

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 038460

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.31
- (21) Номер заявки
202000010
- (22) Дата подачи заявки
2018.06.07
- (51) Int. Cl. C07D 491/056 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

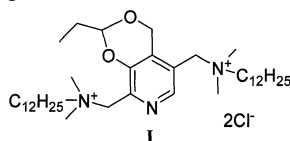
(54) АНТИСЕПТИЧЕСКОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

- (31) 2017126302 (56) RU-C1-2607522
RU-C1-2561281
- (32) 2017.07.24
- (33) RU
- (43) 2020.02.29
- (86) PCT/RU2018/000379
- (87) WO 2019/022637 2019.01.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"ТАТХИМФАРМПРЕПАРАТЫ";
ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "КАЗАНСКИЙ
(ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ" (RU)

(72) Изобретатель:
Штырлин Юрий Григорьевич,
Штырлин Никита Валерьевич,
Стрельник Алексей Дмитриевич,
Сапожников Сергей Витальевич,
Иксанова Альфия Габдулахатовна,
Казакова Рената Рувшановна,
Агафонова Мария Николаевна (RU)

(57) Изобретение относится к химии органических гетероциклических соединений, а именно к новой четвертичной аммониевой соли, содержащей фрагмент производного витамина B6 формулы I, проявляющей антибактериальные, антимикотические, противовирусные и антипротозойные свойства. Соединение может найти применение в медицине и ветеринарии.



Изобретение может найти применение в медицине и ветеринарии.

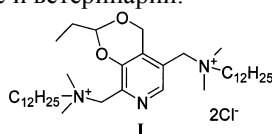
B1

038460

038460

B1

Изобретение относится к химии органических гетероциклических соединений, а именно к новой четвертичной аммониевой соли, содержащей фрагмент производного витамина В₆ формулы I, проявляющей антибактериальные, противогрибковые, противовирусные и антипротозойные свойства. Соединение может найти применение в медицине и ветеринарии.



Профилактика и лечение инфекционных заболеваний в настоящее время является одной из важнейших задач здравоохранения. При этом их эффективная терапия возможна лишь при комплексном использовании антибиотиков и антисептических лекарственных средств [Морозова Н.С. Современный взгляд на роль антисептиков в профилактике и лечении гнойно-септических осложнений у пациентов хирургического профиля. Украинский журнал экстремальной медицины імені Г.О. Можаява, 2012 - Т. 13, № 2; с. 6-9].

Необходимым требованием к антисептикам является широта спектра их действия: они должны обладать антибактериальной, противогрибковой, противовирусной и противопаразитарной активностью [Фармакология: учебник/Под ред. проф. Р.Н. Аляутдина. - 4-е изд., перераб. и доп. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010; с. 832]. Вследствие их широкого спектра действия антисептики применяются по многим медицинским показаниям.

Четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) являются одним из важнейших классов антисептических средств и имеют широкую область применения, в частности в терапии местных гнойно-воспалительных процессов, обработке неповрежденной кожи перед операциями, консервировании глазных капель, инъекционных растворов, зубных паст, косметических средств, дезинфекции и очистке поверхностей. Современные ЧАС характеризуются широким спектром противомикробной активности по отношению к грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам, грибам, вирусам и простейшим. Механизм антибактериального действия ЧАС заключается в их адсорбции и проникновении через клеточную стенку бактерий с последующим взаимодействием с фосфолипидами цитоплазматической мембраны, что приводит к полной структурной дезорганизации и последующей гибели бактериальной клетки [McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. Clinical Microbiology Reviews. -1999; V. 12(1); P. 147-179].

Недостатками используемых ЧАС являются неэффективность в отношении спор [Шандала М.Г. Перспективы и проблемы современной дезинфектологии. Журн. Дезинфекционное дело. - 2002, №4; с. 13-19] и простых вирусов [Райнбабен, Фридрих фон. Основы противовирусной дезинфекции: перевод с немецкого языка. -Москва: Самарово: Летний сад. - 2014; с. 525], а также недостаточная активность по отношению к грамотрицательным бактериям, микобактериям и грибам. Также следует отметить недостаточную изученность применяемых антисептиков [Federal Register/Vol. 81, No. 126/Thursday, June 30, 2016/Proposed Rules] и их высокую токсичность [Rasmussen C.A., Kaufman P.L., Kiland J.A. Benzalkonium Chloride and Glaucoma. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics.- 2014; V. 30; P. 163-169].

Среди лекарственных препаратов, содержащих фрагменты четвертичных аммониевых солей, следует выделить:

Мирамистин ((бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммонийхлорид моногидрат) - разработанный в СССР антисептик, обладающий широким спектром бактерицидного действия в отношении грамположительных (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae* и др.), грамотрицательных (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. и др.), аэробных и анаэробных бактерий, патогенных грибов и вирусов, включая клинические штаммы с полирезистентностью к антибиотикам [Регистр лекарственных средств России РЛС Энциклопедия лекарств. -20-й вып. Гл.ред. Г.Л. Вышковский. - М.:ЛИБРОФАРМ, 2011; с. 1368]. Применяется в профилактике нагноений и лечении гнойных ран, лечении и профилактике кандидозов кожи и слизистых оболочек, комплексном лечении острых и хронических отитов, лечении и профилактике инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта (стоматитов, гингивитов, пародонтитов, периодонтитов), индивидуальной профилактике заболеваний, передаваемых половым путем (сифилиса, гонореи, хламидиоза, генитального герпеса и др.) [Блатун Л.А. Мирамистин в комплексной программе борьбы с госпитальной инфекцией в хирургическом стационаре//В сб.: Мирамистин: применение в хирургии, травматологии и комбустиологии. М. - 2006; с. 27-33.; И.М. Макеева, Е.В. Боровский, М.В. Матавкина, Е.А. Бровенко. Применение препарата Мирамистин в комплексном лечении заболеваний слизистой оболочки рта. Фарматека. - 2013; №3; с. 1].

Флуомизин (хлорид деквалиния) - антисептик широкого спектра действия, активен в отношении большинства грамположительных бактерий *Streptococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., анаэробов *Peptostreptococcus* (группы D), грибов рода *Candida* (*Candida tropicalis*, *Candida aMXicans*, *Candida glabrata*), грамотрицательных бактерий *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Serratia* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., и простейших (*Trichomonas vaginalis*). Используется при бактериальном вагинозе, кандидозе кожи, ногтевых валиков, слизистой оболочки полости рта, воспалительных процес-

сах в полости рта и глотки (тонзиллит, стоматит, в т.ч. афтозный, глоссит, фарингит) [Справочник Видаль "Лекарственные препараты в России". https://www.vidal.ru/drugs/fluomisin__22520].

Бензалкония хлорид (алкилдиметил(фенилметил)аммония хлорид) - антисептическое средство, активное в отношении грамположительных (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp, *Streptococcus pneumoniae* и др.), грамотрицательных (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. и др.) и анаэробных бактерий, грибов и плесеней. Применяется при первичной и первично-отсроченной обработке ран, профилактике вторичного инфицирования ран госпитальными штаммами микроорганизмов, бактериальном вагинозе, дренировании костных полостей после операции при остеомиелите [Справочник Видаль "Лекарственные препараты в России". https://www.vidal.ru/drugs/dettol_benzalkonium_chloride_30527].

Следует отметить, что описанные выше лекарственные препараты, по мнению заявителя, не могут рассматриваться в качестве аналогов к заявленному изобретению вследствие того, что они не совпадают с заявляемым соединением по химической структуре, хотя и обладают антибактериальной, антимикотической, противовирусной и антипротозойной активностью (совпадают по назначению) сопоставимой с заявленным изобретением в большей или меньшей степени.

Заявленное техническое решение поясняется фиг. 1,2 и шестнадцатью (16) таблицами, приведенными в тексте описания.

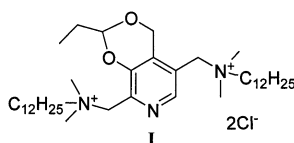
На фиг. 1 представлен сравнительный анализ антибактериальной активности соединения I, бензалкония хлорида и мирамистина в отношении клеток грамположительных бактерий, погруженных в матрикс биопленки.

На фиг. 2 представлен сравнительный анализ антибактериальной активности соединения I, бензалкония хлорида и мирамистина в отношении клеток грамотрицательных бактерий, погруженных в матрикс биопленки.

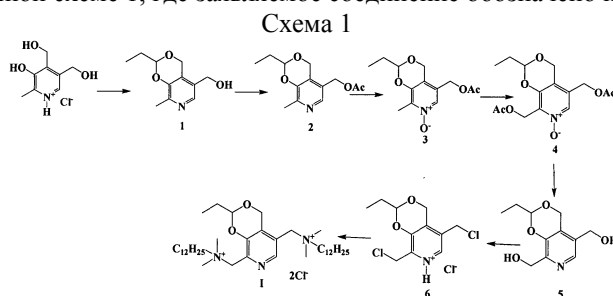
Задачей изобретения является новое соединение, обладающее высокой антибактериальной, антимикотической, противовирусной и антипротозойной активностью, сопоставимой с существующими антисептиками, но при этом существенно меньшей токсичностью.

Техническим результатом заявленного изобретения является получение нового соединения формулы I, содержащего в своем составе как фрагмент природного соединения (витамина B₆), так и четвертичный аммониевый фрагмент.

Задача решается, и указанный технический результат достигается получением заявляемого нового производного витамина B₆ формулы I



согласно нижеприведенной схеме 1, где заявляемое соединение обозначено номером I.



Характеристики нового соединения приведены далее в примерах конкретного выполнения. Структура полученного соединения подтверждена методами масс-спектрометрии, ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии. Спектры ЯМР регистрировали на приборе AVANCE-400 (Bruker, Германия). Химический сдвиг определялся относительно сигналов остаточных протонов дейтерированных растворителей (¹H и ¹³C). Температуры плавления определялись с помощью прибора Stanford Research Systems MPA-100 OptiMelt. Контроль за ходом реакций и чистотой соединений проводили методом ТСХ на пластинах Sorbfil Plates. HRMS-эксперимент был проведен с использованием масс-спектрометра TripleTOF 5600, AB Sciex (Германия) из раствора в метаноле методом ионизации - турбоионный спрей (TIS) - при энергии столкновения с молекулами азота 10 eV.

Пример 1. Получение 5,8-(бис(метилден(N,N-диметил-N-додециламмоний))-2-этил-4Н-[1,3]диоксипиридиний дихлорида (I)

Стадия 1: Получение 5-(гидроксиметил)-2-этил-8-метил-4Н-[1,3]диоксипиридина (1)

В 500 мл толуола кипятили 28.1 г (146.0 ммоль) моногидрата п-толуолсульфокислоты с насадкой Дина-Старка в течении 2 ч. Далее раствор охлаждали до комнатной температуры и добавляли 30.0 г (146.0 ммоль) гидрохлорида пиридоксина и 15.0 мл (209.5 ммоль) пропионового альдегида. Реакционную смесь кипятили 8 ч с насадкой Дина-Старка. Далее растворитель отгоняли в вакууме. К осадку добавляли

раствор 18.0 г (450.0 ммоль) гидроксида натрия в 100 мл воды при перемешивании. Далее, водную часть промывали 500 мл хлороформа, органическую часть отделяли, высушивали в вакууме и перекристаллизовывали из 100 мл толуола. Выход 17.0 г (56 %), бесцветное кристаллическое вещество, т.пл. 111-112°C.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6) δ , м.д.: 1.00 т (3H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 7.5$ Гц, CH_3CH_2), 1.77-1.83 кв д (2H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 7.5$ Гц, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 5.0$ Гц, CH_3CH_2), 2.30 с (3H, CH_3), 4.38 д (2H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 4.3$ Гц, CH_2OH), 4.95 с (2H, CH_2O), 5.06 т (1H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 5.0$ Гц, CHC_2H_5), 5.18 т (1H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 4.3$ Гц, CH_2OH), 7.93 с (1H, $\text{CH}_{\text{прр}}$).

Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, DMSO-d_6) δ , м.д.: 7.78 с (CH_3CH_2), 18.16 с (CH_3), 27.06 с (CH_3CH_2), 58.21 с (CH_2O), 63.43 с (CH_2O), 100.02 с (CHC_2H_5), 126.88 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 130.94 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 138.95 с ($\text{CH}_{\text{прр}}$), 145.09 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 146.91 с ($\text{C}_{\text{прр}}$).

Масс-спектр (HRMS-ESI): Найдено $[\text{M}+\text{H}]^+$ 210.1125, $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_3$. Вычислено $[\text{M}+\text{H}]^+$ 210.1130.

Стадия 2: Получение 5-(ацетоксиметил)-2-этил-8-метил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридина (2)

К раствору 10.0 г (47.8 ммоль) соединения 1, 7.64 мл (55.1 ммоль) триэтиламина в 150 мл дихлорметана при перемешивании по каплям добавляли раствор 3.74 мл (52.6 ммоль) хлористого ацетила в 30 мл дихлорметана в течение 20 мин. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре 3 ч. Реакционную смесь промывали последовательно 200 мл 5 % раствора гидрокарбоната натрия и 100 мл воды. Органическую часть отделяли и высушивали в вакууме. Выход 12.0 г (количественный), бесцветное маслообразное вещество.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 1.08 т (3H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 7.5$ Гц, CH_3CH_2), 1.89-1.93 м (2H, CH_3CH_2), 2.07 с (3H, CH_3), 2.44 с (3H, CH_3), 4.91, 4.95 АВ-система (2H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 16.0$ Гц, CH_2), 4.97 с (2H, CH_2), 4.97 т (1H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 5.0$ Гц, CHC_2H_5), 8.04 с (1H, $\text{CH}_{\text{прр}}$).

Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 7.94 с (CH_3CH_2), 18.42 с (CH_3), 20.91 с (CH_3), 27.64 с (CH_3CH_2), 61.16 с (CH_2O), 64.07 с (CH_2O), 100.95 с (CHC_2H_5), 124.85 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 127.75 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 140.78 с ($\text{CH}_{\text{прр}}$), 147.95 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 148.34 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 170.58 с ($\text{C}(\text{O})$).

Стадия 3: Получение 5-(ацетоксиметил)-2-этил-8-метил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридина N-оксида (3)

К раствору 12.0 г (47.8 ммоль) соединения 2 в 300 мл дихлорметана добавляли 19.2 г (66.8 ммоль) 60% м-хлорпербензойной кислоты и перемешивали без доступа света при комнатной температуре 24 ч. Затем реакционную смесь последовательно промывали 10% раствором сульфита натрия (2*150 мл), 5% раствором гидрокарбоната натрия (2*150 мл) и водой (75 мл). Отделяли органический слой и растворитель удаляли в вакууме. Выход продукта 11.91 г (93%), бесцветные кристаллы.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 1.07 т (3H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 7.5$ Гц, CH_3CH_2), 1.89-1.93 м (2H, CH_3CH_2), 2.10 с (3H, CH_3), 2.41 с (3H, CH_3), 4.88 с (2H, CH_2), 4.89 с (2H, CH_2), 4.99 т (1H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 5.0$ Гц, CHC_2H_5), 7.98 с (1H, $\text{CH}_{\text{прр}}$).

Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 7.75 с (CH_3CH_2), 10.21 с (CH_3), 20.71 с (CH_3), 27.41 с (CH_3CH_2), 59.88 с (CH_2O), 63.76 с (CH_2O), 101.50 с (CHC_2H_5), 117.89 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 126.71 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 132.06 с ($\text{CH}_{\text{прр}}$), 139.29 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 149.52 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 170.16 с ($\text{C}(\text{O})$).

Стадия 4: Получение 5,8-бис(ацетоксиметил)-2-этил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридина (4)

Раствор 11.9 г (44.6 ммоль) соединения 3 в 40 мл (424 ммоль) уксусного ангидрида и 60 мл дихлорметана нагревали в течение 6 ч при 50°C. Затем растворитель удаляли в вакууме, а оставшееся масло растворяли в дихлорметане. Полученный раствор последовательно промывали 5% раствором гидрокарбоната натрия (150 мл) и водой (100 мл). Отделяли органический слой и растворитель удаляли в вакууме. Продукт без дальнейшей очистки использовали в следующей стадии. Выход продукта 13.5 г (97%), черное маслообразное вещество.

Стадия 5: Получение 5,8-бис(гидроксиметил)-2-этил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридина (5)

13.5 г (43.7 ммоль) соединения 4 растворяли в 140 мл этанола. К полученной смеси добавляли раствор 3.48 г (87.0 ммоль) гидроксида натрия в 30 мл воды. Раствор перемешивали 1 час при 50°C, подкисляли соляной кислотой до pH = 6.5 и отгоняли растворитель в вакууме. Сухой остаток заливали 150 мл воды и кипятили 15 минут. Нерастворившийся смолообразный осадок отфильтровывали при 80°C, а растворитель концентрировали до 80 мл и оставляли в холодильнике на 12 ч. Выпавший осадок отфильтровывали. Выход продукта 3.7 г (38%), коричневое кристаллическое вещество.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6) δ , м.д.: 1.00 т (3H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 7.5$ Гц, CH_3CH_2), 1.78-1.82 м (2H, CH_3CH_2), 4.42 д (2H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 4.2$ Гц, CH_2OH), 4.48 д (2H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 5.6$ Гц, CH_2OH), 4.86 т (1H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 5.6$ Гц, CH_2OH), 4.97 с (2H, CH_2), 5.07 т (1H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 5.0$ Гц, CH_2OH), 5.23 т (1H, $^3\text{J}_{\text{H-H}} = 4.8$ Гц, CHC_2H_5), 8.04 с (1H, $\text{CH}_{\text{прр}}$).

Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, DMSO-d_6) δ , м.д.: 7.68 с (CH_3CH_2), 26.94 с (CH_3CH_2), 58.14 с (CH_2), 59.02 с (CH_2), 63.44 с (CH_2), 100.02 с (CHC_2H_5), 127.37 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 132.24 с ($\text{CH}_{\text{прр}}$), 138.68 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 146.52 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 146.94 с ($\text{C}_{\text{прр}}$).

Стадия 6: Получение 5,8-бис(хлорметил)-2-этил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридиный хлорида (6)

В суспензию 3.7 г (16.4 ммоль) вещества 5 в 40 мл толуола добавляли по каплям 5.0 мл (68.9 ммоль) хлористого тионила. Реакционную смесь перемешивали при 70°C 2 ч. Добавляли к смеси 50 мл диэтилового эфира и отфильтровывали осадок. Выход продукта 4.66 г (95%), желтое кристаллическое вещество.

Стадия 7: Получение 5,8-(бис(метилен(N,N-диметил-N-додециламмоний))-2-этил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридиний дихлорида (I)

К раствору 1.1 г (13.1 ммоль) гидрокарбоната натрия в 40 мл воды при перемешивании добавляли 3.8 г (12.7 ммоль) соединения 6. Полученный осадок отфильтровывали и высушивали в вакууме. Полученные 2.9 г (11.1 ммоль) продукта (88% выход) растворяли в 50 мл этанола и добавляли 5.98 мл (22.2 ммоль) N,N-диметилдодециламина. Реакционную смесь перемешивали 8 ч при 70°C. Растворитель отгоняли в вакууме. Полученный остаток кипятили в 120 мл ацетона. После охлаждения до комнатной температуры осадок отфильтровывали и высушивали в вакууме. Выход 5.64 г (74%), белое кристаллическое вещество.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 0.84 т (6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Гц, $2\text{CH}_3\text{C}_{11}\text{H}_{22}$), 1.00 т (3H, $^3J_{\text{H-N}} = 7.5$ Гц, CH_3CH_2), 1.22-1.33 м (32H, 16CH_2), 1.70-1.84 м (6H, 3CH_2), 2.96 м (2H, CH_2), 3.29-3.32 м (12H, $4\text{CH}_2\text{N}^+$), 3.50-3.83 м (4H, $2\text{CH}_2\text{N}^+$), 4.69, 4.74 (AB-система, 2H, $^2J_{\text{HH}} = -13.6$ Гц, CH_2), 5.10, 5.55 (AB-система, 2H, $^2J_{\text{HH}} = -16.7$ Гц, CH_2), 5.11, 5.21 (AB-система, 2H, $^2J_{\text{HH}} = -13.6$ Гц, CH_2), 8.60 с (1H, $\text{CH}_{\text{прр}}$).

Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 8.01 с (CH_3), 14.21 с (CH_3), 22.77 с (CH_3), 23.18 с (CH_2), 26.46 с (CH_2), 27.57 с (CH_2), 29.43 с (CH_3), 29.46 с (CH_2), 29.53 с (CH_2), 29.62 с (CH_2), 29.70 с (CH_2), 31.99 с (CH_2), 49.60 с (CH_3N^+), 49.76 с (CH_3N^+), 51.11 с (CH_3N^+), 51.34 с (CH_3N^+), 61.94 с (CH_2), с 62.26 (CH_2), 65.60 с (CH_2), 65.66 с (CH_2N^+), 66.34 с (CH_2N^+), 102.04 с ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 122.92 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 134.60 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 136.87 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 146.54 с ($\text{C}_{\text{прр}}$), 150.88 с ($\text{C}_{\text{прр}}$).

Пример 2. Исследование антибактериальной активности четвертичной аммониевой соли I in vitro

Сравнительную оценку спектра антибактериального действия проводили на музейных и клинических штаммах грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов в соответствии с [Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890-04). Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 04.03.2004 г.].

Значение минимальной подавляющей концентрации (МПК) определяли методом серийных разведений на среде Мюллера-Хинтона с использованием 96-луночных стерильных планшетов. Готовили двукратные разведения исследуемых веществ в питательной среде. Конечные концентрации составляли 1-128 мкг/мл. Оценку роста культур проводили визуально, сравнивая рост микроорганизмов в присутствии изучаемых тест - соединений с ростом культуры без них. Наличие роста микроорганизма в бульоне (помутнение бульона) свидетельствует о том, что данная концентрация исследуемого препарата недостаточна, чтобы подавить его жизнеспособность. Первую наименьшую концентрацию исследуемого вещества (из серии последовательных разведений), где визуально не определяется бактериальный рост, считают минимальной подавляющей концентрацией. МПК определяли методом серийных разведений в бульоне с шагом 2, поэтому различия соседних разведений не считаются существенными. В каждом опыте присутствует положительный (бульон с растущей культурой) и отрицательный (бульон без растущей культуры) контроли.

Для определения МПК брали 10 мкл культуральной среды из тех лунок, в которых не наблюдался рост, и проводили посев на плотную среду Мюллера-Хинтона. Для приготовления инокулюма использовали чистую, суточную культуру грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, выросших на плотной питательной среде.

Питательная среда - бульон Мюллера-Хинтона, который готовили из сухих сред (Mueller Hinton broth, Acumedia, Baltimore), культивирование осуществляли на агаризованной среде Мюллера-Хинтона, включающей дополнительно 2% агара. Среды стерилизовали автоклавированием при 121°C в течение 15 мин. В стерильном изотоническом растворе хлорида натрия готовили взвесь микроорганизмов, доводя плотность инокулюма до 0.5 по стандарту МакФарланда ($1.5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл). Затем полученный инокулят разводили до концентрации 10^7 КОЕ/мл средой Мюллера-Хинтона. Инокулюм использовали в течение 15 мин после приготовления; чистоту бактериальных штаммов контролировали перед каждым экспериментом.

В лунки каждого планшета вносили по 100 мкл бульона Мюллера-Хинтона; в первую лунку вносили испытуемое вещество в концентрации 128 мкг/мл в объеме 100 мкл и последовательным двукратным разведением довели его концентрацию до 0.5 мкг/мл. Затем в каждую лунку вносили приготовленный инокулюм (100 мкл), разводя тем самым вдвое концентрацию изучаемых соединений. В качестве контроля включали лунки, не содержащие тестируемых веществ (контроль роста культуры). Кроме того, ставили контроль чистоты питательных сред и растворителей. Планшеты инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч. Оценку роста культур проводили визуально, сравнивая рост микроорганизмов в присутствии изучаемых тест - соединений с ростом культуры без них.

За МПК принимали минимальную концентрацию исследуемых соединений, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемых штаммов микроорганизмов. В качестве МПК соединения принимали его максимальное значение, полученное в трех независимых экспериментах.

В результате скрининга антибактериальной активности соединения I выявлено, что МПК в отношении клинических стафилококков 1-8 мкг/мл, и только в одном случае 16 мкг/мл (штамм *S. aureus* 967

MRSA), для клинических энтерококков МПК в пределах 0.03-4 мкг/мл. Эти значения сопоставимы с показателями, выявленными для бензалкония хлорида, и в среднем в (2-4) раза лучше, чем показатели мирамистина (табл. 1).

В отношении грамотрицательных бактерий препарат был менее активен, МПК у 11 штаммов был 2-4 мкг/мл, 8-16 мкг/мл - у 18 штаммов, 32-64 мкг/мл - у 12 штаммов. Тестируемый новый препарат по своей активности был сопоставим с бензалкония хлоридом, а в случае некоторых штаммов и превосходил его (особенно в случае штаммов *Ps. aeruginosa*). Соединение I было намного более активным по сравнению с мирамистином, у которого МПК находится в интервале 32-64 мкг/мл, за исключением музейного штамма *E.coli* ATCC 25922.

Таблица 1. Средние значения МПК для соединения I и препаратов сравнения в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов (в мкг/мл), при концентрации инокулюма 10^7 КОЕ/мл

№ п/п	Штамм	I	Бензалкония хлорид	Мирамистин
Грамположительные				
1	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	4	2	16
2	<i>S. epidermidis</i> 15990	4	1	8
3	<i>B. subtilis</i> 168	2	0.5	2
4	<i>S. haemolyticus</i> 837 MRSA	8	16	64
5	<i>S. aureus</i> 967 MRSA	16	8	16
6	<i>S. aureus</i> 981 MRSA	4	4	4
7	<i>S. aureus</i> 983 MRSA	8	4	4
8	<i>S. aureus</i> 1053 MRSA	2	4	4
9	<i>S. intermedius</i> 1061 MRSI	1	4	8
10	<i>S. aureus</i> 1065 MRSA	2	4	8
11	<i>S. aureus</i> 1130 MRSA	2	2	4
12	<i>S. aureus</i> 1131 MRSA	2	2	4
13	<i>S. aureus</i> 1134 MRSA	2	2	8
14	<i>S. intermedius</i> 1143 MRSA	4	4	8
15	<i>S. aureus</i> 1145 MRSA	2	2	8
16	<i>S. aureus</i> 1163 MRSA	4	4	4
17	<i>S. aureus</i> 1167 MRSA	4	2	4
18	<i>S. aureus</i> 1168 MRSA	1	2	8
19	<i>S. aureus</i> 1173 MRSA	2	8	16
20	<i>S. aureus</i> 2020 MRSA	4	4	8
21	<i>S. aureus</i> 18	4	<0.5	16
22	<i>S. aureus</i> 19	2	<0.5	16
23	<i>S. aureus</i> 20	4	<0.5	32
24	<i>S. aureus</i> 21	1	<0.5	16
25	<i>S. aureus</i> 22	1	<0.5	8

26	<i>E. faecalis</i> 23	0.03	<0.5	4
27	<i>E. faecium</i> 24	0.03	<0.5	16
28	<i>E. faecium</i> 25	0.03	<0.5	<0.5
29	<i>E. faecalis</i> 26	1	0.5	4
30	<i>E. faecium</i> 27	0.03	0.5	32
31	<i>E. faecium</i> 28	0.03	<0.5	32
32	<i>E. faecium</i> 29	0.03	<0.5	8
33	<i>E. faecium</i> 30	0.03	<0.5	<0.5
34	<i>E. faecium</i> 31	0.03	<0.5	4
35	<i>E. faecium</i> 32	0.03	<0.5	<0.5
36	<i>E. faecium</i> 3028	1	4	16
37	<i>E. faecium</i> 3030	1	0.5	0.5
38	<i>E. faecalis</i> 3047	4	2	2
39	<i>E. faecalis</i> 3051	4	2	2
40	<i>E. faecalis</i> 3060	1	4	8
41	<i>E. faecium</i> 3062	0.5	1	0.5
42	<i>E. faecium</i> 4402	0.06	1	4
43	<i>E. faecium</i> 4403	0.03	2	64
44	<i>S. aureus</i> 1053a	2	1	4-8
45	<i>M. luteus</i>	2	1	2
46	<i>S. aureus</i> ATCC 209p	2	4	8
Грамотрицательные				
47	<i>E. coli</i> ATCC 25922	2	1	4
48	<i>Kl. pneumoniae</i>	2	>64	>64
49	<i>Ps. aeruginosa</i> ATTC 27853	4	>64	>64
50	<i>Moraxella</i> sp.713	8	4	32
51	<i>Moraxella</i> sp.723	4	4	32
52	<i>Moraxella</i> sp.764	8	4	64
53	<i>Moraxella</i> sp.765	4	32	64
54	<i>Moraxella</i> sp.829	4	32	32
55	<i>Moraxella</i> sp.834	4	2	32
56	<i>Acinetobacter</i> spp. 1	16	>64	64
57	<i>Acinetobacter</i> spp. 3	8	4	64
58	<i>Acinetobacter</i> spp. 4	8	4	>64

59	<i>Pseudomonas spp. 5</i>	8	32	>64
60	<i>Pseudomonas spp. 6</i>	16	16	>64
61	<i>Stenotrophomonas spp. 9</i>	8	4	64
62	<i>Klebsiella spp. 10</i>	8	1	64
63	<i>Klebsiella spp. 11</i>	16	2	64
64	<i>Klebsiella spp. 12</i>	16	2	>64
65	<i>E. coli 13</i>	8	2	32
66	<i>Serratia spp. 15</i>	16	2	>64
67	<i>Enterobacter spp. 16</i>	8	4	64
68	<i>Proteus spp. 17</i>	64	16	>64
69	<i>Kl. pneumoniae 645 PR</i>	32	16	64
70	<i>Ps. aeruginosa 1202</i>	32	>64	>64
71	<i>Kl. pneumoniae 1342 PR</i>	32	32	64
72	<i>A. baumannii 1425 PR</i>	8	32	64
73	<i>Kl. pneumoniae 1435 PR</i>	32	32	64
74	<i>A. baumannii 1440</i>	8	32	64
75	<i>E. coli 1440</i>	32	32	64
76	<i>Kl. pneumoniae 1766</i>	16	16	64
77	<i>Kl. pneumoniae 1781</i>	2	16	64
78	<i>Kl. pneumoniae 1812 PR</i>	64	64	64
79	<i>Ps. aeruginosa 1913 PR</i>	64	>64	>64
80	<i>Ps. aeruginosa 1945 PR</i>	64	>64	>64
81	<i>Kl. pneumoniae 1953 PR</i>	2	16	64
82	<i>Ps. aeruginosa 1959</i>	32	>64	64
83	<i>S. marcescens 1966 PR</i>	32	64	64
84	<i>Ps. aeruginosa 2869</i>	32	64	64
85	<i>E. coli MG 1655</i>	2	2	8
86	<i>S. marcescens</i>	4	2	32
87	<i>E. coli CDCF-50</i>	8	4	64

Необходимо отметить, что к соединению I были чувствительны все бактериальные штаммы ($MПК_{100} < 64$ мкг/мл), в то время как у мирамистина $MПК_{89} < 64$ мкг/мл, а у бензалкония хлорида $MПК_{92} < 64$ мкг/мл.

Пример 3. Определение антибактериальной активности соединения I в отношении клеток, погруженных в матрикс биопленки

Для определения эффективности антибиотика против бактерий в составе клетки бактерии выращивали в среде Basal medium в течение 3 суток при температуре 37°C без качания для получения плотной биопленки [A.R. Kayumov, Khakimullina E., Sharafutdinov I, Trizna E., Latypova L, Lien Thi, Margulis A., Bogachev M., Kurbangalieva A. Inhibition of biofilm formation in *Bacillus subtilis* by new halogenated furanones. *J. Antibiotics*. - 2014; V. 68; №5, P. 297-301.]. Затем биопленку промывали стерильным 0.9% раствором NaCl и заливали свежую стерильную среду. Вносили антисептики до концентраций (1-16)×МБК (минимальная бактерицидная концентрация) и инкубировали в течение суток. После удаляли культуральную жидкость из лунок, однократно промывали 0.9% раствором NaCl для удаления неадгезированных клеток и оценивали жизнеспособность клеток в составе биопленок подсчетом КОЕ методом Drop plate анализа [B. Herigstad, M. Hamilton, J. Heersink How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods*. - 2001; V. 44; P. 121-129]. Для этого биопленку механически снимали с поверхности и гомогенизировали в 0.9% NaCl путем пипетирования и ультразвуковой обработки. Затем готовили серийные 10-кратные разведения бактериальной суспензии в 0.9% NaCl и по 5 мкл суспензии переносили на чашки с твердой питательной средой. КОЕ подсчитывали из капель, содержащих 5-10 колоний.

Результаты исследования противомикробной активности в отношении клеток исследуемых штаммов, погруженных в матрикс биопленки, по сравнению с мирамистином и хлоридом бензалкония представлены на фиг. 1 и 2.

В отношении грамположительных микроорганизмов в составе биопленки соединение I демонстрировало в 2 раза более высокую активность по сравнению с мирамистином и хлоридом бензалкония: одинаковое снижение количества КОЕ происходило при дважды меньшем превышении МБК у соединения I по сравнению с мирамистином и хлоридом бензалкония. При этом мирамистин проявлял активность в 2 раза ниже, чем бензалкония хлорид.

В отношении грамотрицательных микроорганизмов в составе биопленки соединение I демонстри-

ровало одинаковую с мирамистином и хлоридом бензалкония активность в отношении *K.pneumonia*, *S.marcescens*, *E.coli*. Что касается штамма *P.aeruginosa*, активность соединения I значительно выше, чем у антисептиков сравнения. Снижение количества КОЕ на 3 порядка происходило при превышении МБК в 4-8 раз для соединения I и в 16 раз для мирамистина и хлорида бензалкония, что является несомненным преимуществом разработанного антисептика.

Пример 4. Исследование противовирусной активности соединения I *in vitro*

Исследование противовирусной активности соединения I *in vitro* проводили в соответствии с [Д.Л. Кузнецов, А.Я. Самуйленко, В.И. Белоусов Иммуноферментная диагностика ИРТКРС. Ветеринария. - 2002; № 3; с. 22-25].

Клетки легкого эмбриона коровы (ЛЭК) получены из ФГБНУ "Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии", г. Москва. Вирус ринотрахеита крупного рогатого скота (семейство герпесвирусов), вакцинный штамм "ТК-А(ВИЭВ)-В2" получен из ФГБНУ "Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии", г. Москва.

Оценка противовирусной активности соединения I проводилась в соответствующей среде на клетках ЛЭК, которые инфицировались вирусом инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, относящегося к семейству герпесвирусов типа I.

Вирус инкубировали в присутствии соединения I в культуральной среде при 37°C в течение 1 ч в различных концентрациях, контрольными препаратами служили мирамистин и бензалкония хлорид. После инкубации вируса с веществами его добавляли к культуре клеток, которые затем инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 ч.

Оценка цитопатогенного действия проводилась визуально по состоянию клеточного монослоя по сравнению с контролями (вирус без инкубации с препаратом, исследуемые концентрации препаратов без вируса). Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча в модификации Ашмарина и выражали в Ig ТЦД₅₀/МЛ.

В результате проведенных исследований по изучению противовирусной активности соединения I выявлено, что вещество обладает вирулицидным действием в отношении герпесвируса типа I с инфекционным титром 6.0 Ig ТЦД₅₀/МЛ (табл. 2). Вирулицидное действие соединения I несколько слабее (200 мкг/мл), чем у мирамистина (150 мкг/мл) и сопоставимо с эффектами бензалкония хлорида.

Таблица 2. Результаты исследования противовирусной активности препаратов

Препарат	Концентрация, мкг/мл				
	0	50	100	150	200
Мирамистин	-	-	-	-	-
Мирамистин с вирусом	++++	++++	+++	-	-
Бензалкония хлорид	-	-	-	-	-
Бензалкония хлорид с вирусом	++++	++++	++++	++	-
Соединение I	-	-	-	-	-
Соединение I с вирусом	++++	++++	++++	++	-

Где

++++ - 90-100% разрушения монослоя;

+++ - 70-90% разрушения монослоя;

++ - 40-70% разрушения монослоя;

+ 10-40% разрушения монослоя; - 0-10% разрушения монослоя.

Пример 5. Определение антипротозойной активности соединения I *in vitro*

Оценку антипротозойной активности соединения I определяли по жизнеспособности простейших рода брюхожестничных инфузорий стилонихии *Stylonychia mytilus* в питательной среде в присутствии исследуемых веществ. Готовили маточный раствор соединения I (10 мг/мл) в смеси ДМСО и 96% этилового спирта (1:1). Отрицательным контролем служил 1% водный раствор ДМСО и этилового спирта, а в качестве препаратов сравнения использовали мирамистин, бензалкония хлорид и хлоргексидин. Затем из маточных растворов путем неоднократных разведений водой готовили рабочие растворы, соответствующие дозам в 5; 10; 20; 25; 50; 75; 100 и 150 мкг/мл. На предметное стекло наносили 10 мкл питательной среды с простейшими и 10 мкл раствора исследуемого вещества. Эксперимент делали в пяти повторностях.

Стекла просматривали под световым микроскопом, антипротозойную активность веществ (МПК и IC₅₀) определяли по гибели простейших. Для анализа использовали регрессионную модель Хилла с 5 параметрами.

В результате проведенных исследований выявлено, что соединение I обладает ярко выраженным антипротозойным действием в отношении *Stylonychia mytilus* (табл. 3). Антипротозойное действие соединения I в отношении брюхожестничных инфузорий стилонихии (*Stylonychia mytilus*) было сопоставимо (25 мкг/мл) с хлоргексидином (20 мкг/мл), бензалкония хлоридом (30 мкг/мл) и превосходило мирамистин (50 мкг/мл).

Таблица 3. Результаты исследования антипротозойной активности препаратов

Препарат	Концентрация, мкг/мл	
	МПК	IC ₅₀ (доверительный интервал 95 %)
Соединение I	25	59 (56-61)
Бензалкония хлорид	30	67 (66-69)
Мирамистин	50	92 (90-94)
Хлоргексидин	20	42 (41-43)

Пример 6. Исследование противогрибковой активности соединения I in vitro

Исследование противогрибковой активности соединения I in vitro проводили в соответствии с [Методические рекомендации № 2. Микологическое исследование объектов окружающей среды и определение противогрибковой активности различных веществ. -ГОУ ДПО СПбМАПО НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава. СПб.: Изд. Дом СПбМАПО. - 2008; с. 16].

Изучение противогрибковой активности веществ in vitro проводили в жидкой питательной среде (глюкозный бульон Сабуро) в биологических пробирках методом 2-х кратных серийных разведений. В пробирках готовили три параллельных ряда разведений исследуемого вещества следующим способом.

Жидкую среду Сабуро разливали стерильно по 3 мл в каждую пробирку; в первую пробирку ряда наливали 4.5 мл. Всего в ряду использовали 14 пробирок; из них последняя контрольная. В качестве стандартной навески брали 400 мг испытуемого вещества и растворяли в 10 мл дистиллированной воды. Таким образом, исходное разведение содержало испытуемое вещество в концентрации 40000 мкг/мл. Затем 0.5 мл этого разведения вносили в первую пробирку ряда (с 4.5 мл среды), разводя тем самым концентрацию вещества еще в 10 раз. Следовательно, первая пробирка ряда содержала 4000 мкг/мл испытуемого вещества. Затем из первой пробирки брали по 3 мл раствора и переносили его во вторую пробирку, тщательно продув, затем снова брали 3 мл раствора уже из второй пробирки и переносили в третью пробирку и т.д.; из предпоследней пробирки 3 мл выливали. В последнюю пробирку, как в контрольную, вещество не вносили. Таким образом, получали следующие разведения в мкг/мл: 4000; 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9; 1,9. Оценку роста культур проводили первоначально визуально, сравнивая рост микроорганизмов в присутствии изучаемых тест - соединений с ростом культуры без них. Наличие роста микроорганизма в жидкой среде (помутнение или образование мицелия) свидетельствовало о том, что данная концентрация испытуемого вещества недостаточна, чтобы подавить его жизнеспособность. Первую наименьшую концентрацию вещества (из серии последовательных разведений), где визуально не определялся или подавлялся рост грибов, считали минимальной подавляющей концентрацией (МПК).

Для приготовления инокулюма использовали чистые, (2-5) суточные культуры дрожжевых и мицелиальных грибов соответственно, выросшие на плотной питательной среде Сабуро. Инокулят для засева готовили по-разному, в зависимости от вида грибов. Так, дрожжевые культуры *Candida albicans* РКПГ Y-401/NCTC-885-653 (*C. albicans*) готовили путем смыва культуры с агарового косяка. Культуры мицелиальных грибов *Rhizopus oryzae* РКПГ F-1537/1722 (*Rh. oryzae*), *Aspergillus fumigatus* РКПГ F-1248/880(*Asp. fumigatus*) предварительно растирали в ступке. В стерильном изотоническом растворе хлорида натрия готовили взвесь микроорганизмов, доводя плотность инокулюма до 2 млрд по стандарту МакФарланда ($2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) учитывая, что величина грибковых элементов примерно в 10 раз превышает величину бактерий. Конечная концентрация клеток в опыте составляла $(1-5) \times 10^3$ для дрожжевых грибов и $(0.4-5.0) \times 10^4$ для мицелиальных. Инокулюм использовали в течение 15 мин после приготовления; чистоту грибковых штаммов контролировали перед каждым экспериментом.

В пробирки с тремя параллельными рядами разведений исследуемого вещества (как описано выше) и в контрольные пробирки в отсутствии испытуемых веществ оттитрованной пипеткой, содержащей 25 капель в 1 мл, вносили по одной капле взвеси инокулюма. После засева штатив энергично встряхивали и помещали в термостат с температурой 27°C на (2-4) суток для дрожжевых грибов и (7-14) суток для мицелиальных грибов соответственно.

Оценку роста культур проводили визуально, применяя ступенчатую шкалу, сравнивая рост микроорганизмов в присутствии изучаемых тест - соединений с ростом культуры без них.

- 0 = оптическая прозрачность, полное визуально отсутствие роста;
- 1 = слабый рост (25% от уровня контроля);
- 2 = существенное подавление роста (50% от уровня контроля);
- 3 = слабое подавление роста(75% от уровня контроля);
- 4 = отсутствие подавление роста

За МПК принимали минимальную концентрацию исследуемых соединений, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемых штаммов микроорганизмов (шкала роста = 0).

В результате проведенного исследования определены значения МПК тестируемого соединения I,

которое обладает выраженной фунгицидной активностью в отношении всех видов микроскопических грибов. Мирамистин проявляет сопоставимую активность в отношении *Asp. fumigates* и *Rh. nigricans*, при этом будучи неактивным для *S. albicans*. Бензалкония хлорид в отношении всех видов грибов был существенно более активен, чем соединение I и мирамистин.

Полученные результаты представлены в табл. 4 и 5.

Таблица 4. Значения МПК тестируемых веществ в отношении мицелиальных и дрожжевых видов грибов

№	Штаммы	Значение МПК, мкг/мл		
		I	Бензалкония хлорид	Мирамистин
1	<i>C. albicans</i> РКПГ У-401/НСТС-885-653	62.5	7.8	>500
2	<i>Asp. fumigates</i> РКПГ F-1248/880	62.5	15.6	31.2
3	<i>Rh. nigricans</i> РКПГ F-1537/1722	62.5	15.6	62.5

Таблица 5. Определение МПК тестируемых веществ в отношении мицелиальных и дрожжевых видов грибов

Штаммы	Соединения	Концентрация, мкг/мл										
		2000	1000	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	1.9
<i>C. albicans</i>	I	-	-	-	-	-	-	+/-	+	+	++	++
<i>Asp. fumigates</i>		-	-	-	-	-	-	+	+	++	+++	+++
<i>Rh. oryzae</i>		-	-	-	-	-	-	+/-	+	++	+++	+++
<i>C. albicans</i>	Бензалкония хлорид	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+
<i>Asp. fumigates</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+	+
<i>Rh. oryzae</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++
<i>C. albicans</i>	Мирамистин	-	-	+/-	+/-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Asp. fumigates</i>		-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
<i>Rh. oryzae</i>		-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++

Пример 7. Определение чувствительности микроскопических грибов к соединению I в растворе

Для приготовления инокулюма использовали чистые (2-5) суточные культуры дрожжевых и мицелиальных грибов соответственно, выросших на плотной питательной среде Сабуро. Инокулят для засева готовили по-разному, в зависимости от вида грибов. Так дрожжевые культуры (*C. albicans*) готовили путем смыва культуры с агарового косяка. Культуры мицелиальных грибов (*Rh. oryzae*, *Asp. fumigatus*) предварительно растирали в ступке. В стерильном изотоническом растворе хлорида натрия готовили взвесь микроорганизмов, доводя плотность инокулюма до 5 ЕД (ГИСК им. Л.А.Тарасевича) или по стандарту МакФарланда 1 ЕД с концентрацией не менее 1×10^6 КОЕ/мл учитывая, что величина грибковых элементов примерно в 10 раз превышает величину бактерий (это обеспечивало возможность создания смеси биоцида с суспензией, концентрация микроорганизмов порядка 1×10^5 КОЕ/мл).

Растворы соединения I, мирамистина и бензалкония хлорида в рабочих концентрациях (0.1, 0.2, 0.3%) разливали в стерильные пробирки по 0.9 мл. В пробирки с растворами дезинфектантов вносили по 0.1 мл микробной взвеси и перемешивали встряхиванием несколько секунд. Выдерживали экспозицию в течение 1,5, 15 мин. После действия дезинфектанта в необходимой временной экспозиции, вносили по 0.5 мл раствора нейтрализатора и перемешивали встряхиванием.

Затем осуществляли посев на плотную питательную среду по 0.1 мл смеси и помещали чашки с посевами в термостат с температурой 27°C на (2-4) суток для дрожжевых грибов и (5-7) суток мицелиальных грибов соответственно.

Параллельно с проведением опыта ставили следующие контроли:

- 1) контроль жизнеспособности микроорганизма (посев микробной культуры на питательную среду);
- 2) контроль стерильности раствора дезинфектанта без добавления культуры (посев приготовленного раствора дезинфектанта на питательную среду);
- 3) контроль полноты нейтрализации дезинфектанта (1 - к раствору дезинфицирующего средства (ДС) добавляли нейтрализатор, 2 - в полученную смесь вносили микробную суспензию, 3 - выдерживали с необходимой экспозицией, 4 - высевали смесь на питательную среду).

По истечении времени, необходимого для культивирования микроорганизмов данного вида, прово-

дили учет результатов по количеству выросших на чашке Петри колоний. При отсутствии роста увеличивали сроки культивирования микроорганизмов в 2 раза. Выросшие колонии подвергали микроскопии.

Тестируемые вещества исследовали на клинических и музейных штаммах дрожжевых и мицелиальных грибов. В качестве препаратов сравнения использовали часто применяемые в клинической практике препараты: мирамистин и бензалкония хлорид. После действия дезинфектанта в необходимой временной экспозиции проводили посев стерильно на поверхность плотной питательной среды в чашки Петри по 0.1 мл смеси. По истечении времени культивирования микроорганизмов, проводили учет результатов по количеству выросших на чашке Петри колоний. Полученные результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6. Число колоний, выросших в чашке Петри, при определении чувствительности грибов к соединению I, мирамистину и бензалкония хлориду в растворе при варьировании времени экспозиции

Грибы	Препараты	Время экспозиции, мин								
		1			5			15		
		0.1%	0.2%	0.3%	0.1%	0.2%	0.3%	0.1%	0.2%	0.3%
<i>C. albicans</i>	I	3	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Asp. fumigates</i>		-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Rh. Oryzae</i>		1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	Мирамистин	12	5	-	7	-	-	-	-	-
<i>Asp. fumigates</i>		20	10	-	12	-	-	2	-	-
<i>Rh. Oryzae</i>		12	2	1	10	4	-	2	-	-
<i>C. albicans</i>	Бензалкония хлорид	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Asp. fumigates</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rh. Oryzae</i>		1	-	-	-	-	-	-	-	-

Результаты данного исследования показали, что по фунгицидному действию соединение I превосходит мирамистин и незначительно уступает бензалконию хлориду. Соединение I обладает выраженной активностью в отношении всех видов в концентрации 0.2%, тогда как мирамистин не проявлял активность даже в концентрации 0.3 % на *Rh. oryzae*.

Таким образом, согласно полученным результатам соединение I и бензалконий хлорид имеют одинаковую антифунгальную активность в концентрации 0.2% с экспозицией 5 мин.

Пример 8. Определение дезинфицирующей активности соединения I в суспензионном тесте

Для приготовления бактериальной суспензии культуры микроорганизмы, выращенные на плотной питательной среде в течение 18-24 ч, смывали стерильным изотоническим раствором хлорида натрия. Бактериальную суспензию каждого микроорганизма доводили до мутности, соответствующей концентрации 1×10^9 клеток/мл, что соответствует 3 единицам Мак-Фарланда. Для опытов с белковой нагрузкой к бактериальной суспензии добавляли раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) до конечной концентрации 0.2%.

Растворы соединения I, мирамистина и бензалкония хлорида разливали в рабочей концентрации (0.1, 0.2%) в 24-луночный планшет по 0.9 мл в каждую лунку. В лунки с растворами дезинфектантов вносили по 0.1 мл микробной взвеси и перемешивали встряхиванием несколько секунд.

По окончании 1, 5 и 15 мин экспозиции для дезактивации препаратов и остановки их противомикробного действия вносили 0.5 мл универсального нейтрализатора и перемешивали встряхиванием. Нейтрализатор состоял из твина-80 (Sigma-Aldrich) - 3.0 мл, сапонина (ДИАЭМ) - 3.0 г, гистидина - 0.1 г, цистеина - 0.1 г в 100 мл фосфатно-буферного раствора.

Проводили посев жидкости на плотную питательную среду (агар Мюллера-Хинтона) по 0.1 мл смеси, культивирование осуществляли 24-48 ч при 37°C. Бульон Мюллера-Хинтон готовили из сухих сред (Mueller Hinton broth, Acumedia, Baltimore), культивирование осуществляли на агаризованной среде Мюллера-Хинтон, которая включала дополнительно 2% агара. Среды стерилизовали автоклавированием при 121°C в течение 15 мин.

Параллельно с проведением опыта ставили следующие контроли:

контроль жизнеспособности микроорганизма (посев микробной культуры на питательную среду);
контроль стерильности раствора дезинфектанта без добавления культуры (посев приготовленного раствора дезинфектанта на питательную среду);

контроль полноты нейтрализации дезинфектанта (к раствору дезинфектанта добавляют нейтрализатор, в полученную смесь вносят микробную суспензию, выдерживают необходимое время экспозиции и высевают смесь на питательную среду).

По истечении времени, необходимого для культивирования микроорганизмов, проводили учет ре-

зультатов по количеству выросших на чашке Петри колоний. При отсутствии роста увеличивали сроки культивирования микроорганизмов в 2 раза (так, при сроках культивирования 24 ч оставляли в термостате до 2-х суток). Эксперимент в одинаковых условиях проводили трижды.

Критерий эффективности препаратов в суспензии - гибель 100% тест-микроорганизмов при времени действия не более 30 мин.

В результате исследования дезинфицирующей способности 0.1% раствора соединения I в суспензии наблюдалась гибель 99.99 % *Staphylococcus aureus* ATCC 209p.

При концентрации 0.2% в экспериментах с белковой нагрузкой и выдержке 15 мин соединение I вызывало гибель 100% бактерий, что соответствует критерию эффективности дезинфектантов. Дезинфицирующая активность соединения I несколько ниже активности бензалкония хлорида, у которого 100% гибель бактерий при белковой нагрузке была выявлена уже через 1 мин и выше, чем у мирамистина, для которого 100% гибель бактерий при белковой нагрузке не была достигнута и по прошествии 15 мин экспозиции (табл. 7 и 8).

Таблица 7. Чувствительность *Staphylococcus aureus* ATCC 209p к 0.1% растворам соединения I, мирамистина и бензалкония хлорида в суспензии при варьировании времени экспозиции, n=3

Препарат	Процент ингибирования (M ±SD) роста <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 209p					
	Время экспозиции, мин					
	1		5		15	
	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА
0.1 % I	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99±0.005	99.99±0.005
0.1 % Бензалкония хлорид	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99±0.005	99.99±0.005
0.1 % Мирамистин	99.9	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99±0.005

- БСА - Исследование без белковой нагрузки БСА

+ БСА - Исследование с белковой нагрузкой БСА

Таблица 8. Чувствительность *Staphylococcus aureus* ATCC 209p к 0.2% растворам соединения I, мирамистина и бензалкония хлорида в суспензии при варьировании времени экспозиции, n=3

Препарат	Процент ингибирования (M ±SD) роста <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 209p					
	Время экспозиции, мин					
	1		5		15	
	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА
0.2 % I	100	99.99±0.005	100	99.99±0.005	100	100
0.2 % Бензалкония хлорид	100	100	100	100	100	100
0.2 % Мирамистин	99.9	99.99	99.99	99.99±0.005	100	99.99±0.005

В экспериментах с белковой нагрузкой выдержка в течение 15 мин с соединением I и бензалкония хлоридом в концентрациях 0.1% приводила к гибели 100% *Escherichia coli* CDC F-50 (табл. 9). В концентрации 0.2% мирамистину также удалось проявить 100% дезинфицирующую активность при 15-минутной экспозиции (табл. 10).

Таблица 9. Чувствительность *Escherichia coli* CDC F-50 к 0.1% растворам соединения I, мирамистина и бензалкония хлориду в суспензии при варьировании времени экспозиции, n=3

Препарат	Процент ингибирования (M ±SD) роста <i>Escherichia coli</i> CDC F-50					
	Время экспозиции, мин					
	1		5		15	
	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА
0.1 % I	99.99	99.99±0.005	99.99±0.005	99.99±0.005	100	100
0.1 % Бензалкония хлорид	99.99	99.99±0.005	99.99±0.005	99.99±0.005	100	100
0.1 % Мирамистин	99.99	99.98±0.005	99.99±0.005	99.99	100	99.99±0.005

Таблица 10. Чувствительность *Escherichia coli* CDC F-50 к 0.2% растворам соединения I, мирамистина и бензалкония хлорида в суспензии при варьировании времени экспозиции, n=3

Препарат	Процент ингибирования (M ±SD) роста <i>Escherichia coli</i> CDC F-50					
	Время экспозиции, мин					
	1		5		15	
	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА
0.2 % I	99.99	99.99±0.005	99.99	99.99	100	100
0.2 % Бензалкония хлорид	99.99±0.005	99.99±0.005	99.99±0.005	100	100	100
0.2 % Мирамистин	99.99	99.99	99.99±0.005	99.99	100	100

Таким образом, соединение I проявляет дезинфицирующую активность, которая сопоставима, либо несколько ниже, чем у бензалкония хлорида и выше, чем у мирамистина.

Пример 8. Определение дезинфицирующей активности соединения I в тесте на контаминированной металлической поверхности

Приготовление бактериальной суспензии проводили аналогично процедуре по определению дезинфицирующей активности соединения I в суспензии (см. пример 7). Для имитации белкового загрязнения металлической поверхности к бактериальной суспензии добавляли раствор БСА до конечной концентрации 0.4%. Поверхность металлического стола расчерчивали на квадраты, количество которых зависело от числа исследуемых штаммов. Тест-поверхность должна быть чистой, неповрежденной, стерильной. Для этого стол очищали спиртом, а затем стерильной водой. На площадь поверхности 5×5 см наносили микробную взвесь в объеме 0.125 мл и распределяли стерильным шпателем по всей площади квадрата. После высыхания микробной взвеси на поверхность равномерно наносили 0.5 мл раствора соединения I (в контроле мирамистин и бензалкония хлорид) в рабочей концентрации 0.1 и 0.2% и распределяли по поверхности квадрата стерильным шпателем, выдерживали 1, 5 и 15 мин.

После окончания экспозиции стерильной марлевой салфеткой (размер 5×5см), смоченной в 1 мл раствора нейтрализатора, тщательно протирали контаминированную поверхность и погружали салфетку в 10 мл стерильного физиологического раствора в фальконе, который встряхивали в течение 10 мин.

Посев проводили как в примере 7, дополнительно к контролям проводили

контроль стерильности поверхности (до нанесения микробной взвеси производили смыв стерильным тампоном с металлического стола с последующим высевом на питательную среду);

контроль жизнеспособности микроорганизма (после нанесения микробной взвеси на металлический стол, производили с него смыв стерильным тампоном с последующим высевом на питательную среду).

Рассчитывали плотность контаминации 1 см² поверхности и процент обеззараживания, принимая количество колоний, снятых с контрольных поверхностей, за 100%. Критерий эффективности обеззараживания поверхностей - не менее 99.99% гибели тест-микроорганизмов, время обеззараживания не более 120 мин.

При выдерживании 0.1% растворов соединения I, мирамистина и бензалкония хлорида на металлической поверхности, контаминированной *Staphylococcus aureus* ATCC 209p, эффективное ингибирование роста бактерий (99.99%) наблюдается у всех трех препаратов через 5 мин после нанесения (табл. 11). При воздействии соединения I в концентрации 0.2% эффективное ингибирование роста бактерий (сравнимое с бензалкония хлоридом и более эффективное, чем у мирамистина) происходило уже через 1 мин (табл. 12).

Таблица 11. Чувствительность *Staphylococcus aureus* ATCC 209p к 0.1% растворам соединения I, мирамистина и бензалкония хлорида на металлической поверхности при варьировании времени экспозиции, n=3

Препарат	Процент ингибирования (Mean ±SD) роста <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 209p					
	Время экспозиции, мин					
	1		5		15	
	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА
0.1 % I	99.99	99.98±0.00	99.99	99.99	99.99	99.99
0.1 % Бензалкония хлорид	99.99	99.99±0.005	99.99	99.99	99.99±0.005	99.99
0.1 % Мирамистин	99.98±0.005	99.98±0.00	99.99	99.99	99.99	99.99

Таблица 12. Чувствительность музейного штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 209p к 0.2% растворам соединения I, мирамистина и бензалкония хлорида на металлической поверхности при варьировании времени экспозиции, n=3

Препарат	Процент ингибирования (M±SD) роста <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 209p					
	Время экспозиции, мин					
	1		5		15	
	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА
0.2 % I	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99
0.2 % Бензалкония хлорид	99.99	99.99	99.99	99.99	100	99.99±0.005
0.2 % Мирамистин	99.98±0.005	99.98±0.00	99.99	99.99	99.99	99.99

При экспозиции 0.1% растворов соединения I, мирамистина и бензалкония хлорида 1, 5 и 15 мин на металлической поверхности, контаминированной *Escherichia coli* CDC F-50, эффективное ингибирование роста бактерий наблюдается лишь спустя 15 мин после нанесения препаратов (табл. 13). В концентрации 0.2% эффективное ингибирование роста бактерий у трех препаратов происходит через 5 мин, а в тесте без белковой нагрузки у бензалкония хлорида уже через 1 мин (табл. 14).

Таблица 13. Чувствительность *Escherichia coli* CDC F-50 к 0.1% растворам соединения I, мирамистина и бензалкония хлорида на металлической поверхности при варьировании времени экспозиции, n=3

Препарат	Процент ингибирования (M±SD) роста <i>Escherichia coli</i> CDC F-50					
	Время экспозиции, мин					
	1		5		15	
	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА
0.1 % I	99.92±0.005	99.92±0.005	99.97±0.005	99.96±0.005	99.99±0.00	99.99±0.005
0.1 % Бензалкония хлорид	99.96±0.005	99.97±0.005	99.98±0.005	99.97±0.005	100±0.00	99.99±0.005
0.1 % Мирамистин	99.75±0.00	99.75±0.005	99.86±0.005	99.97±0.005	99.99±0.005	99.99±0.005

Таблица 14. Чувствительность *Escherichia coli* CDC F-50 к 0.2% растворам соединения I, мирамистина и бензалкония хлорида на металлической поверхности при варьировании времени экспозиции, n=3

Препарат	Процент ингибирования (M±SD) роста <i>Escherichia coli</i> CDC F-50					
	Время экспозиции, мин					
	1		5		15	
	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА	- БСА	+ БСА
0.2 % I	99.98±0.005	99.94±0.00	99.99±0.005	99.99±0.005	100	100±0.005
0.2 % Бензалкония хлорид	99.99±0.005	99.97±0.00	100	99.99±0.005	100	100±0.00
0.2 % Мирамистин	99.98±0.005	99.83±0.005	99.99±0.005	99.99±0.005	100	99.99±0.005

Таким образом, дезинфицирующая активность соединения I сопоставима, либо несколько ниже, чем у бензалкония хлорида и выше, чем у мирамистина.

Пример 9. Исследование антисептической активности соединения I

Исследование антисептической активности соединения I на крысах при внутрижелудочном введении проводилось в соответствии с [Р 4.2.2643-10 Методы лабораторных исследований и испытаний медико-профилактических дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010; С. 615]. Эксперименты проводили на самцах крыс линии Вистар массой тела 180-250 г.

Культуру *E.coli* CDC F-50, выращенную на плотной питательной среде в течение 18-20 ч, смывали стерильным изотоническим раствором хлорида, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин, сливали надосадочную жидкость и ресуспендировали клетки стерильным изотоническим раствором хлорида натрия.

Бактериальную суспензию микроорганизмов доводили до мутности 0.05 по Мак-Фарланду, что соответствует концентрации 1.5×10^7 клеток/мл.

Животных формировали в 5 групп по 6 голов в каждой. Все манипуляции с животными проводили под анестезией изофлураном (4% - вводный наркоз (2 мин, 1 л/мин), 2% - базисный). Машинкой для стрижки волос на дорсальной части тела животного выбирали участок 5×5 см.

На выбритый участок спины крысы дозатором наносили микробную взвесь в объеме 0.25 мл, содержащую 1×10^7 КОЕ E.coli CDC F-50 и распределяли стерильным одноразовым шпателем по всей площади квадрата. Оставляли на 2-3 мин до высыхания.

Затем на кожу крыс на 5 мин наносили марлевую салфетку (5×5 см). В опытной группе салфетку предварительно смачивали 1 мл 0.2% раствора соединения I, а в группах положительного контроля салфетку окунали в 1 мл 0.2% мирамистина, бензалкония хлорида и хлоргексидина. В группе отрицательного контроля салфетку погружали в 1 мл стерильного физиологического раствора.

По окончании времени экспозиции с антисептиком для остановки его воздействия на микроорганизм использовали универсальный нейтрализатор, состоящий из Твина-80 - 3.0 мл, сапонины - 3.0 г, гистидина - 0.1 г, цистеина - 0.1 г, доведенный фосфатно-буферным раствором до 100 мл. С кожи крысы делали смыв (в течение 1-3 с) стерильной марлевой салфеткой (5×5 см), смоченной стерильным раствором нейтрализатора. Затем салфетку погружали в 10 мл стерильного физиологического раствора, который встряхивали в течение 10 мин.

После этого отмытую жидкость сеяли на 2-3 чашки по 0.1 мл в каждую на плотную питательную среду (агар Мюллера-Хинтона), культивирование осуществляли 24-48 часов при 37°C. Бульон Мюллера-Хинтон готовили из сухих сред (Mueller Hinton broth, Acumedia, Baltimore), культивирование осуществляли на агаризованной среде Мюллера-Хинтон, которая включала дополнительно 2% агара. Среды стерилизовали автоклавированием при 121°C в течение 15 мин.

По истечении времени, необходимого для культивирования микроорганизмов данного вида, проводили учет результатов по количеству выросших на чашке Петри колоний. Учет результатов проводили путем оценки остаточной обсемененности поверхностей после обработки раствором антисептика. После подсчета количества выросших на чашках Петри колоний рассчитывали плотность контаминации на 1 см² поверхности и процент обеззараживания, принимая количество колоний, снятых с контрольных поверхностей, не подвергавшихся действию антисептиков, за 100%. Процент ингибирования роста E. coli CDC F-50 рассчитывали по формуле:

$$I = 100\% - \frac{O \times 100\%}{K},$$

где

I - процент ингибирования роста, %;

K - количество колоний в контрольной группе животных,

O - количество колоний в опытной группе.

В результате исследования антисептических свойств *in vivo* выявлено, что соединение I снижает КОЕ E.coli CD CF-50 на коже крысы после 5-минутной экспозиции. Статистически значимых различий с бензалкония хлоридом, мирамистином и хлоргексидином не выявлено (табл. 15).

Таблица 15. Ингибирование роста E.coli CDC F-50 (КОЕ/ см²) при концентрации антисептиков 0.2% и времени экспозиции 5 мин на коже крыс, n=6

Препарат	Процент ингибирования роста (M±SD)
I, 0.2 %	97.5±1.7
Бензалкония хлорид, 0.2 %	96.8±2.0
Мирамистин, 0.2 %	97.2±1.8
Хлоргексидин, 0.2 %	95.7±3.4

Пример 10. Определение острой токсичности соединения I на мышах при внутрижелудочном введении

Исследование проводили на мышах линии CD-1 (ICR) (6-8 недель, вес не менее 18 г) обоего пола. Использовали внутрижелудочное (пероральное) введение раствора соединения I в объеме не более 0.5 мл/30 г живой массы тела мыши с применением желудочного зонда. Мышам вводили дозы - 3000 мг/кг, 2000 мг/кг, 1000 мг/кг, 500 мг/кг и 50 мг/кг.

По результатам исследования острой токсичности соединения I при пероральном введении (табл. 16) в соответствии с ГОСТ 32644-2014 исследуемый препарат можно отнести к 4-му классу токсичности по Согласованной на глобальном уровне системе классификации опасности и маркировки химической продукции, а в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 - к 3-му классу умеренно опасных вредных веществ.

Таблица 16. Результаты исследования острой токсичности соединения I на мышах

Вид животных	Доза, мг/кг	Число животных погибших/ в группе	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀ (доверительный интервал 95%)	ЛД ₈₆
Мыши CD-1	3000	4/4	788	1706 (1194-2470)	2623
	2000	5/10			
	1000	3/6			
	500	0/6			
	50	0/6			

Таким образом, из вышеизложенного можно сделать вывод, что заявленное соединение проявляет высокий уровень антибактериальной, антимикотической, противовирусной и антипротозойной активности. Важным преимуществом соединения I является высокая безопасность. Исследования острой токсичности на мышах при внутрижелудочном введении показали, что величина ЛД₅₀ для соединения I составляет 1706 мг/кг. Широко применяемые в настоящее время антисептики мирамистин (ЛД₅₀ = 1000 мг/кг) [Пат. 2161961 Российская Федерация, МПК⁷, С1, А61К 31/14, А61Р 31/00. Лекарственный препарат/Кривошеин Ю.С., Рудько А.П.; заявитель и патентообладатель Кривошеин Ю.С., Рудько А.П. - № 2000106427/14; 17.03.2000; опубл. 20.01.2001], бензалкония хлорид (ЛД₅₀ = 150 мг/кг) [Benzalkonium chloride.Kemsol MOSS-KILL safety data sheet] и хлоргексидин (ЛД₅₀ = 1260 мг/кг) [0.05% Chlorhexidine & 0.5% Cetrимиде Aqueous Irrigation Pfizer material safety data sheet.] при внутрижелудочном введении на мышах существенно более токсичны. В целом заявленное техническое решение позволяет создать новый высокоэффективный и безопасный антисептический лекарственный препарат, который потенциально позволит существенно повысить качество и продолжительность жизни пациентов.

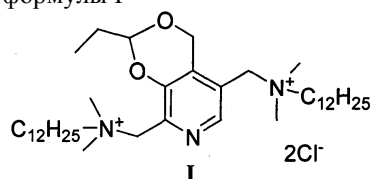
Заявленное техническое решение соответствует критерию "новизна", предъявляемому к изобретениям, так как из исследованного уровня техники не выявлены технические решения, обладающие заявленной совокупностью отличительных признаков, обеспечивающих достижение заявленных результатов.

Заявленное техническое решение соответствует критерию "изобретательский уровень", предъявляемому к изобретениям, так как не является очевидным для специалиста в данной области науки и техники.

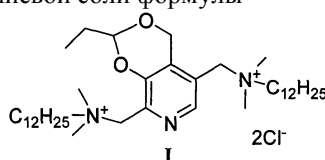
Заявленное техническое решение соответствует критерию "промышленная применимость", т.к. может быть реализовано на любом специализированном предприятии с использованием стандартного оборудования, известных отечественных материалов и технологий.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

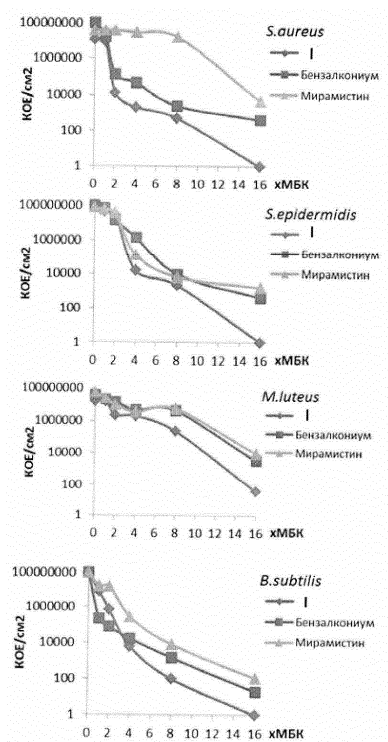
1. Четвертичная аммониевая соль формулы I



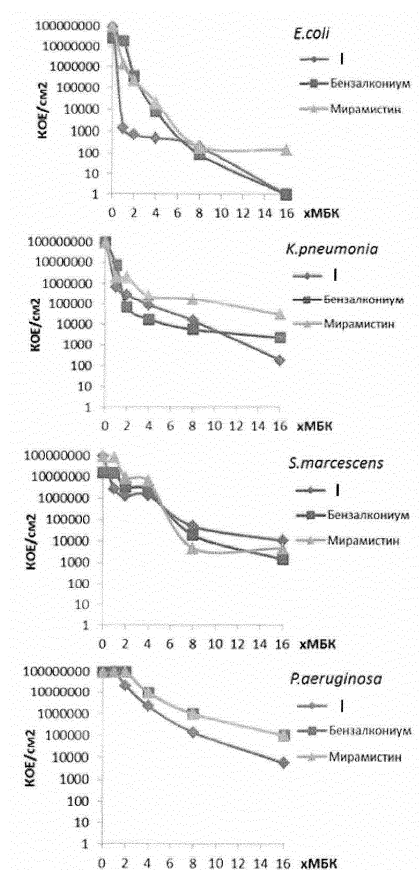
2. Применение четвертичной аммониевой соли формулы



в качестве антибактериального, антимикотического, противовирусного, антипротозойного средства.



Фиг. 1



Фиг. 2

