyplývajícího pravidelného ročního licenčního poplatku. Poskytovatel na základě zaslaného přehledu vystaví Nabyvateli daňový doklad navýšený o DPH v zákonné výši. Pravidelný roční licenční poplatek je splatný do 30 dnů od obdržení řádného daňového dokladu od Poskytovatele na bankovní účet uvedený v záhlaví této smlouvy. Poskytovatel má právo na vyžádání nahlédnout do účetnictví Nabyvatele a případně do účetnictví všech propojených osob Nabyvatele, které by se do souvisejících transakcí zapojovaly, avšak ne častěji než jednou za kalendářní rok, a to jen v rozsahu týkajícím se zjištění objemu prodeje Licencovaných produktů a jejich prodejních cen. Veškeré takto poskytnuté informace a záznamy se považují za důvěrné ve smyslu § 2366 odst. 2 občanského zákoníku.
- 3.5. Nabyvatel se zavazuje platit Poskytovateli podíl na odměně ze všech přijatých plnění od Nabyvatelů sublicence nad rámec licenčních poplatků dle odst. 3.3, ve výši 40 % (slovy čtyřicet procent) ze všech takových přijatých plnění.
- 3.6. Nabyvatel bude dále hradit nad rámec licenčních poplatků udržovací poplatky licencovaného patentu a poplatky za prodloužení licencovaného užitého vzoru. Platby Nabyvatele budou probíhat na základě výzvy nebo faktury vystavené Poskytovatelem nebo patentovým zástupcem, kterého zastupováním Poskytovatel na základě písemného souhlasu Nabyvatele pověří.

4. Práva a povinnosti Poskytovatele

- 4.1. Poskytovatel se zavazuje poskytnout Nabyvateli veškeré informace o dosavadních výsledcích výzkumu licencované technologie včetně zpráv a výsledků testování, zpráv a dokumentů popisujících průběh výzkumných prací, které Poskytovatel předá Nabyvateli do 10 dnů po úhradě jednorázového licenčního poplatku. O předání bude sepsán předávací protokol.
- 4.2. Poskytovatel poskytne Nabyvateli přiměřenou součinnost, kterou po něm lze racionálně požadovat, potřebnou pro výkon práv Nabyvatele plynoucích z této Smlouvy. Tato součinnost však nezahrnuje povinnost Poskytovatele spolupracovat při vývoji a zavádění výroby Licencované technologie, vývojovou a výzkumnou činnost na úrovni poloprovozních a provozních podmínek ani technické poradenství související s výrobou Licencované technologie.
- 4.3. Pokud se na tom Strany dohodnou, Poskytovatel s Nabyvatelem bude spolupracovat při vývoji a výrobě Licencovaných produktů na základě zvláštní dohody, přičemž data a konkrétní podmínky poskytování takové spolupráce, včetně příslušné odměny, budou dohodnuty mezi Stranami samostatnou smlouvou.
- 4.4. Poskytovatel bude mít nadále právo publikovat a prezentovat výsledky týkající se předmětného technického řešení na odborných seminářích, konferencích a setkáních a v odborných časopisech. Poskytovatel je povinen o těchto publikacích a prezentacích informovat Nabyvatele, který je oprávněn je dále používat pro marketingové účely.
- 4.5. Poskytovatel Nabyvateli nezaručuje ani neodpovídá za prodejnost, bezpečnost, užitnost nebo komerční využitelnost licencované technologie nebo licencovaného produktu. Poskytovatel prohlašuje, že předmět licencované technologie a práva k ní řádně nabyt výzkumnou činností, Poskytovatel je k datu uzavření této smlouvy samostatně oprávněn k výkonu práv z

předmětného patentu a užitného vzoru jako jeho jediný majitel, včetně práva k poskytnutí licence dle § 11 odst. 1 zákona č. 527/1990 Sb., o vynálezech a zlepšovacích návrzích, v platném znění a dle § 12 odst. 2 zákona č. 478/1992 Sb., o užitných vzorech v platném znění. Poskytnutí licence nebrání žádné právní závazky Poskytovatele vůči třetím osobám. Poskytovatel dále prohlašuje, že na poskytnutí licence neváznou žádné právní vady. V případě, že patentová práva Poskytovatele budou porušována třetí stranou, zavazuje se Poskytovatel neprodleně poskytnout součinnost a přiměřenou reakci k jejich ochraně a nápravě, která se od něj dá rozumně očekávat.

- 4.6. Poskytovatel je povinen udržovat práva z patentu a užitného vzoru v platnosti po dobu platnosti smlouvy v souladu s § 2359 odst. 2 občanského zákoníku. Takto vzniklé náklady je Poskytovatel či jím pověřený patentový zástupce následně oprávněn přeučtovat Nabyvateli, a to v souladu s odst. 3.6. této smlouvy.
- 4.7. Poskytovatel je povinen zajistit zapsání licenční smlouvy do příslušného rejstříku Úřadu průmyslového vlastnictví dle § 14 odst. 2 a § 69 zákona č. 527/1990 Sb., o vynálezech a zlepšovacích návrzích, v platném znění a dle § 20 odst. 2 zákona č. 478/1992 Sb., o užitných vzorech.
- 4.8. Poskytovatel je povinen zajistit zveřejnění této smlouvy v registru smluv vedeném Ministerstvem vnitra ČR v souladu se zákonem č. 340/2015 Sb., vyžadují-li to ustanovení tohoto zákona. Poskytovatel je povinen Nabyvatele o zveřejnění této smlouvy v registru neprodleně písemně informovat.

5. Práva a povinnosti Nabyvatele

- 5.1. Nabyvatel se zavazuje vyvinout přiměřené úsilí vedoucí k prodeji Licencovaných produktů, které je popsáno v příloženém harmonogramu plánovaných aktivit s konkrétními měřitelnými milníky Nabyvatele. Harmonogram tvoří přílohu IV. této smlouvy.
- 5.2. Nabyvatel se zavazuje nejpozději do 18 měsíců od podpisu licenční smlouvy, v souladu s výše uvedeným harmonogramem, zajistit uvedení Licencovaných produktů na trh.
- 5.3. Pokud nebude dodržena lhůta pro uvedení Licencovaných produktů na trh dle bodu 5.2. této smlouvy bez objektivního doložitelného důvodu, který musí být ze strany Poskytovatele výslovně akceptován jako oprávněný, výše Minimálního licenčního poplatku pro rok bezprostředně následující po dvouleté lhůtě od nabytí účinnosti smlouvy bude činit 250 000 Kč (dvě stě padesát tisíc korun českých).
- 5.4. Nabyvatel se zavazuje poskytnout Poskytovateli bezplatně pro vědecké účely výsledky zkoušek Licencovaného produktu realizovaných Nabyvatelem.
- 5.5. Nabyvatel je oprávněn za účelem žádosti o získání dotace či jiné finanční podpory zpřístupnit poskytovateli dotace informace o obsahu této smlouvy a plánu svých zamýšlených aktivit, obojí pouze v rozsahu nezbytném pro daný účel žádosti a s ohledem na oprávněné zájmy Poskytovatele.
- 5.6. Nabyvatel poskytne úhradu a odškodnění Poskytovateli v souvislosti se všemi nároky, požadavky, závazky, výdaji (včetně nákladů právního zastoupení), které Poskytovateli vzniknou z důvodu nebo ve spojení s jakýmkoliv osobním zraněním (včetně smrti) a poškozením majetku, které způsobí nebo k nimž zcela nebo zčásti přispěje Nabyvatel, s ním Propojená osoba, Nabyvatel podlicence, jejich smluvní partneři nebo zástupci při

- Komericializaci, nebo označování libovolného Licencovaného produktu nebo používání Licencovaných patentů a Licencované technologie v praxi.
- 5.7. Nabyvatel je dále povinen zajistit, že výroba, prodej a veškeré další činnosti související s Komericializací dle této Smlouvy budou probíhat na pracovišti certifikovaném pro takovou činnost, po obdržení příslušných povolení a za dodržení příslušných právních předpisů, bezpečnostních i odborných standardů. Poskytovatelé nenesou odpovědnost za jakékoliv porušení příslušných právních předpisů, práv třetích osob ani za případnou újmu vzniklou v souvislosti s činností Nabyvatele při komericializaci.
- 5.8. V případě, že bude mít Nabyvatel zájem poskytnout třetí osobě sublicenční oprávnění k využití Licencované technologie, popřípadě změnit podmínky dříve poskytnuté a schválené sublicence, předloží Poskytovateli ke schválení návrh sublicenční smlouvy včetně všech jejích podmínek, popř. změn či dodatků, před jejím uzavřením. Pokud ve lhůtě 3 (tři) týdnů od poskytnutí návrhu sublicenční smlouvy Poskytovatel písemně nesdělí Nabyvateli svůj nesouhlas nebo se nevyjádří, má se za to, že Poskytovatel souhlasí s uzavřením sublicenční smlouvy nebo její úpravou za uvedených podmínek. Nabyvatel poskytne Poskytovateli vždy jedno vyhotovení každé uzavřené sublicenční smlouvy včetně všech jejích příloh. Poskytovatel se zavazuje, že nebude Nabyvateli bezdůvodně bránit v poskytování sublicence, pokud sublicence bude umožňovat kontrolu, výpočet a stanovení výše úplaty stejným způsobem jako je tomu u této Smlouvy, a pokud bude obsahovat zákaz udělení další sublicence Nabyvatelem sublicence třetí osobě.
- 5.9. Výše uvedené povinnosti Nabyvatele se týkají všech personálně nebo ekonomicky propojených nebo ovládaných společností či Nabyvatele ovládajících společností, jako by byly účastníky této smlouvy sami. Pro účely definice propojených osob bude použito ustanovení § 23 odst. 7 zákona č. 586/1992 Sb., o daních z příjmů, ve znění pozdějších předpisů.

6. Ostatní ustanovení

- 6.1. Smluvní strany jsou povinny vzájemně jedna druhou informovat o všech skutečnostech, které mají či mohou mít významný vliv na plnění předmětu této smlouvy.
- 6.2. Smluvní strany se zavazují uchovávat v tajnosti veškeré důvěrné informace, které získají od druhé Smluvní strany v rámci plnění předmětu této smlouvy včetně informací o dalších vývojových, výrobních a obchodních záměrech Nabyvatele. Tato povinnost trvá neomezeně i po ukončení této smlouvy.
- 6.3. V případě, že jedna ze Smluvních stran zveřejní informace, které byla povinna uchovávat v tajnosti, je druhá strana oprávněna požadovat zaplacení škody, která jí zveřejněním těchto informací vznikla.

7. Platnost smlouvy a možnosti jejího ukončení

- 7.1. Tato smlouva se uzavírá do 31. 7. 2038. V případě že Nabyvatel nejpozději jeden rok před uplynutím této doby písemně neprojeví vůli ukončit tuto smlouvu, dojde k prodloužení doby platnosti této smlouvy na dobu neurčitou.
- 7.2. Platnost této Smlouvy může být ukončena písemnou dohodou stran, písemnou výpovědí, písemným odstoupením jedné ze stran nebo dle článku 7.1..

- 7.3. Poskytovatel je oprávněn od této Smlouvy písemně odstoupit pouze v případě, že Nabyvatel poruší hrubým způsobem podmínky této smlouvy a nedojde k jejich nápravě ani do 90 dnů od písemného upozornění Poskytovatele prokazatelně doručeného Nabyvateli. Porušení podmínek hrubým způsobem se rozumí porušení povinnosti uhradit jednorázový licenční poplatek dle bodu 3.2. této smlouvy a dále povinnost hradit pravidelné licenční poplatky definované v bodu 3.3. této smlouvy, dále povinnost uvedení Licencovaných produktů na trh dle bodu 5.2 této smlouvy a dále též využívání předmětu licence způsobem, který poškozuje či ohrožuje dobré jméno Poskytovatele. Skončí-li platnost Smlouvy odstoupením ze strany Poskytovatele, není Poskytovatel povinen vrátit Nabyvateli poměrnou část nákladů na patentovou ochranu dle odst. 3.6. této Smlouvy zaplacenou dopředu.
- 7.4. Nabyvatel je oprávněn od této Smlouvy písemně odstoupit pouze v případě, že Poskytovatel poruší hrubým způsobem podmínky této Smlouvy a k nápravě tohoto porušení nedojde ani do 90 dnů od písemného upozornění Nabyvatele prokazatelně doručeného Poskytovateli.
- 7.5. Platnost této Smlouvy může být písemně vypovězena ze strany Nabyvatele, a to pouze v případě, že již nebude mít dále zájem uvádět Licencovaný produkt coby výrobce na trh. Výpovědní doba činí šest měsíců a začíná běžet od prvního dne měsíce následujícího po měsíci, ve kterém byla výpověď prokazatelně doručena Poskytovateli.

8. Vyšší moc

- 8.1. Žádná ze stran není odpovědná druhé straně nebo nenese odpovědnost za porušení svých povinností ze smlouvy, pokud jsou tato porušení důsledkem války, válečného stavu, terorismu, revoluce, občanského povstání, stávků, epidemie, nehody, požáru, větru, povodně nebo jiného zásahu vyšší moci nebo jiného důvodu mimo běžnou kontrolu ovlivněné strany, které nemohla strana ovlivněná takovými okolnostmi rozumně předpokládat. Strana ovlivněná takovými okolnostmi musí bez prodlení písemně informovat druhou stranu o důvodech porušení nebo zpoždění plnění svých povinností ("Zpoždění") a o skončení těchto okolností. V případě Zpoždění trvajících déle než 4 týdny má druhá strana právo ukončit smlouvu okamžitě písemným oznámením.

9. Závěrečná ustanovení

- 9.1. Tuto smlouvu lze měnit a doplňovat pouze písemnými dodatky, které jsou oboustranně podepsány.
- 9.2. Ostatní záležitosti výše neuvedené se řídí ustanovením § 2358 a násl. zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku, v platném znění, a ostatními právními předpisy České republiky.
- 9.3. Případné spory vzešlé z této smlouvy nebo související s otázkami její platnosti, účinnosti či vymahatelnosti se obě smluvní strany budou snažit vyřešit smírně. Jestliže se smluvní strany neshodnou na oboustranně přijatelném smírném řešení do třiceti dnů od data, kdy spor vznikl, je kterákoli ze smluvních stran oprávněna takový spor předložit k řešení věcně a místně příslušnému soudu České republiky.
- 9.4. Tato smlouva je sepsána ve čtyřech stejnopisech, z nichž každá strana obdrží po jednom vyhotovení, a dva stejnopisy budou Poskytovatelem předány Úřadu průmyslového vlastnictví ke splnění povinnosti dle článku 4.10.

- 9.5. Tato smlouva nabývá platnosti okamžikem jejího podpisu oběma smluvními stranami a účinnosti k datu jejího zveřejnění v registru smluv dle článku 4.11. této smlouvy.
- 9.6. Pokud bude nebo se stane některé ustanovení této smlouvy neúčinné nebo neplatné, bude nahrazeno jinou účinnou úpravou a to tak, aby se nejvíce shodovalo se zamýšleným významem původního ustanovení. Ostatní ustanovení smlouvy tím nejsou dotčena.
- 9.7. Obě smluvní strany prohlašují, že tato smlouva je projevem jejich pravé a svobodné vůle a na důkaz dohody o všech článcích této smlouvy připojují své podpisy.

V Praze

20.4.2020

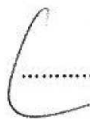
V Hradci Králové dne

20.1.2020



Dr. Jan Šaroch
GR-NANO, a.s.

FAKULTNÍ NEMOCNICE
HRADEC KRÁLOVÉ
ředitelství



prof. MUDr. Vladimír Palčka, CSc., dr. h. c.
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Příloha 1: související Know How Poskytovatele

Příloha 2 : kopie patentu č. 307717

Příloha 3 : kopie užitého vzoru č. 32359

Příloha 4: harmonogram plánovaných aktivit Nabývatel

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:
Klevi 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.

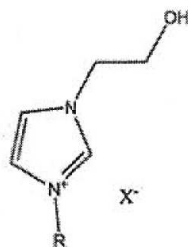
(73) Majitel patentu:
Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec
Králové, Nový Hradec Králové, CZ

(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., Gíraltovec, 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⁻.



(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 selektivnímu 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

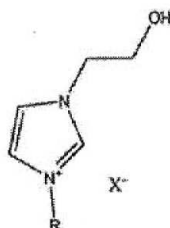
Syntéza či biologická účinnost sloučenin obsahující jiné heterocykly (např. chinolin, nebo isochinolin), jsou v literatuře také popsány. V literatuře byly popsány také substituované *N,N*-alkyl deriváty imidazolu (Kleyi PE a kol 2016).

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.

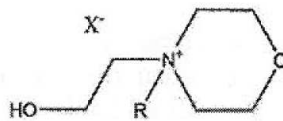
Kvartérní amoniové soli obecného vzorce I podle vynálezu mají výraznou virucidní aktivitu proti obaleným virům, s výhodou varicella-zoster viru.

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-

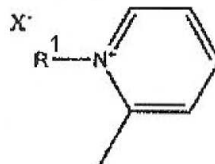
dodecyl-N-(2-hydroxyethyl)morfolinium-halogenid obecného vzorce II,



(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 vztahena 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 sensorických 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 vykázaly 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 (*Klebsiellapneumoniae*, *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 mikroba testované směsi resp. benzalkonium bromidu (Ajatinu) nebyl pozorován žádný nárůst bakterií.

Na rozdíl od této běžně užívanému benzalkonium bromidu (Ajatinu) vykázala dezinfekční kompozice podle vynálezu vysokou účinnost proti herpetickým virům (VZV) a sporulujícímu *Clostridium difficile*. Zatímco dezinfekční kompozice podle vynálezu snížila titer 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

5

Příklad 1

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

10

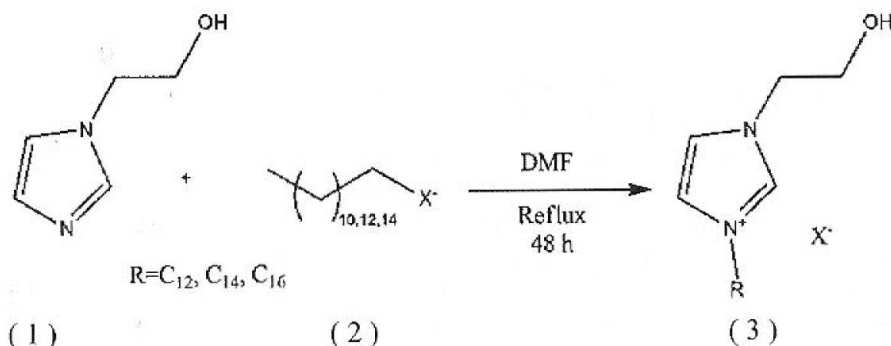


Schéma 1. Příprava 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenidu (3).

15

1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenidy **3** byly připraveny 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).

20

25

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	-

30

Výchozí sloučeniny byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (CZ) v nejvyšší dostupné čistotě. Rozpouštědla, 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.

35

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 25 typy mikroorganismů. Účinek této směsi je uveden níže v příkladu 4, kde je porovnán s komerčně dostupným prostředkem.

25

Tabulka 3

1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid	<i>C. difficile</i> (8 min expozice)	Test. Koncentrace / hmotn.% dezinfekce	VZV, 5 min expozice, (dTCID50)	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		

- 5 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

20 Kompozice I připravené dle příkladu 2 výše vykázala 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 (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.

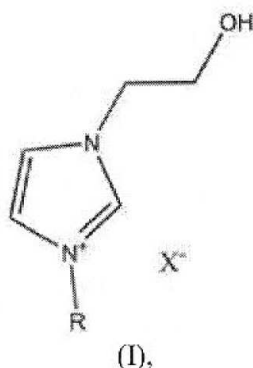
Na rozdíl od této běžně užívanému benzalkonium bromidu (Ajatinu) vykázala dezinfekční kompozice podle vynálezu vysokou účinnost proti herpetickým virům (VZV) a sporulujícímu

Clostridium difficile. Zatímco samotný derivát 1-(2-hydroxyethyl)-3-tetradecylimidazolium bromid snížil titer viru o 5 řádů po 5 minutové expozici, dezinfekční kompozice podle vynálezu snížila titer 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.

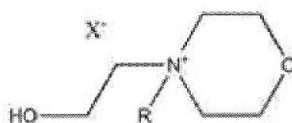
2. 1-Alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid podle nároku 1, kterým je 1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid, s výhodou 1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid.

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,

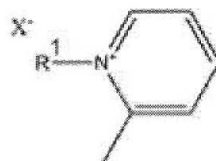


20

(II),

kde R je C₁₂ alkyl a X⁻ je anion vybraný ze skupiny obsahující Cl⁻, Br⁻ nebo I⁻.

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



30

kde R¹ je C₁₆ 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.

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

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

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 359

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A01N 33/12 (2006.01)
A01N 65/00 (2009.01)
A61K 31/01 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35224**
(22) Přihlášeno: **01.08.2018**
(47) Zapsáno: **26.11.2018**

- (73) Majitel:
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., Gíraltovec, SK
- (74) Zástupce:
Kania, Sedlák, Smola patentová a známková
kancelář, Mgr. Martina Dvořáková, Mendlovo
náměstí 907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

- (54) Název užitného vzoru:
**Kvarterní amoniová sůl a dezinfekční
kompozice jí obsahující**

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitného vzoru
splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

CZ 32359 U1

Kvarterní amoniová sůl, dezinfekční kompozice a jejich použití

Oblast techniky

5

Technické řešení 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 desinfekčních přípravků. Netýká se to jen odolnosti vůči antibiotikům, ale také obecně i odolnosti vůči běžně používaným desinfekčním přípravkům. Mluví se o tzv. multi-rezistentních kmenech, které jsou odolné vůči oběma skupinám antimikrobiálních činidel. Tento trend je výsledkem dlouhodobého používání antibiotik a desinfekčních přípravků, zvláště v nemocnicích, ve kterých jsou bakterie neustále vystaveny selektivnímu tlaku antibiotik a jsou schopné se stát vůči běžným desinfekčním přípravkům rezistentními.

20

Odolnost vůči antimikrobiálním sloučeninám je buď primární, vyjádřená absencí (nebo nedostupností) cílové struktury pro desinfekční 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 desinfekčních přípravků přísným dodržováním kompletních desinfekčních programů. Klíčovým aspektem je pravidelné obměňování antibiotik a desinfekčních 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 desinfekční 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 desinfekční 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).

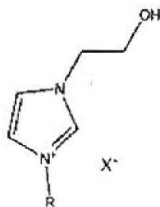
50

55

Podstata technického řešení

Předmětem technického řešení je nová kvarterní amoniová sůl, vyvinutá jako desinfekční činidlo aplikovatelné vůči široké škále původců nemocničních bakteriálních a plísňových infekcí a zároveň omezující vznik rezistence vůči desinfekčním 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),

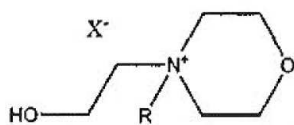
kde R C₁₂ – C₁₆ alkyl, X⁻ je anion vybraný ze skupiny obsahující Cl⁻, Br⁻ nebo I⁻, případně jiný vhodný anion, zajišťující dostatečnou rozpustnost pro potřeby aplikace. Kvarterní amoniové soli obecného vzorce I podle technického řešení jsou účinnými desinfekčními činidly proti celé řadě mikroorganismů 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.

Kvarterní amoniové soli obecného vzorce I podle technického řešení 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.

Kvarterní amoniová sůl podle technického řešení, kde R je s výhodou C₁₄ alkyl, s výhodou 1-(2-hydroxyethyl)-3-tetradecylimidazolium bromid vykazují srovnatelnou nebo lepší desinfekční účinnost ve srovnání s běžně dostupnou a hojně používanou solí benzyldodecyldimethylamonium (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)).

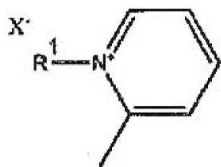
Dalším provedením podle technického řešení je desinfekční kompozice obsahující kvarterní amoniové soli, jejíž podstatou je, že buď obsahuje 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid podle obecného vzorce I, s výhodou kvarterní sůl 1--tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid, výhodněji 1-tetradecyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid podle technického řešení, nebo jeho kombinaci s alespoň jednou kvarterní 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⁻, případně jiný vhodný anion, zajišťující dostatečnou rozpustnost pro potřeby aplikace.

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

V případě, že desinfekční kompozice podle technického řešení řešení 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 kvarterních amoniových solí obecných vzorců II nebo III nebo jejich kombinaci je celková koncentrace kvarterních amoniových solí v rozsahu 0,001 % hmotn. až 1 % hmotn., s výhodou 0,01 % hmotn. až 0,1 % hmotn.

% Hmotn. kvarterních amoniových solí podle technického řešení jsou vztažena k celkové hmotnosti desinfekční kompozice podle technického řešení.

Také desinfekční kompozice podle technického řešení vykazaly dle provedených testů vysokou desinfekční 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*, *Aureobcisidium melanogemim*, *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 technického řešení jsou účinné proti vysoce odolným mikroorganismům jako jsou *Asperigillus fumigatus* či *Clostridium difficile*, které běžně způsobují nemocniční infekce. Desinfekční účinnost připravených kompozic podle technického řešení 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
 5 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 amoniiovými solemi v přípravcích podle technického řešení řešení 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 technického řešení řešení, 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-
 15 -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 technického řešení další pomocné látky. Pomocné látky jsou vybrány ze skupiny obsahující
 25 parfémů (zlepšení sensorických 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 kvarterní amoniiové soli lépe rozpustné než ve vodě. Takovéto kompozice je možné použít lc dezinfekci
 30 skla, kovů nebo odolných plastů, jako je PVC apod.

Kompozice podle technického řešení 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
 35 testována na kvasinkách (*Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*) a gram-pozitivních (*Methicillin-resistantní Staphylococcus aureus* (MRSA neboli Zlatý *Staphylococcus*), enterokoky) a gram-negativních (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakteriích při koncentraci směsí 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 mikroba testované směsi, resp. benzalkonium bromidu (Ajatinu) nebyl
 40 pozorován žádný nárůst bakterií.

Na rozdíl od této běžně užívanému benzalkonium bromidu (Ajatinu) vykazala dezinfekční kompozice podle technického řešení řešení vysokou účinnost proti herpetickým virům (VZV) a sporulujícímu *Clostridium dificile*. Zatímco dezinfekční kompozice podle technického řešení řešení snížila titr viru o cca 4 řády po 5minutové expozici při koncentraci 0,01 % hmotn., v případě benzalkonium bromidu (Ajatinu) byl pokles pouze cca 2 řády. V případě zamýšleného použití technického řešení řešení v koncentraci 0,1 % hmotn. lze očekávat ještě vyšší účinnost. Dále dezinfekční kompozice podle technického řešení řešení prokázala vyšší účinnost proti sporulujícímu *Clostridium dificile* 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 technického řešení řešení, však redukovala výskyt této houby oproti kontrole při 5minutové expozici a koncentraci 0,1 % hmotn.
 55

Tabulka 2.

surovina	Kompozice I Množství (mg)	Množství (mg)	Množství (mg)
1-(2-hydroxyethyl)-3-tetradecylimidazolium bromid	33	50	50

5

Tabulka 2 (část a)

N-dodecyl-N-(2-hydroxyethyl)morfoliniumbromid	33	50	-
1-hexadecyl-2-methylpyridinium-bromid	33	-	50
Voda	100000	100000	10000

Tabulka 2(část b)

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

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 5minutové expozici snížil titer VZV o 5 řádů, což výrazně předčilo komerčně dostupné benzalkoniové soli. Obdobně, derivát C14 se jevil jako nejučinnější proti vláknitým houbám (viz 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 komerčně dostupným prostředkem.

15

20

Tabulka 3

1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid	<i>C. difficile</i> (8 mín expozice)	Test. Koncentrace / hmotn. % dezinfekce	VZV, 5 min expozice, (dTCID ₅₀)	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		

25

Kontrola (90% etanol) je nárůst *C. difficile*, kdy kultura byla vystavená pouze 90% etanolu po

dobu 40min 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, +, ++, +++.

5

Tabulka 4

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)

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

10

Tabulka 5

1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid / MIC (μM)	<i>Staphylococcus aureus (C1947)</i>	<i>Methicilin rezistentní Staphylococcus aureus (C1923)</i>	<i>Vankomycin rezistentní Enterococcus</i>	<i>Escherichia coli (A1235)</i>	<i>Klebsiella Ext. Spectrum B-lactamase negativní (C1950)</i>
---	--------------------------------------	---	--	---------------------------------	---

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

15

Tabulka 5 (pokračování)

1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid / MIC (µM)	<i>Klebsiella Ext. Spectrum B-lactamase pozitivní (C1934)</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa multirezist. (A1245)</i>	<i>Yersinia bercovieri (CNCTC 6230)</i>	<i>Acinetobacter baumannii (J3474)</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia (J3552)</i>
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

- 5 Příklad 4: Mikrobiologické ověření účinnosti kompozice podle technického řešení a srovnání s komerčně dostupným přípravkem

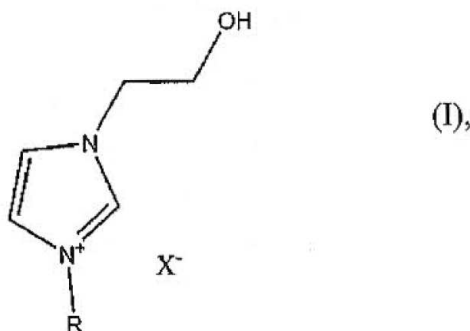
Kompozice I připravené dle Příkladu 2 výše vykazala v testech silnou dezinfekční účinnost proti
 10 testovaným mikrobům ze skupiny gramnegativních a grampozitivních bakterií a patogenních hub, které jsou častým původcem nozokomiálních onemocnění. Dezinfekční účinnost byla testována na kvasinkách (*Candida knisei*, *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. benzalkonium bromidu (Ajatinu) nebyl pozorován žádný nárůst bakterií.

Na rozdíl od této běžně užívanému benzalkonium bromidu (Ajatinu) vykazala dezinfekční kompozice podle technického řešení vysokou účinnost proti herpetickým virům (VZV)
 20 a sporulujícímu *Clostridium difficile*. Zatímco samotný derivát 1-(2-hydroxyethyl)-3-tetradecylimidazolium bromid snížil titer viru o 5 řádů po 5 minutové expozici, dezinfekční kompozice podle technického řešení snížila titer 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 technického řešení v koncentraci 0,1 % hmotn. lze očekávat ještě
 25 vyšší účinnost. Dále dezinfekční kompozice podle technického řešení 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 technického řešení, však redukovala výskyt této houby oproti kontrole při
 30 5minutové expozici a koncentraci 0,1 % hmotn.

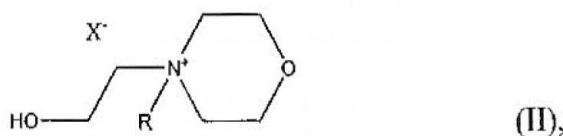
Dále byly dále provedeny testy kožní dráždivosti. Negativní výsledek kožní dráždivosti je nezbytnou podmínkou pro jejich praktické využití. Dezinfekční směsi byly hodnoceny ve dvou
 35 následných krocích, vyžadovaných platnou legislativou. Proběhlo testování dle OECD 439 - provedení testu „In vitro skin 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 vykazala lepší bezpečnost než komerčně dostupný standard benzalkonium bromidu (Ajatin) 0,1 % hmotn.,
 40 který po 60minutové expozici vedl ke cca 50 % úmrtí kožních buněk v tomto modelu.

NÁROKY NA OCHRANU

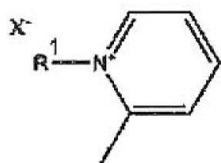
- 5 **1.** 1-Alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid, pro použití jako dezinfekční činidlo obecného vzorce I



- 10 kde R je C₁₂ – C₁₆ alkyl, X⁻ je anion vybraný ze skupiny obsahující Cl⁻, Br⁻ nebo I⁻.
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.
- 15 **3.** 1-Alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid podle nároku 1 nebo nároku 2 jako dezinfekční činidlo proti virům a mikroorganismům 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*.
- 25 **4.** Desinfekční kompozice obsahující kvarterní amoniové soli, **vyznačující se tím**, že obsahuje 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3.
- 30 **5.** Desinfekční kompozice podle nároku 4, **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..
- 35 **6.** Desinfekční kompozice podle nároku 4 nebo 5, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje alespoň jednu kvarterní amoniovou sůl vybranou ze skupiny zahrnující N-dodecyl-N-(2-hydroxyethyl)morfolinium-halogenid obecného vzorce II,



- 40 kde R je C₁₂ alkyl a X⁻ je anion vybraný ze skupiny obsahující Cl⁻, Br⁻ nebo I⁻,
a/nebo 1-hexadecyl-2-methylpyridinium-halogenid obecného vzorce III,



(III),

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

5

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

10

8. Desinfekční kompozice podle nároku 6 nebo 7, **vyznačující se tím**, že celková koncentrace kvarterních amoniiových solí je v rozsahu 0,001 % hmotn. až 1 % hmotn., s výhodou 0,01 % hmotn. až 0,1 % hmotn.

15

9. Desinfekční kompozice podle kteréhokoliv z nároků 4 až 8, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje alespoň jednu pomocnou látku vybranou ze skupiny obsahující parfém, gelotvorná činidla, adhezivní činidla, barviva, nebo rozpouštědla.

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