

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235823**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **427428**

(22) Data zgłoszenia: **16.10.2018**

(51) Int.Cl.  
**A61K 31/155 (2006.01)**  
**A61K 31/47 (2006.01)**  
**A61K 33/245 (2019.01)**  
**A61P 31/04 (2006.01)**

(54)

**Kompozyt przeciwbakteryjny do profilaktyki lub leczenia,  
zwłaszcza miejscowych zakażeń i sposób jego otrzymywania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**20.04.2020 BUP 09/20**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**02.11.2020 WUP 17/20**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny w Lublinie,  
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**DOROTA KOWALCZUK, Lublin, PL**  
**AGATA GŁADYSZ, Krężnica Jara, PL**  
**RAFAŁ PIETRAŚ, Lublin, PL**  
**GRAŻYNA GINALSKA, Lublin, PL**  
**MAŁGORZATA MIAZGA-KARSKA, Lublin, PL**  
**BARBARA RAJTAR, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Bełz**

**PL 235823 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kompozyt przeciwbakteryjny do profilaktyki lub leczenia zwłaszcza miejscowych zakażeń i sposób jego otrzymywania.

Szacuje się, że w 2015 roku blisko 6,5 miliona osób na świecie dotkniętych było problemem ran przewlekłych, z czego w Polsce około 500 tysięcy. Ze względu na starzenie się społeczeństwa i wzrost zachorowalności na choroby cywilizacyjne (cukrzyca, otyłość, choroby układu sercowo-naczyniowego) liczba ta będzie się stale powiększać [Rusak A., Rybak Z., *Polim. Med.*, 2013, 43 (3), 199–204; Dreifke M.B. 1 współautorzy, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 48, 651–662].

Ranami przewlekłymi nazywa się te, których proces gojenia jest zaburzony i trwa dłużej niż trzy miesiące. Charakteryzuje je długotrwale utrzymujący się stan zapalny, którego przyczyną w większości przypadków jest infekcja bakteryjna spowodowana przez więcej niż jeden szczep. Najczęściej występujące w zakażonej ranie drobnoustroje to *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecali*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* koagulazoujemne gronkowce (m.in. *Staphylococcus epidermidis*). Bardzo prawdopodobne jest, że bakterie te występują w ranach przewlekłych w postaci struktury kompleksowej zwanej biofilmem, którego obecność utrudnia leczenie wydłużając czas jego trwania. Leczenie zakażeń ran przewlekłych z wykorzystaniem popularnych antybiotyków i antyseptyków jest utrudnione ze względu na wzrastającą liczbę szczepów opornych na dotychczas stosowane i dostępne preparaty. Najpowszechniej występujące, w ranach gatunki bakterii opornych to *P. aeruginosa* i *S. aureus* [Nunan R. i współautorzy, *Dis. Model. Mech.*, 2014, 7, 1205–1213; Davies C.E. i współautorzy, *Rep Reg*, 2001, 9, 332–340; Gjødse K. i współautorzy, *Int Wound J.*, 2006, 3 (3), 225–231].

Specyfika leczenia ran przewlekłych wymagająca stosowania odpowiednich opatrunków, często związana z czasową niezdolnością do pracy i potrzebą opieki osób trzecich znacznie obciąża system opieki zdrowotnej i socjalnej, generując ogromne wydatki; natomiast zmniejszająca się liczba możliwych do zastosowania preparatów antibakteryjnych sprawiają, że jest to nadal duże wyzwanie terapeutyczne dla współczesnej medycyny i nauki, czyniąc z niego problem o zasięgu globalnym [Sen C.K. i współautorzy, *Wound Repair Regen.*, 2009, 17, 763–771].

Aktualne badania skupiają się na poszukiwaniach bardziej efektywnego sposobu leczenia ran poprzez włączanie w strukturę opatrunków substancji o właściwościach przeciwbakteryjnych, przeciwbólowych i przyspieszających proces gojenia, a co za tym idzie dążą do zastąpienia ogólnoustrojowego podawania leków – podawaniem miejscowym. Zahamowanie i/lub zlikwidowanie infekcji bakteryjnej można osiągnąć przez zastosowanie antybiotyków, chemioterapeutyków i antyseptyków, oraz coraz powszechniej – z wykorzystaniem substancji pochodzenia naturalnego: olejków eterycznych, ekstraktów roślin, enzymów, czy peptydów.

Powszechnie wykorzystywanym w prototypach opatrunków chemioterapeutykami jest cyprofloksacyna. Lek włącza się w strukturę opatrunków chitozanowo-alginiartowych [Han F. i współaut., *Appl Surf Sci*, 2014, 311, 626–634], chitozanowo-żelatynowych [Hima B.TVL. i współaut., *International Journal of Drug Delivery*, 2010, 2, 173–182] uzyskując opatrunki w formie błony posiadające aktywność przeciwbakteryjną przez długi okres czasu (nawet 28 dni).

Kolejną metodą jest wytwarzanie mikrowłókien poliuretanowo-dekstranowych techniką elektroprzędzenia, w których strukturę włącza się lek [Unnithan A.R. i współaut., *Carbohydr Polym*, 2012, 90, 1786–1793].

W celu większej kontroli nad uwalnianiem chemioterapeutyku tworzy się także kompleksy cyprofloksacyna-montmorylonit, a następnie zamyka w żelatynie, co skutkuje powolniejszym i dłuższym w czasie uwalnianiem leku [Kevadiya B.D. i współaut., *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 122, 175–183].

Następnym proponowanym do leczenia ran przewlekłych antybiotykiem jest gentamycyna w postaci proszku alginianowo-pektynowego uzyskanego techniką suszenia rozpyłowego, która dzięki zastosowanej technice i formie wykazuje działanie przedwbakteryjne do 6 dni dłużej niż sam lek [De Cicco V. i współaut., *Int J Pharm.*, 2014, 473, 30–37].

Skutecznym sposobem immobilizacji gentamycyny okazało się utworzenie kompozytu chitozantlenek cynku, którego postać pozwoliła na spowolnienie uwalniania i zmniejszenie ilości leku niezbędnego do bida bakterii zakażających ranę [Vasile B.S. i współaut., *Int J Pharm*, 2014, 463, 161–169].

W przypadku niewielkiej infekcji rany lub by zapobiec rozwojowi zakażenia zamiast antybiotyków stosuje się antyseptyki. Najpowszechniej używanymi w tworzeniu potencjalnych materiałów opatrunkowych są pochodne biguanidu oraz związki jodu.

Chlorheksydyna ze względu na właściwości odkażające została zastosowana w kilku typach opatrunków. Podobnie jak w przypadku cyprofloksacyny utworzono jej kompleks z montmorylonitem i włączono go w strukturę opatrunku chitozanowego, co spowolniło uwalnianie substancji czynnej. Badania aktywności biologicznej wykazały działanie antyseptyczne zapobiegające powstawaniu biofilmu w ranie [Ambrogio V. i współaut., *J Colloid Interface Sci*, 2017, 491, 265–272].

Rozpatrywane sposoby otrzymywania opatrunków przeciwbakteryjnych dotyczą rutynowo używanych w leczeniu związków o udowodnionych właściwościach przeciwbakteryjnych, które jednak przestają być skuteczne ze względu na rosnącą liczbę przypadków wielolekooporności szczepów mikroorganizmów.

Znana w stanie techniki kombinacja antyseptyku, antybiotyku i soli bizmutu hamuje rozwój organizmów antybiotykoopornych (Modak S.M., Tambe S., Sampath L.A. inventors, Combinations of antiseptic and antibiotic agents that inhibit the development of resistant microorganisms, United States Patent, US 2002/0173775 A1, pub. date 2002). Jednakże opisany tam preparat jest luźną mieszaniną składników, nie związanych wiązaniami kowalencyjnymi, korzystnie jeśli zawiera minocyklinę jako antybiotyk, związek chlorheksydyny, triklosan lub chlorek benzalkoniowy jako środek antyseptyczny z dodatkiem soli srebra lub bizmutu.

Istnieje więc uzasadniona potrzeba poszukiwania nowych połączeń o aktywności przeciwdrobnoustrojowej wykazujących większą skuteczność działania w kierunku zakażonych tkanek, hamujących mikroorganizmy antybiotykooporne, jak również nowych sposobów ich leczenia.

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie sposobu otrzymywania nowego dimerycznego kompozytu przeciwbakteryjnego (hybrydy) łączącego cechy antyseptyku i chemioterapeutyku, koncentrującego swoją aktywność leczniczą w obszarze zakażenia, dedykowanego do terapii różnych typów ran (owrzodzenia, odleżyny, zgorzel cukrzycowa, oparzenia, rany pooperacyjne), szczególnie ran trudno gojących się, zapobiegania powikłaniom po zakażeniu ran lub terapii infekcji i stanów zapalnych w obszarze uzębienia lub w obszarze układu moczowo-płciowego.

Kompozyt według wynalazku zawiera bizmut oraz chlorheksydynę (jako ligand x) i fluorochinolon (jako ligand y) w stosunku molowym odpowiednio 1:1:1–3, i ma strukturę kompleksu skomponowanego z ligandów x i y połączonych kowalencyjnie z jonem bizmutu(III) w odróżnieniu od kombinacji znanej w stanie techniki.

Kompozyt korzystnie jako związek bizmutu zawiera: cytrynian bizmutu, amonowo-bizmutowy cytrynian, azotan bizmutu, azotan bizmutylu, fosforan bizmutu, octan bizmutu, chlorek bizmutu, tlenek bizmutu, tlenochlorek bizmutu, wodorotlenek bizmutu, metaboran bizmutu, węgiel bizmutawy, tellurek bizmutu, selenek bizmutu, wanadian bizmutu, szczawian bizmutu, winian bizmutu, dietyloditiokarbaminian bizmutu, zasadowy salicylan bizmutawy, benzoesan bizmutu, kseroform lub inny związek bizmutu uwalniający jon bizmutu(III).

Kompozyt korzystnie jako chlorheksydynę zawiera chlorheksydynę pochodzącą z wolnej zasady oraz soli chlorheksydyny takiej jak dioctan, dichlorowodorek, diglukonian, diazotan, siarczan, winian chlorheksydyny, szczawian, dimrówczan, dipropionian, difosfanilan lub z innego związku uwalniającego chlorheksydynę.

Kompozyt korzystnie jako fluorochinolon zawiera cyprofloksacynę, pefloksacynę, norfloksacynę, moksyflokscynę, lewofloksacynę, flerofloksacynę, lomefloksacynę, ofloksacynę, nadifloksacynę, temafloksacynę, grepafloksacynę, sparfloksacynę, pazufloksacynę lub inny związek z grupy pochodnych 4-chinolonu o aktywności przeciwbakteryjnej.

Korzystnie jako związek fluorochinolonu stosuje się fluorochinolon wolną zasadę lub sól fluorochinolonu taką jak chlorowodorek, metanosulfonian, mleczan, maleinian, adypinian, fumaran, sacharynian lub inny związek uwalniający fluorochinolon.

Sposób otrzymywania kompozytu według wynalazku polega na tym, że sól bizmutu(III) rozpuszcza się w rozcieńczonym kwasie solnym, korzystnie 5%, miesza się z chlorheksydyną i fluorochinolonem, odpowiednio w stosunku 1:1:1 do 1:1:3, dodając substancje równocześnie lub w różnej kolejności, rozpuszczone w wodzie lub wodnym roztworze niższego alkoholu, korzystnie roztworze woda-etanol korzystnie w stosunku 1:1 v/v, mieszaninę reakcyjną miesza się w temperaturze pokojowej lub ogrzewając, korzystnie w temperaturze 40°C, korzystnie przez 0,5–4 h, następnie środowisko reakcji alkalizuje się do strącenia osadu, po czym mieszaninę reakcyjną ze strąconym osadem pozostawia się w temperaturze pokojowej korzystnie na okres 12–24 h, a następnie wytrącony osad sączy się, płucze i suszy. Proces prowadzi się korzystnie z zastosowaniem roztworu wodorotlenku, korzystnie

roztworu wodorotlenku amonowego, korzystnie o stężeniu 25%, lub roztworu wodorotlenku sodu. Wytrącony osad korzystnie płucze się roztworem woda-etanol, 1:1 v/v.

Korzystnie jako związek bizmutu może być stosowany: cytrynian bizmutu, amonowo-bizmutowy cytrynian, azotan bizmutu, azotan bizmutylu, fosforan bizmutu, octan bizmutu, chlorek bizmutu, tlenek bizmutu, tlenochlorek bizmutu, wodorotlenek bizmutu, metaboran bizmutu, węglan bizmutu, węglan bizmutawy, tellurek bizmutu, selenek bizmutu, wanadian bizmutu, szczawian bizmutu, winian bizmutu, dietyloditiokarbaminian bizmutu, zasadowy salicylan bizmutawy, benzoesan bizmutu, kseroform lub inny związek bizmutu uwalniający jon bizmutu(III).

Korzystnie jako chlorheksydynę stosuje się chlorheksydynę w postaci wolnej zasady lub sól chlorheksydyny taką jak dioctan, dichlorowodorek, diglukonian, diazotan, siarczan, winian, szczawian, dimrówczan, dipropionian, difosfanilan lub inny związek uwalniający chlorheksydynę.

Korzystnie jako fluorochinolon stosuje się cyprofloksacynę, pefloksacynę, norfloksacynę, moksyfloksacynę, lewofloksacynę, flerofloksacynę, lomefloksacynę, ofloksacynę, nadifloksacynę, tema-floksacynę, grepafloksacynę, sparfloksacynę, pazufloksacynę lub inny związek z grupy pochodnych 4-chinolonu o aktywności przeciwbakteryjnej.

Korzystnie jako związek fluorochinolonu stosuje się fluorochinolon wolną zasadę lub sól fluorochinolonu taką jak chlorowodorek, metanosulfonian, mleczan, maleinian, adypinian, fumaran, sacharynian lub inny związek uwalniający fluorochinolon.

Otrzymany kompozyt jest nierozpuszczalny w wodzie i bardzo trudno rozpuszczalny w większości rozpuszczalników organicznych m. in. w metanolu, etanolu, DMF, acetonie, octanie etylu, acetonitrylu.

Celem jego rozpuszczenia korzystne jest stosowanie roztworu buforu cytrynianowego o pH 4,3 (0,1 mol/l roztwór kwasu cytrynowego doprowadzony 0,1 mol/l roztworem wodorotlenku sodu do odpowiedniego pH), lub roztworu kwasu cytrynowego o stężeniu w zależności od pożądanego finalnego stężenia kompozytu w postaci farmaceutycznej. Kompozyt według wynalazku wykazuje potencjalną tendencję do hamowania namnażania organizmów antybiotykoopornych oraz różnokierunkowość działania, wobec bakteryjnego DNA i ściany komórkowej bakterii. Kompozyt, w odróżnieniu od kombinacji znanej w stanie techniki, dzięki połączeniu bizmutu z fluorochinolonem (np. cyprofloksacyną) może potencjalnie osłabiać działanie alergizujące fluorochinolonu i może potencjalnie koncentrować swoje działanie w obrębie zainfekowanej tkanki ze względu na znaczną masę i bardzo słabą rozpuszczalność.

Sposób według wynalazku pozwala na otrzymanie przeciwbakteryjnego kompozytu o szerokim spektrum aktywności przeciwbakteryjnej i zintensyfikowanym działaniu wobec bakterii najczęściej wywołujących infekcje ran, uzębienia i dróg moczowo-płciowych, i w odróżnieniu od kombinacji znanej w stanie techniki potencjalnie nieznacznie przenikającego do organizmu po miejscowym zastosowaniu, a tym samym wykazującego stosunkowo niewielkie działania niepożądane – ogólnoustrojowe. Kompozyt dodatkowo może wykazywać właściwości przeciwzapalne z uwagi na obecność atomu bizmutu.

Sposób pozwala otrzymywać kompozycje farmaceutyczne, szczególnie do zastosowania miejscowego, które będą chronić środowisko przed kolonizacją bakterii i tworzeniem biofilmu oraz leczyć infekcje dzięki obecności kompozytu na bazie fluorochinolonu (np. cyprofloksacyny), chlorheksydyny i bizmutu.

**Przykład 1:** 0,0540 g cytrynianu bizmutu (0,136 mmola w przeliczeniu na bizmut) rozpuszczono w 10 ml 5% kwasu solnego i dodano 5 ml roztworu chlorowodoru cyprofloksacyny o stężeniu 0,02 g/ml (0,0600 g; 0,163 mmola w przeliczeniu na cyprofloksacynę), przygotowanego w mieszaninie woda-etanol, w stosunku objętościowym 1:1. Próbę mieszano 15 minut i następnie zalkalizowano środowisko reakcji 25% roztworem wodorotlenku amonowego do zaniku i ponownego wytrącenia osadu. Mieszano 30 minut, kolejno dodano 0,1020 g dioctanu chlorheksydyny (0,163 mmola w przeliczeniu na chlorheksydynę) rozpuszczonego w 10 ml wody i pozostawiono co najmniej 12 godzin w temperaturze pokojowej. Otrzymany osad przesączono, przepłukano kilkakrotnie mieszaniną woda-etanol (1:1 v/v) i wysuszono. Wydajność: 85,26%.

Otrzymano kompozyt, który zawierał: cytrynian bizmutu oraz chlorheksydynę – ligand x i fluorochinolon cyprofloksacynę ligand y w stosunku molowym odpowiednio 1:1:1.

**Przykład 2:** 0,0540 g cytrynianu bizmutu (0,136 mmola w przeliczeniu na bizmut) rozpuszczono w 10 ml 5% kwasu solnego i dodano 0,0699 g metanosulfonianu pefloksacyny (0,163 mmola w przeliczeniu na pefloksacynę) rozpuszczonego w wodzie. Próbę mieszano 15 minut i następnie

zalkalizowano środowisko reakcji 0,1 mol/l roztworem wodorotlenku sodu do wytrącenia osadu. Mieszano 30 minut, kolejno dodano 0,1020 g diocjanu chlorheksydyny (0,163 mmola w przeliczeniu na chlorheksydynę) rozpuszczonego w wodzie i pozostawiono 12 godzin w temperaturze pokojowej. Otrzymany osad przesączono, przepłukano kilkakrotnie mieszaniną woda-etanol (1:1 v/v) i wysuszono. Wydajność: 78,01%.

Otrzymano kompozyt, który zawierał: cytrynian bizmutu oraz chlorheksydynę – ligand x i fluoro-chinolon pefloksacyne – ligand y w stosunku molowym odpowiednio 1:1:1.

**Przykład 3:** Cytrynian bizmutu (0,0540 g; 0,136 mmola w przeliczeniu na bizmut) rozpuszczono w 10 ml 1% kwasu solnego mieszając na mieszadle magnetycznym i ogrzewając w temp. 35°C i dodano 0,0849 g diocjanu chlorheksydyny (0,136 mmola w przeliczeniu na chlorheksydynę) rozpuszczonego w 10 ml mieszaniny woda-etanol (1:1 v/v): Roztwór zalkalizowano 25% roztworem wodorotlenku amonowego do wytrącenia się osadu, a następnie dodano 0,0499 g chlorowodoru cyprofloksacyny (0,136 mmola w przeliczeniu na cyprofloksacyne) rozpuszczonego w 10 ml wody. Inkubowano 3 godziny, ogrzewając w temperaturze, 40°C i mieszając. Następnie, pozostawiono 12 godzin w temperaturze pokojowej. Otrzymany osad przesączono, przepłukano, kilkakrotnie mieszaniną woda-etanol (1:1 v/v) i wysuszono. Wydajność : 79,11%.

Otrzymano kompozyt, który zawierał: cytrynian bizmutu oraz chlorheksydynę – ligand x i fluoro-chinolon cyprofloksacyne – ligand y w stosunku molowym odpowiednio 1:1:1.

**Przykład 4:** Cytrynian bizmutu (0,0540 g; 0,136 mmola w przeliczeniu na bizmut) rozpuszczono w 10 ml 5% kwasu solnego, dodano diocjan chlorheksydyny (0,1020 g, 0,163 mmola w przeliczeniu na chlorheksydynę) rozpuszczony w 10 ml mieszaniny woda-etanol (1:1 v/v) i ogrzewano pół godziny, delikatnie mieszając na mieszadle magnetycznym. Do otrzymanego roztworu dodano chlorowodorek cyprofloksacyny (0,0600 g; 0,163 mmola w przeliczeniu na cyprofloksacyne) rozpuszczony w 10 ml mieszaniny woda-etanol (1:1 v/v) i zalkalizowano 25% roztworem wodorotlenku amonowego. Ogrzewano 3 godziny delikatnie mieszając, a następnie pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Otrzymany osad przesączono, przepłukano kilkakrotnie mieszaniną woda-etanol (1:1 v/v) i wysuszono. Wydajność: 83,23%.

Otrzymano kompozyt, który zawierał: cytrynian bizmutu oraz chlorheksydynę – ligand, x i fluoro-chinolon cyprofloksacyne – ligand y w stosunku molowym odpowiednio 1:1:1.

**Przykład 5:** Cytrynian bizmutu (0,0540 g; 0,136 mmola w przeliczeniu na bizmut) rozpuszczono w 10 ml 10% kwasu solnego mieszając i ogrzewając w temp. 35°C, dodano diocjan chlorheksydyny (0,1020 g, 0,163 mmola w przeliczeniu na chlorheksydynę) rozpuszczony w 10 ml wody i chlorowodorek cyprofloksacyny (0,0600 g; 0,163 mmola w przeliczeniu na cyprofloksacyne) rozpuszczony w 10 ml mieszaniny woda-etanol (1:1 v/v) i ogrzewano godzinę, delikatnie mieszając. Następnie mieszaninę reakcyjną zalkalizowano 0,1 mol/l roztworem wodorotlenku sodu. Ogrzewano 3 godziny delikatnie mieszając, a następnie pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Otrzymany osad przesączono, przepłukano kilkakrotnie mieszaniną woda-etanol (1:1 v/v) i wysuszono. Wydajność: 78,00%

Otrzymano kompozyt, który zawierał: cytrynian bizmutu oraz chlorheksydynę - ligand x i fluoro-chinolon cyprofloksacyne – ligand y w stosunku molowym odpowiednio 1:1:1.

**Przykład 6:** 0,0980 g chlorowodoru cyprofloksacyny (0,271 mmola w przeliczeniu na cyprofloksacyne) rozpuszczono w 10 ml mieszaniny woda-metanol (1:1 v/v), następnie dodano, do 0,0540 g cytrynianu bizmutu (0,136 mmola w przeliczeniu na bizmut) rozpuszczonego w 10 ml 5% kwasu solnego. Mieszano pół godziny, po czym dodano 0,0849 g diocjanu chlorheksydyny (0,136 mmola w przeliczeniu na chlorheksydynę) rozpuszczonej w 10 ml wody, a następnie mieszaninę reakcyjną zalkalizowano dodając kilka kropli 0,1 mol/l roztworu wodorotlenku sodu celem wytrącenia osadu. Mieszaninę z osadem pozostawiono 12 h, po, czym przesączono, przepłukano kilkakrotnie mieszaniną woda-metanol i wysuszono w temperaturze pokojowej. Wydajność: 82,03%

Otrzymano kompozyt, który zawierał: cytrynian bizmutu oraz chlorheksydynę – ligand x i fluoro-chinolon cyprofloksacyne – ligand y w stosunku molowym odpowiednio 1:1:2.

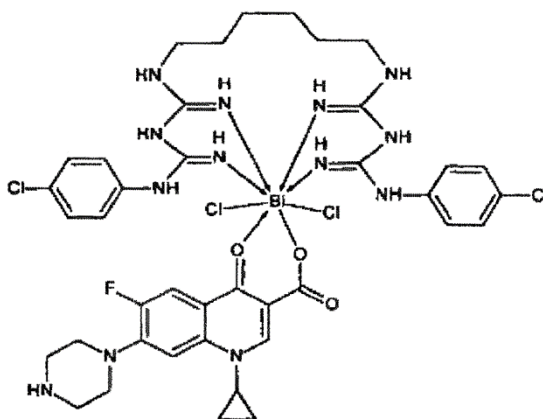
**Przykład 7:** 0,0600 g chlorowodoru cyprofloksacyny (0,163 mmola w przeliczeniu na cyprofloksacyne) rozpuszczono w 10 ml mieszaniny woda-metanol (1:1 v/v), dodano 0,1020 g diocjanu chlorheksydyny (0,163 mmola w przeliczeniu na chlorheksydynę) rozpuszczonego w 10 ml mieszaniny woda-metanol (1:1 v/v) i mieszano 15 min ogrzewając w temp. 40°C. Następnie dodano cytrynian bizmutu (0,0540 g; 0,136 mmola w przeliczeniu na bizmut) rozpuszczony w 5% kwasie solnym. Próbę mieszano 15 minut delikatnie ogrzewając, następnie zalkalizowano środowisko reakcji roztworem wodorotlenku sodu o stężeniu 2 mol/l, pozostawiono 12 godzin w temperaturze pokojowej. Otrzymany

osad przesączono, przepłukano kilkakrotnie mieszaniną woda-metanol (1:1 v/v) i wysuszono. Wydajność: 81,32%

Otrzymano kompozyt, który zawierał: cytrynian bizmutu oraz chlorheksydynę – ligand x i fluorochinolon cyprofloksacynę – ligand y w stosunku molowym, odpowiednio 1:1:1.

Do oceny struktury, aktywności przeciwbakteryjnej i cytotoksyczności wybrano kompozyt cyprofloksacyna-bizmut-chlorheksydyna (CIP-Bi-CHX)

Struktura kompozytu określona na podstawie analizy pierwiastkowej i instrumentalnej



**Wzór sumaryczny:  $C_{39}H_{47}BiCl_4FN_{13}O_3$**

**Masa molowa: 1115,67 g/mol**

**Temperatura topnienia: 294,7°C**

Widma NMR kompozytu CIP-Bi-CHX wskazują na obecność cyprofloksacyny i chlorheksydyny, gdyż zawierają sygnały charakterystyczne dla tych substancji. Analiza porównawcza widm NMR, wskazuje również na wiązanie CIP i CHX poprzez atom bizmutu z uwagi na pojawienie się znacznych zmian sygnałów w widmie kompozytu w porównaniu do tych samych sygnałów w widmach substancji macierzystych. Zmiany dotyczą różnic w multipletowości pasm (dodatkowy pik lub zanik pików), rozszerzenia pasm, różnicy w intensywności pasm (głównie redukcja sygnału), znacznych przesunięć pasm jak również zanik pasm. Zmiany świadczą o zdecydowanej ingerencji w cząsteczki substancji niezwiązanych z możliwością tworzenia struktury kompozytowej, a nawet hybrydowej (tworzenia wiązań atomowych i koordynacyjnych).

W widmie  $^1H$  NMR kompozytu są obecne pasma protonowe charakterystyczne dla cyprofloksacyny: 1.19, 1.30–1.33, 3.84–3.85, 7.55–8.66, zaś pasmo protonowe grupy karboksylowej: 15.14 znika prawdopodobnie ze względu na podstawienie atomu wodoru grupy karboksylowej atomem bizmutu.

W widmie  $^1H$  NMR kompozytu są obecne pasma protonowe charakterystyczne dla chlorheksydyny: 1.29, 1.46, 3.04–3.08, 7.31–7.43. Pasma protonowe szczególnie ugrupowania biguanidynowego chlorheksydyny w zakresie 7.26–7.39 uległy znacznym przesunięciom po włączeniu jej w strukturę kompozytu.

Zmiany w widmach  $^{13}C$  NMR kompozytu w odniesieniu do widm substancji macierzystych są podobne do obserwowanych w widmie  $^1H$  NMR co potwierdza wiązanie tych substancji z możliwością tworzenia kompozytu.

Widma  $^1H$  NMR ( $d_6$ -DMSO, ppm)

CIP HCl: 1.19, 1.20, 1.32, 1.34, 3.57, 3.85, 3.87, 3.88, 7.60, 7.63, 7.93, 7.98, 8.68, 9.43, 15.14 (-COOH)

CHX  $2CH_3COOH$ : 1.26, 1.44, 1.72 (-CH<sub>3</sub> w octanie), 3.04, 3.06, 3.09, 7.26, 7.28, 7.29, 7.39

CIP-Bi-CHX: 1.19, 1.29, 1.30, 1.33, 1.46, 3.04, 3.08, 3.84, 3.85, 7.31, 7.34, 7.41, 7.43, 7.55, 7.57, 7.88, 7.92, 8.66

Widma  $^{13}C$  NMR ( $d_6$ -DMSO, ppm)

CIP HCl: 8.09, 36.47, 42.95, 46.78, 46.84, 107.29, 107.41, 111.50, 111.81, 119.76, 119.87, 139.55, 144.54, 144.68, 148.70, 151.70, 155.01, 166.33, 176.84, 176.87

CHX 2CH<sub>3</sub>COOH: 25.29 (-CH<sub>3</sub> w octanie), 26.37, 122.47, 126.18, 128.69 160.07, 176.39 (-COOH w octanie)

CIP-Bi-CHX: 8.05, 26.39, 36.37, 44.89, 49.79, 106.81, 107.23, 111.30, 111.61, 119.08, 119.18, 122.16, 126.73, 128.93, 138.28, 138.76, 139.66, 145.64, 145.77, 148.48, 151.82, 155.13, 155.38, 160.74, 166.45, 176.81

#### Badania mikrobiologiczne

Kompozyt (CIP-Bi-CHX) zsyntetyzowany według wymienionych przykładów z użyciem chemioterapeutyku – cyprofloksacyny (CIP) i antyseptyku – chlorheksydyny (CHX), poddano ocenie aktywności przeciwbakteryjnej wobec wybranych szczepów drobnoustrojów:

- bakterii tlenowych Gram-dodatnich:
  - *Staphylococcus aureus* A TCC 25923.
  - *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.
- bakterii tlenowych Gram-ujemnych:
  - *Escherichia coli* A TCC 25992.
  - *Pseudomonas aeruginosa* 71 TCC 27853.

**Ocena stref zahamowania wzrostu bakterii** z użyciem testu przesiewowego polegającego na dyfuzji substancji czynnej do pożywki stałej Müeller-Hinton. Doświadczenie – przygotowano kolejno: roztwory lub zawiesiny badanych substancji o stężeniu 10 mg/ml w DMSO; pożywki Müeller-Hinton agar, które wylano w ilości ok. 20 ml na płytki Petry'ego i pozostawiono do zastygnięcia w temperaturze pokojowej; inokulum bakteryjne o stężeniu 0,5 McFarlanda używając wymienionych szczepów bakterii.

Zawiesiny poszczególnych bakterii zaszczepiono za pomocą głaszczki na zastygniętych płytkach, a następnie na oznaczone odpowiednie miejsca płytki naniesiono przygotowane wcześniej roztwory badanych związków o stężeniu końcowym 100 µg. Gotowe płytki inkubowano 24 godziny w temp. 37°C, w warunkach tlenowych. Po okresie inkubacji zmierzono za pomocą linijki mikrobiologicznej powstałe strefy zahamowania wzrostu bakterii wytworzone wokół badanych związków. Wyniki doświadczenia przedstawia poniższa tabela:

Badany związek	Strefy zahamowania wzrostu [mm]			
	bakterii Gram-		bakterii Gram+	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Cyprofloksacyna (CIP), w postaci chlorowodoru	42	28	40	38
Chlorheksydyna (CHX) w postaci diocjanu	12	10	19	18
Kompozyt (CIP-Bi-CHX)	44	40	42	38

Przedstawione dane liczbowe wskazują na intensyfikację aktywności przeciwbakteryjnej otrzymanego kompozytu w odniesieniu do związków użytych do jego syntezy wobec bakterii *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*, z pośród których *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* uważane są za najczęstszy czynnik etiologiczny wywołujący zakażenia ran, w tym zakażenia owrzodzeń stopy cukrzycowej i oparzeń (Arkadiusz Jawień i inni. Wytyczne postępowania miejscowego i ogólnego w ranach objętych procesem infekcji. Leczenie Ran 2012, 9(3), 59–75). Największą strefę zahamowania wzrostu wykazywał badany kompozyt w stosunku do *E. coli*, zaś największą, intensyfikację aktywności przeciwbakteryjnej zaobserwowano wobec *P. aeruginosa*.

#### Ocena stopnia wrażliwość testowanych komórek bakteryjnych

Celem określenia stopnia wrażliwość testowanych komórek bakteryjnych w odniesieniu do kompozytu wyznaczono wartości MIC (ocena ilościowa wrażliwości) i MBC (im niższe wartości MIC/MBC tym większa wrażliwość):

- gdy wartość MBC jest  $\leq 4$  razy MIC, środki przeciwbakteryjne traktowane są zazwyczaj jako bakteriobójcze względem danego patogenu
- gdy wartość MBC jest ponad 4 razy  $>$  niż MIC, środki przeciwbakteryjne traktowane są jako bakteriostatyczne względem danego, patogenu

Celem określenia skuteczności przeciwbakteryjnej kompozytu wyznaczono wartość MBC/MIC (im niższa wartość MBC/MIC tym środek bardziej skuteczny)

• wartość MBC/MIC wynosząca 32 lub większa świadczy o wystąpieniu zjawiska tolerancji komórek bakteryjnych na terapeutyk w danych warunkach.

**Ocena minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIC).** Wartość MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) w odniesieniu do kompozytu wyznaczono z zastosowaniem metody szeregu mikrorozcieńczeń w płytках 96-dołkowych, w odpowiednich pożywkach bakteryjnych. W tym celu sporządzono roztwory badanych substancji o stężeniu 50 mg/ml w odpowiednim rozpuszczalniku, nie wykazującym hamującego wpływu na testowane bakterie (2,5% kwas octowy) oraz inokulum bakteryjne o stężeniu 0,5 McFarlanda badanych drobnoustrojów (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*). Do pierwszego dołka w płytce odmierzone 392  $\mu\text{l}$ , a do pozostałych 200  $\mu\text{l}$  bulionu Müller-Hinton. Następnie do pierwszego dołka dodano 8,16  $\mu\text{l}$  roztworu testowanej substancji i na zasadzie podwójnych mikrorozcieńczeń uzyskiwano stężenia końcowe: 1000; 500; 250; 125; 62.5; 31.25; 15.62; 7.81; 3.91; 1.96; 0.976; 0.488; 0.244; 0.122; 0.061; 0.0305  $\mu\text{g/ml}$ . W kolejnym etapie każdy dołek zaszczipiano daną bakterią w ilości 2  $\mu\text{l}$ . W każdej płytce przygotowywano także kontrolę dodatnią (czyli bulion zaszczipiony daną bakterią) oraz kontrolę ujemną (czysty bulion) w celu oceny poprawności i jałowości prowadzonego doświadczenia. Gotowe płytki inkubowano w odpowiednich warunkach (temp. 37°C, 24 godziny, warunki tlenowe). Odczyt wykonano z użyciem czytnika płytek BioTek przy długości fali 600 nm. Wyznaczone wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIC) dla testowanych związków, wobec tlenowych bakterii Gram ujemnych i Gram dodatnich przedstawia poniższa tabela.

Badany związek	Wartości MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ]			
	bakterii Gram-		bakterii Gram+	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
<b>Cyprofloksacyna (CIP), w postaci chlorowodorku</b>	0.122	0.122	0.0305	0.122
<b>Chlorheksydyna (CHX) w postaci diocjanu</b>	0.488	7.800	0.488	0.244
<b>Kompozyt (CIP-BI-CHX)</b>	0.122	0.244	0.488	0.122

Wyniki wskazują, że otrzymany kompozyt jest aktywniejszy od chlorheksydyny w stosunku do *S. epidermidis*, *E. coli* i *P. aeruginosa*, szczególnie wobec *P. aeruginosa*. W pozostałych rozpatrywanych przypadkach jego aktywność jest równa lub nieznacznie niższa w porównaniu z aktywnością chlorheksydyny i cyprofloksacyny, jako związków użytych do jego syntezy.

**Ocena minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC)**, przy którym 99,9% bakterii ginie. Wartość MBC ( $\mu\text{g/ml}$ ) wyznaczono w odniesieniu do kompozytu wykorzystując 96-dołkowe płytki, w których uprzednio oznaczano wartości MIC dla konkretnych związków, wobec wybranych szczepów bakterii (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*). Z dołków, w których nie odnotowano wzrostu bakterii pobierano 10  $\mu\text{l}$  medium zawierającego malejące stężenie badanego związku i przenoszono na czyste płytki Petry'ego z odpowiednim podłożem agarowym (Müller-Hinton dla bakterii tlenowych lub BHI dla bakterii mikroaerobowych). Następnie płytki inkubowano 24 godziny w temp. 37°C, w warunkach tlenowych. Po inkubacji oceniano ewentualny wzrost bakterii. Płytki zawierające medium ze stężeniem substancji czynnej, gdzie nie pojawiały się kolonie uznano za stężenie bakteriobójcze (MBC). Wyznaczone wartości minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) dla testowanych związków wobec tlenowych bakterii Gram ujemnych i Gram dodatnich przedstawia poniższa tabela:

Badany związek	Wartości MBC [ $\mu\text{g/ml}$ ]			
	bakterii Gram-		bakterii Gram+	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Cyprofloksacyna (CIP), w postaci chlorowodorku	0.244	0.244	0.061	0.244
Chlorheksydyna (CHX) w postaci diocjanu	1.953	62.500	0.976	0.488
Kompozyt (CIP-Bi-CHX)	0.244	0.488	1.953	0.976

Obliczone wartości MBC/MIC określające skuteczność testowanych związków wobec tlenowych bakterii Gram ujemnych i Gram dodatnich przedstawia poniższa tabela:

Badany związek	Wartości MBC/MIC			
	bakterii Gram-		bakterii Gram+	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Cyprofloksacyna (CIP), w postaci chlorowodorku	2	2	2	2
Chlorheksydyna (CHX) w postaci diocjanu	4	8	2	2
Kompozyt (CIP-Bi-CHX)	2	2	4	8

Wyniki wskazują, że kompozyt ma bakteriobójczy charakter w stosunku do testowanych bakterii z wyjątkiem *S. epidermidis*, gdzie stosunek MBC/MIC wynoszący 8 świadczy o bakteriostatycznej aktywności i jest skuteczniejszy wobec bakterii Gram- niż wobec bakterii Gram+. Chlorheksydyna jest bakteriostatyczna względem *P. aeruginosa* i bakteriobójcza w stosunku do pozostałych testowanych bakterii. Cyprofloksacyna zaś ma charakter bakteriobójczy w stosunku do wszystkich testowanych bakterii.

Wniosek:

Kompozyt CIP-Bi-CHX złożony z cyprofloksacyny i chlorheksydyny związanych poprzez atom bizmutu wykazuje aktywność bakteriobójczą wobec bakterii najczęściej wywołujących zakażenia ran: *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* podobnie do cyprofloksacyny. Ze względu zaś na fakt, że jest związkiem nowym, może, być skuteczniejszy od cyprofloksacyny wobec której, bakterie wykształciły mechanizmy oporności.

#### Ocena cytotoksyczności kompozytu

Dla „właściwej oceny cytotoksyczności zastosowano kilka linii, komórkowych jako że różniące się pochodzeniem linie komórkowe mogą wykazywać odmienną-wrażliwość na tę samą substancję (Gruber B, Anuszewska E. Ocena działania cytotoksycznego nowych pochodnych antracyklinowych w układzie różnych linii komórkowych, Biuletyn IL, 2001,45(3), 569–578).

W badaniu wykorzystano linię komórkową FaDu (ATCC – HTB-43) pochodzącą z ludzkiego raka płaskonabłonkowego krtani. RAW 264.7 (ATCC –TIB-71) otrzymaną z mysich makrofagów oraz Vero (ECACC – 84113001) pochodzącą z nerki afrykańskiej małpy zielonej. Do prowadzenia hodowli komórek FaDu użyto podłoże Minimum Essential Medium (MEM). natomiast podłoże Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) zastosowano do hodowli komórek RAW 264.7 i Vero. Podłoża uzupełniano 10% surowicy (FBS) oraz 100 U/ml penicyliny i 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycyny.

Testowane substancje rozpuszczono w 10% kwasie cytrynowym do końcowego stężenia 1 mg/ml. Hodowle komórek prowadzono w płytkach 96-dołkowych do których rozlewano po 100  $\mu\text{l}$  zawiesiny komórek o gęstości odpowiednio  $2 \times 10^4$  (FaDu),  $4 \times 10^4$  (RAW 264.7) oraz  $1,5 \times 10^4$  komór-

rek na dołek przygotowanej w podłożu hodowlanym z dodatkiem 10% surowicy. Po 24 h inkubacji w temp. 37°C podłoże z hodowli usuwano i dodawano roztwory badanych ekstraktów w płynie hodowlanym z dodatkiem 2% surowicy. Końcowe stężenia substancji wyniosły 0,25; 0,5; 1; 2; 3,9; 7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125 µg/ml. Do kontroli hodowli komórek dodawano tylko płyn hodowlany z dodatkiem 2% surowicy. Komórki poddane działaniu testowanych substancji inkubowano w temp. 37°C w obecności 5% CO<sub>2</sub> przez 48 h.

Cytotoksyczność substancji oceniano ilościowo przy użyciu testu formazanowego, MTT (Rajtar B. i inni, journal of Pre-Ginical and Clinical Research, 2013, 7,104–106) stosując czytnik do płytek przy długości fali 540 i 620 nm.

Na podstawie pomiarów określano wartość IC<sub>50</sub>, czyli stężenie badanego związku, które spowodowało spadek aktywności użytej populacji komórek o 50%. w porównaniu z kontrolą. Otrzymane wyniki przedstawia poniższa tabela:

Badany związek	Linia komórkowa		
	FaDu	RAW 264.7	Vero
	IC <sub>50</sub> (µg/mL) ± SD		
Kompozyt (CIP-Bi-CHX)	3.86 ± 0.59	1.90 ± 0.06	29.4 ± 2.36
Cyprofloksacyna (CIP), w postaci chlorowodoru	13.74 ± 1.96	25.48 ± 1.93	35.95 ± 3.89
Chlorheksydyna (CHX) w postaci diocjanu	1.87 ± 0.19	0.92 ± 0.08	11.65 ± 1.29
Kwas cytrynowy (rozpuszczalnik)	16.15 ± 2.71	27.00 ± 2.69	33.5 ± 7.89

Kompozyt CIP-Bi-CHX zsyntetyzowany *de novo* według podanych wyżej przykładów i poddany ocenie cytotoksyczności przy użyciu wszystkich wykorzystanych linii komórkowych wykazał toksyczność ponad 2 razy mniejszą niż chlorheksydyna użyta do jego syntezy. Kompozyt jak również substancje użyte do jego syntezy najmniejszą toksyczność wykazały w stosunku do linii komórkowej nerki mały zielonej, która to linia wydaje się najbardziej odpowiadać komórkom człowieka. W stosunku do tej linii, kompozyt charakteryzował się znacznie mniejszą toksycznością (2,5 razy mniejszą) w odniesieniu do chlorheksydyny użytej do jego syntezy i nieznacznie większą toksycznością w odniesieniu do cyprofloksacyny użytej również do jego syntezy.

Z punktu widzenia cytotoksyczności, korzystne jest stosowanie chlorheksydyny w postaci zaproponowanego kompozytu ze względu na znaczną redukcję jej cytotoksyczności przy zachowaniu spektrum działania z jednoczesną intensyfikacją skuteczności przeciwbakteryjnej.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozyt przeciwbakteryjny do profilaktyki lub leczenia, zwłaszcza miejscowych zakażeń, z zawartością fluorochinolonu (chemioterapeutyk) i chlorheksydyny (antyseptyk) **znamienny tym**, że zawiera bizmut oraz chlorheksydynę – ligand x i fluorochinolon – ligand y w stosunku molowym odpowiednio 1:1:1-3, i ma strukturę kompleksu skomponowanego z ligandów x i y połączonych kowalencyjnie z jonem bizmutu(III).
2. Kompozyt według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera bizmut pochodzący ze związku bizmutu takiego jak: cytrynian bizmutu, amonowo-bizmutowy cytrynian, azotan bizmutu, azotan bizmutylu, fosforan bizmutu, octan bizmutu, chlorek bizmutu, tlenek bizmutu, tlenochlorek bizmutu, wodorotlenek bizmutu, metaboran bizmutu, węglan bizmutu, węglan bizmutawy, tellurek bizmutu, selenek bizmutu, wanadian bizmutu, szczawian bizmutu, winian bizmutu, dietyloditiokarbaminian bizmutu, zasadowy salicylan bizmutawy, benzoesan bizmutu, kseroform lub innego związku bizmutu uwalniającego jon bizmutu(III).
3. Kompozyt według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera chlorheksydynę pochodzącą z wolnej zasady lub soli takiej jak: diocjan chlorheksydyny, dichlorowodorek chlorheksydyny,

- diglukonian chlorheksydyny, diazotan chlorheksydyny, siarczan chlorheksydyny, winian chlorheksydyny, szczawian chlorheksydyny, dimrówczan chlorheksydyny, dipropionian chlorheksydyny, difosfanilan chlorheksydyny lub innego związku uwalniającego chlorheksydynę.
4. Kompozyt według zastrz.1, **znamienny tym**, że jako fluorochinolon zawiera cyprofioksacyne, pefloksacyne, norfloksacyne, moksyfloksacyne, lewofloksacyne, flerofloksacyne, lomefioksacyne, ofloksacyne, nadifloksacyne, temaflloksacyne, grepafloksacyne, sparfloksacyne, pazufloksacyne lub inny związek z grupy pochodnych 4-chinolonu o aktywności przeciwbakteryjnej pochodzący z preparatu w postaci wolnej zasady lub związku fluorochinolonu takiego jak: chlorowodorek, metanosulfonian, mleczan, maleinian, adypinian, fumaran, sacharynian lub innego związku uwalniającego fluorochinolon.
  5. Sposób otrzymywania kompozytu przeciwbakteryjnego z zawartością fluorochinolonu (chemioterapeutyk) i chlorheksydyny (antyseptyk), **znamienny tym**, że sól bizmutu(III) rozpuszcza się w rozcieńczonym kwasie solnym, korzystnie 5%, miesza się z chlorheksydyną i fluorach inolonem, odpowiednio w stosunku 1:1:1 do 1:1:3, dodając substancje równocześnie lub w różnej kolejności, rozpuszczone w wodzie lub wodnym roztworze niższego alkoholu, korzystnie roztworze woda-etanol korzystnie w stosunku 1:1 v/v, mieszaninę reakcyjną miesza się w temperaturze pokojowej lub ogrzewając korzystnie w temperaturze 40°C, korzystnie przez 0,5–4 h, następnie środowisko reakcji alkalizuje się do strącenia osadu, po czym mieszaninę reakcyjną ze strąconym osadem pozostawia się w temperaturze pokojowej korzystnie na okres 12–24 h, a następnie wytrącony osad sący się, płucze i suszy.
  6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że proces prowadzi się z zastosowaniem roztworu wodorotlenku, korzystnie roztworu wodorotlenku amonowego, korzystnie o stężeniu 25%, lub roztworu wodorotlenku sodu.
  7. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że wytrącony osad płucze się roztworem woda-etanol, 1:1 v/v.
  8. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że jako związek bizmutu może być stosowany: cytrynian bizmutu, amonowo-bizmutowy cytrynian, azotan bizmutu, azotan bizmutylu, fosforan bizmutu, octan bizmutu, chlorek bizmutu, tlenek bizmutu, tlenochlorek bizmutu, wodorotlenek bizmutu, metaboran bizmutu, węglan bizmutu, węglan bizmutawy, tellurek bizmutu, selenek bizmutu, wanadian bizmutu, szczawian bizmutu, winian bizmutu, dietyloditiokarbaminian bizmutu, zasadowy salicylan bizmutawy, benzoesan bizmutu, ksero form lub inny związek bizmutu uwalniający jon bizmutu(III).
  9. Sposób otrzymywania kompozytu przedwbakteryjnego według zastrzeżenia 5, **znamienny tym**, że jako związek chlorheksydyny stosuje się chlorheksydynę wolną zasadę lub sól chlorheksydyny taką jak dioctan chlorheksydyny, dichlorowodorek chlorheksydyny, diglukonian chlorheksydyny, diazotan chlorheksydyny, siarczan chlorheksydyny, winian chlorheksydyny, szczawian chlorheksydyny, dimrówczan chlorheksydyny, dipropionian chlorheksydyny, difosfanilan chlorheksydyny lub inny związek uwalniający chlorheksydynę.
  10. Kompozyt według zastrz.1, **znamienny tym**, że jako fluorochinolon zawiera cyprofioksacyne, pefloksacyne, norfloksacyne, moksyfloksacyne, lewofloksacyne, flerofioksacyne, lomefioksacyne, ofloksacyne, nadifloksacyne, temaflloksacyne, grepafloksacyne, sparfloksacyne, pazufloksacyne lub inny związek z grupy pochodnych 4-chinolonu o aktywności przeciwbakteryjnej w postaci wolnej zasady lub soli fluorochinolonu takiej jak chlorowodorek, metanosulfonian, mleczan, maleinian, adypinian, fumaran, sacharynian lub w innej postaci uwalniającej fluorochinolon.