



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 95106086.4

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

A61K 9/02

[43]公开日 1996年7月10日

[22]申请日 95.6.2

[30]优先权

[32]94.9.7 [33]US[31]08 / 301,966

[71]申请人 莱弗实验有限公司

地址 美国加利福尼亚

[72]发明人 拉里·C·福特

[74]专利代理机构 北京市中原信达知识产权代理公司  
司

代理人 王达佐

权利要求书 6 页 说明书 32 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 杀病毒、杀菌以及杀精子的阴道栓

[57]摘要

一种阴道栓或其他类型的阴道 passary，例如乳油，泡腾剂或软膏，包含有作为活性成分的至少一种药物学上可接受的，局部安全的抗菌剂，如一种选自于杀藻铵，十六烷基吡啶氯化物，洗必太葡萄糖酸酯以碘伏，咪唑烷基脲和二唑烷基脲的药剂，以及一种微胶囊包被的乳杆菌活菌落。该活乳杆菌以微胶囊包被形式存在于阴道栓中，微胶囊能保护细菌在阴道栓贮存期间免受杀菌剂的作用。当暴露于阴道环境中时，微胶囊的包被作用被完全打破而释放出乳杆菌。

## 权利要求书

---

1. 一种阴道 passary, 它包含:

有效量的一种药物学上可接受的局部可用的抗菌剂; 至少约  $10^3$  个活细菌数的嗜酸乳杆菌种或该种的 *Lactobacillus rhamnosus* 变种, 所述细菌是由微胶囊包被的, 在该胶囊中, 尽管存在抗菌剂但在 passary 贮存期间细菌保持存活, 作为包被细菌的胶囊膜材料是在阴道环境中较长期接触水分后能释放出细菌的物质, 以及

一种与抗菌剂和微胶囊包被细菌物底混合的药物学上可接受的赋形剂。

2. 根据权利要求 1 所述的阴道 Passary, 它进一步含有有效量的杀精子剂。

3. 根据权利要求 1 所述的阴道 passary, 它进一步包含有效量的药物学上可接受的缓冲体系, 该体系将该 passary 的 pH 值缓冲在 3.0 至 5.0 范围内。

4. 根据权利要求 3 所述阴道 passary, 其中的缓冲体系缓冲于 pH4.3—4.5 范围内。

5. 根据权利要求 1 所述阴道 passary, 其中抗菌剂选自于由杀藻铵, 甲基氯化苄乙氧铵, 十六烷基吡啶氯化物, 烷基三甲基铵溴化物, 洗必太葡萄糖酸酯以及碘伏组成的组。

6. 根据权利要求 1 所述阴道 passary, 它包含至少三种抗菌剂的混合物, 其中之一选自于由杀藻铵, 甲基氯化苄乙氧

铵,十六烷基吡啶氯化物,烷基三甲基铵溴化物,洗必太葡萄糖酸酯以及碘伏,其他两种抗菌剂是咪唑烷基脲和二唑烷基脲。

7. 根据权利要求1所述阴道 passary,其中嗜酸乳杆菌或 *Lactobacillus rhamnosus* 细菌是用海藻酸钠膜包被的。

8. 根据权利要求1所述阴道 passary,其中嗜酸乳杆菌或 *Lactobacillus rhamnosus* 细菌包囊于丙烯酸异丁烯酸共聚物膜中。

9. 根据权利要求1所述阴道 passary。其中的嗜酸乳杆菌或 *Lactobacillus rhamnosus* 包囊于由聚乙烯吡咯烷酮和二乙烯苯组成的膜中。

10. 根据权利要求1所述阴道 passray,其中嗜酸乳杆菌或 *Lactobacillus rhamnosus* 包囊于由 polyvinylpovidone 组成的膜中。

11. 根据权利要求1所述阴道 passary,它还含有有效地增加子宫粘液粘性所需量的抗坏血酸。

12. 一种阴道栓,它含有:

有效量的药物学上可接受的,可局部使用的抗菌剂;

至少约  $10^3$  个活细菌数的嗜酸乳杆菌种或其 *Lactobacillus rhamnosus* 变种,所述细菌由微胶囊包被,在胶囊中,尽管阴道栓在贮存期间有抗菌剂存在但细菌保持存活,作为包囊细菌的膜材料的物质是那些在阴道环境中与水分长期接触后能释放出细菌的物质,以及

与抗菌剂和微胶囊包被的细菌彻底混合的药物学上可

接受的赋形剂。

13. 根据权利要求 12 所述阴道栓,它还含有有效量的选自于 nonoxynol 9 和 octoxynol 9 组成组中的杀精子剂。

14. 根据权利要求 13 所述阴道栓,它还含有有效量的药理学上可接受的缓冲体系,该体系能将阴道栓的 pH 值缓冲于 3.0 至 5.0 的范围内。

15. 根据权利要求 14 所述阴道栓,其中的缓冲体系缓冲于 4.3 至 4.5 的范围内。

16. 根据权利要求 15 所述阴道栓,其中抗菌剂选自于由杀藻铵,甲基氯化苄乙氧铵,十六烷基吡啶氯化物,烷基三甲基铵溴化物,洗必太葡萄糖酸酯,以及碘伏组成的组中。

17. 根据权利要求 16 所述阴道栓,它含有至少三种抗菌剂的混合物,其中之一选自于由杀藻铵,甲基氯化苄乙氧铵,十六烷基吡啶氯化物,洗必太葡萄糖酸酯以及碘伏组成的组,其他两种抗菌剂是咪唑烷基脲和二唑烷基脲。

18. 根据权利要求 17 所述阴道栓,包含有至少  $10^6$  个嗜酸乳杆菌种或其 *Lactobacillus rhamnosus* 变种的活细菌。

19. 根据权利要求 18 所述阴道栓,其中的嗜酸乳杆菌或 *Lactobacillus rhamnosus* 细菌包囊于海藻酸钠膜中。

20. 根据权利要求 18 所述阴道栓,其中的嗜酸乳杆菌或 *Lactobacillus rhamnosus* 包囊于丙烯酸异丁烯酸共聚物膜中。

21. 根据权利要求 18 所述阴道栓,其中的嗜酸乳杆菌或 *Lactobacillus rhamnosus* 包囊于由聚乙烯吡咯烷酮和二乙烯苯组成的膜中。

22. 根据权利要求 18 所述阴道栓, 其中的嗜酸乳杆菌或 *Lactobacillus rhamnosus* 包囊于由 polyvinylpovidone 组成的膜中。

23. 根据权利要求 12 所述阴道栓, 包含有 12 至 3000mg 的杀藻铵或甲基氯化苄乙氧铵或 25—4000mg 的十六烷基吡啶氯化物, 或 10—2000mg 的洗必太葡萄糖酸酯或 25—5000mg 的碘伏。

24. 根据权利要求 12 所述阴道栓, 它含有大约 10—1000mg 的咪唑烷基脲或二唑烷基脲。

25. 根据权利要求 12 所述阴道栓, 它含有大约 50 至 500mg 和 nonoxynol 9 或 octoxynol 9。

26. 根据权利要求 12 所述阴道栓, 它还含有能有效地增加子宫粘液的粘性所需量的抗坏血酸。

27. 根据权利要求 26 所述阴道栓, 它含有 40—120mg 的抗坏血酸。

28. 一种阴道栓, 它含有:

有效量的药理学上可接受的, 可局部使用的抗菌剂, 该抗菌剂选自于由 12—3000mg 量的杀藻铵, 12—3000mg 量的甲基氯化苄乙氧铵, 25—4000mg 的十六烷基吡啶氯化物, 25—4000mg 量的烷基三甲基铵氯化物, 以及 25—5000mg 量的碘伏组成的组;

10—1000mg 的咪唑烷基脲;

10—1000mg 的二唑烷基脲;

50—500mg 的 nonoxynol 9 或 octoxynol 9;

40—120mg 的抗坏血酸；

有效量的药物学上可接受的缓冲体系，该缓冲体系可将该阴道栓的 pH 值缓冲于 4.3—4.5 的范围内；

至少约  $10^3$  个嗜酸乳杆菌种或 *Lactobacillus rhamnosus* 变种的活细菌，所述细菌由微胶囊包被的，该胶囊在阴道栓贮存期间尽管由于存在抗菌剂但细菌仍保持存活，用于包囊细菌的膜材料是那些在阴道环境中长期接触水气后能释放细菌的物质，以及

与抗菌剂和微胶囊包被的细菌彻底混合的药物学上可接受的赋形剂。

29. 根据权利要求 28 所述阴道栓，其中抗菌剂是杀藻铵，并且其中每个阴道栓含有大约 120mg 的杀藻铵。

30. 根据权利要求 28 所述阴道栓，其中抗菌剂是十六烷基吡啶氯化物，其中每个阴道栓含有大约 50—1000mg 的十六烷基吡啶氯化物。

31. 根据权利要求 28 所述的阴道栓，其中抗菌剂是洗必太葡萄糖酸酯，其中每个阴道栓含有大约 25—1200mg 的洗必太葡萄糖酸酯。

32. 根据权利要求 28 所述阴道栓，其中抗菌剂是碘伏，并且每个阴道栓含有约 120mg 的碘伏。

33. 根据权利要求 28 所述阴道栓，其中细菌是 *Lactobacillus rhamnosus*，该细菌包囊于膜材料中，该材料选自于由微包胶膜组成的组，该组材料包括：海藻酸钠膜，丙烯酸异丁烯酸共聚体膜，聚乙烯吡咯烷酮和二乙烯苯膜，以及

polyvinylpovidone 膜。

34. 根据权利要求 30 所述阴道栓,其总质量接近于约 1.2 克。

35. 根据权利要求 33 所述阴道栓,它含有作为赋形剂的羟丙基甲基纤维素和二氧化硅。

# 说 明 书

---

## 杀病毒、杀菌以及杀精子的阴道栓

本申请是申请日为 1993 年 12 月 3 日,申请号为 08/161,659 的申请的继续部分。

本发明属于杀菌,杀病毒以及杀精子用具的领域。具体地讲,本发明涉及一种杀精子的阴道栓,该阴道栓能非常有效地阻止在异性性交期间性传染病的传播。

杀精子剂,例如 nonoxynol 9 或者 octoxynol 9 其本身已制成栓剂,乳油,泡腾剂形式以及也与各种器械避孕用具相结合在现有技术中广泛地用于避孕目的。现有技术中已报道 nonoxynol 9 具有一定的杀菌作用,并且至少在体外试验中能够杀死人体免疫缺陷性病毒(HIV)。但是,在插入阴道的栓剂,乳油,泡腾剂等等中使用 nonoxynol 9(或者 octoxynol 9)以及其他的杀精子剂和杀菌剂并不解决问题,因为这些药剂具有减少或毁灭阴道的健康细菌群系的趋势,并且使妇女趋于遭受酵母感染(念珠菌病)。

根据前面所述,本领域始终需要一种在性交之前用于妇女阴道内并且具有较强的避孕效力,甚至更重要的是能作为一种阻止许多性传染疾病传播的药剂的避孕药。由于在一般的异性爱者群体中 HIV 病毒的出现和传播,更进一步增强了对这样一种避孕和预防药剂的需求。此外,本领域内需要



一种使女性使用者减少感染酵母的可能性的避孕和预防剂。虽然现有技术中已经认识到需要保持或重建健康的阴道内细菌群系,但现有技术解决这一问题的唯一办法是使用含有嗜酸乳芽孢杆菌菌落的灌洗器或其他类型的阴道插入物。但是这些灌洗器或其他的插入物并不是 100%有效,并且既对避孕没有作用,也不能抵抗在异性性交期间性传染病的传播。

本发明提供了一种不仅有助于保持或重建正常的非致病性阴道内细菌区系,而且也是避孕药并且能够真正保护使用者免于感染性传染病的阴道栓。

本发明的一个目的是提供一种阴道栓,该阴道栓能高效率地阻止,实际上所有通过性行为传染的疾病的传播并且也可用作作为一种避孕药。

本发明的另一个目的是提供一种满足前面所述目的,并且不会使其使用者易于感染酵母的阴道栓。

采用含有下列活性成分的一种阴道栓或其他类型的阴道 passary 例如乳油,泡腾剂或软膏可以达到上述或其他目的和优点:

至少一种药学上可接受的,局部安全的抗菌剂,例如选自于杀藻铵,十六烷基吡啶氯化物,洗必太葡萄糖酸盐以及碘伏,咪唑烷基脲(imidiazolidinyl urea)以及二唑烷基脲(diazolidinyl urea)组的一种药剂;

以及一种微包胶的乳芽孢杆菌细菌的活菌落。

该活的乳芽孢杆菌以微包胶形式存在于栓剂中,它可以

保护细菌在栓剂的“货架期”期间免受抗菌剂的作用。另一方面包封该细菌的包膜或物质是一种由于水分的作用主要在阴道环境中释放该细菌的物质。被释放出来的乳杆菌用于保持或重建阴道壁上的健康的基于乳杆菌的细菌群,并且分泌过氧化氢以及其他的杀菌剂,其能抑制促进感染的非正常区系状态。

本发明的优选实施方案除含有微包胶的乳杆菌外,还含有一种抗菌剂(杀菌剂)组合物,例如至少一种选自于杀藻铵,十六烷基吡啶氯化物,洗必太葡萄糖酸盐以及碘伏(BETADINE™)和附加的咪唑烷基脲(imidiazolidingl urea)和二唑烷基脲(diazolidinyl urea)组的药剂;并且还含有一种选自于nonoxynol 9 或 octoxynol 9 的杀精子剂,以及进一步含有一种使用温和酸如硼酸或一种有机酸例如乳酸,柠檬酸或乙酸的缓冲液,以便将栓剂,乳油,泡腾剂或软膏的pH值以及使用于阴道壁之后的pH值调节到3.0至5.5的适度酸性pH范围内。

针对几种性传播病原体,包括白色假丝酵母及其相关的酵母种,阴道毛滴虫,淋病奈瑟氏球菌,梅毒密螺旋体,沙眼衣原体,单纯疱疹病毒以及人体免疫缺陷性病毒的体外试验以及许多例体内试验,已经证明本发明的阴道栓对杀灭性传播病原体特别有效,并且有助于保持或重建阴道内健康的非病毒细菌群,防止阴道炎和酵母感染。本发明的阴道栓还基本上没有不利的副作用(例如,烧伤,瘙痒或其他不愉快的感觉)并且在已进行的试验中一般能为女性使用者和她的配偶

所接受。

下文内容将详细描述本发明,并且对证明本发明效果的一些试验和结果进行了概述。

本发明提供了一种阴道栓,乳油,泡腾剂或软膏,包含有一种抗菌剂与存活的微包胶的嗜酸乳杆菌的特定结合物。该细菌用微胶囊包被,以保护该细菌免遭抗菌剂的作用。大体上讲,采用阴道用乳膏,泡腾剂或软膏均可达到本发明目的,但优选的是栓剂形成,并且进一步针对栓剂来描述本明。但是应该明白也可以将本发明的一般原理体现和结合到上面介绍的乳油,泡腾剂或软膏中。这些制剂和阴道栓一起通常被称作为“阴道 passary 或 passaries”。

在本发明所述栓剂中掺入的抗菌剂(杀菌剂)可以是药理学上可接受的,本领域内熟知的局部安全的抗菌剂。这样的例子是阳离子表面活性剂型抗菌剂(杀菌剂)例如杀藻铵,甲基氯化苄乙氧铵,十六烷基吡啶氯化物,以及 Cetrimide(混合的烷基三甲基铵溴化物)。或者换成杀菌剂如洗必太葡萄糖酸盐或含碘的杀菌剂,例如碘伏(通常已知的商品名为 BETADINE™)。根据本发明,每个阴道栓中含有大约 12—3000mg 的杀藻铵或甲基氯化苄乙氧铵,优选的量是每个阴道栓中大约含有 120mg 的杀藻铵。关于这一点应认识到,根据本发明,女性使用者应在性交之前几分钟到几小时在阴道内使用一个阴道栓。优选的阴道栓的总重量是约 1.2 克(1200mg),但是,不应该仅限于此量,因为阴道栓的总重量和体积不仅取决于活性成分的量而且也取决于阴道栓中含

有的非活性成分(填充剂,药物赋形剂)的量。在下面描述中,在描述一种成分或组分的优选量时,应该明白是指在每个阴道栓中的量,在优选的实施方案中一个阴道栓的量大约是1.2克。

根据本发明,每个阴道栓中使用的十六烷基吡啶氯化物的量为25—400mg范围内,优选的量50—1000mg范围。洗必太葡萄糖酸盐的量为10—2000mg范围,优选的范围为25—1200mg。所使用的碘伏(BETADINE™)的量为25—5000mg,优选的量为每个阴道栓约120mg。在优选的实施方案中,以上面所述量选择使用上面介绍的抗菌剂之一,但也可以使用以相等量组合而成的这些药剂的结合物。除了作为杀菌剂外,阳离子表面活性剂例如杀藻铵也具有杀精子作用。

在本发明还可以使用的杀菌剂是咪唑烷基脲(imidiazolidinyl urea),其用量为每个阴道栓10—1000mg的范围,优选的量约为100mg。

每个栓剂也可以使用10—1000mg的二唑烷基脲(diazolidinyl urea)。优选的量约为100mg。用于本发明中的其他的抗菌剂的例子是己基间苯二酚(25—1000mg),cetrimide (100—4000mg),六氯双酚(25—3000mg),tridocarbon(3,4,4—三氯碳酰替苯胺50—1000mg),氯二甲苯酚(25—1000mg)以及十六烷基三甲基铵溴化物(25—400mg)。

在前面所述的抗菌剂中,杀藻铵是最优选的,尤其是对于仅使用一种抗菌剂的实施方案。

但是在本发明的优选的实施方案中,不是使用一种,而是使用抗菌剂结合物。

一种特别优选的实施方案类型是含有一种选自于由杀藻铵,甲基氯化苄乙氧铵,十六烷吡啶氯化物,洗必太葡萄糖酸盐及碘伏(BETADINE™)组成的组中的抗菌剂。此类优选的实施方案还含咪唑烷基脲(imidiazolidinyl urea)以及二唑烷基脲(diazolidinyl urea)。

本发明所述阴道栓的另一种基本成分是一种嗜酸乳酸杆菌或 *Lactobacillus rhamnosus* 的活菌落,每个阴道栓中含有  $10^3 - 10^7$  范围内的活细菌,更优选的含菌范围为  $10^5 - 10^7$  个,优选的活细菌数目为约每个阴道栓中含有 1 百万 ( $10^6$ ) 个细菌。该细菌以微包胶形式存在于阴道栓中。在优选的实施方案中,该细菌是 *Lactobacillus rhamnosus* 种,并且每个阴道栓至少含约  $10^6$  个活细菌。虽然,一些细菌学家将 *Lactobacillus rhamnosus* 认作为一种独立的但与嗜酸乳杆菌相关的细菌种,但更合适的是将它看作为嗜酸乳杆菌种的一个简单变种。正如本领域内已知的,嗜酸乳杆菌和 *Lactobacillus rhamnosus* 都是“友好”细菌,并且形成健康的阴道内细菌群。已知这两种细菌都可以产生一定的杀菌素以及过氧化氢,这将有助于抑制病原细菌。在本发明使用 *Lactobacillus rhamnosus* 比用嗜酸变体所具有的优点是基于这样的事实,*Lactobacillus rhamnosus* 变种繁殖力更强(约 8—10 倍),并且能够发酵更多的碳水化合物(嗜酸变种发酵 12 种,而 *rnnamnosus* 变种发酵 23 种),并且 *rhamnosus* 变种产生  $L^+$  乳酸,而不是由嗜酸

变种产生的外消旋乳酸混合物。上面所述是有利的,因为 rhamnosus 变种具有发酵多种类型的碳水化合物的能力使之成为一种更强壮,更易于存活的细菌。能够产生 L<sup>+</sup>乳酸也是有利的,因为它是一种实际上有抗真菌作用的 L<sup>+</sup>对映异构体。

本发明中使用的嗜酸乳杆菌和 *Lactobacillus rhamnosus* 变种细菌可以通过商业途径购买,或者从实验室菌株获得。

下面描述的优选的实施方案中使用的 *Lactobacillus rhamnosus* 变种是从 Institute Rosell Montreal, Quebec Canada 获得的。在本发明中乳杆菌种是用微胶囊包被的,并且是与本发明中所用的一种或几种抗菌剂和其他成份一起混合制成微胶囊包被形式。下文中将描述几种由微胶囊包被这些细菌的方法或操作程序。用微胶囊包被这些细菌的目的是为了在栓剂被使用之前保护这些细菌免受抗菌剂的作用。在本发明中以这样的方式选择包被该细菌的材料或外膜,即在阴道环境中该材料失去其结构完整性成为膜片(主要由于水份作用)并且释放出乳杆菌。

除了含有一种或几种杀菌剂和微胶囊包被的乳杆菌外,本发明所述阴道栓还含有下列非必需的成分或组分。这些组分之所以被认为是非必需的是因为没有它们也可以达到本发明的基本目的。然而,含有这些非必需组分的本发明的实施方案具有特定的优点,因而被看作是优选的实施方案,并且还应该认识到将这些实施方案结合起来考虑相对于基本的实施方案而具有新颖性和创新精神。

因此,优选的本发明阴道栓含有一种选自于 nonoxynol 9 或 octoxynol 9 基本的杀精子剂。后者被认为基本上与 nonoxynol 9 具有均等的作用,可以实现本发明目的。每个阴道栓含有含量约为 50—500mg 范围内的 nonoxynol 9,优选的量是 100mg。根据现有技术使用 nonoxynol 9 具有严重的缺陷,在重复使用时增加了阴道炎和酵母感染的可能性,主要原因是由于 nonoxynol 9 具有有害地影响阴道内正常细菌群的倾向。但是,将 nonoxynol 9 与本发明所述其他组分结合使用后不具有这些缺点。

优选的本发明所述阴道栓还含有一种缓冲剂,该缓冲剂能使阴道内 pH 值保持于约 3.0—5.5,优选的是 4.3—4.5 的范围内。可以将任何药物学上可接受的温和酸,如硼酸,或温和的有机酸例如乳酸,抗坏血酸,柠檬酸,或乙酸,与其各自的钠盐或其他药物学上可接受的盐(必须达到所需 pH 值)结合起来使用。优选的是,阴道栓的 pH 值缓冲于 4.3 至 4.5 的范围内,优选的是使用含有乳酸钠的乳酸或者乳酸/乳酸钠和抗坏血酸的结合物作为缓冲剂。

本发明已经发现以上述方式缓冲的阴道栓实际上使阴道 pH 值在性交后保留酸性,这对于避孕是有利的,并且也可以保持健康的阴道细菌群。利用抗坏血酸作为缓冲系统的一部分由于其他的理由是有利的,已经证明抗坏血酸能够增强子宫颈粘液的粘性,从而使得精子或微生物进入子宫变得更困难。因此,抗坏血酸对本发明的阴道栓具有抗菌和避孕作用都作出贡献。

本发明阴道栓还含有使阴道栓成形的药物学赋形剂。羟基丙基甲基纤维素(每 100 个阴道栓大约用 40 克)以及微晶纤维素(每 100 个阴道栓大约用 20 克)特别适用,因为这些成分能够很好地吸附到酸性环境的阴道壁上,酸性环境是由于本发明阴道栓包含的合适缓冲系统产生的。其他的赋形剂如硬脂酸镁(每 100 个阴道栓用 2—4 克)以及二氧化硅(每 100 个阴道栓用 2—4 克)以及乳糖(每 100 个阴道栓使用 2—3 克)也用于本发明的优选方案中。

用于本发明阴道栓中的其他可选择的组分或成分是香料,薄荷脑,桉油,甲基水杨酸盐或相关的水杨酸盐用作为局部冷却剂;皮质甾醇或相关的抗炎甾类(每个阴道栓用 1—500mg)用作为抗炎剂;EDTA 用作为湿润剂和适度的抗菌剂;丙二醇或其他药物学上可接受甘醇,对羟基苯甲酸甲酯或相关的对羟基苯甲酸酯类衍生物用作为湿润剂并用于构成“骨架”结构;对二异丁基苯氧基聚乙氧基乙醇或 dodecaethylene glycol 一月桂酸酯用作为杀精子和适度的抗菌剂;tritions and menfegol 作为杀精子剂,适度的抗菌剂和湿润剂。

在下面的说明书中,申请人首先描述了用微胶囊包被嗜酸乳杆菌或 *Lactobacillus rhamnosus* 的操作实例,以及优选的本发明阴道栓的实施例。

### 实 施 例

微胶囊包被方法:

将已在除去培养基后冻干的活冻干乳杆菌用于进行微胶囊包被。该细菌可从商业途径购买,或者从实验室菌株获



得。在本优选实施方案中, *Lactobacillus rhamnosus* 细菌是从 Institute Rosell Montreal, Quebec, Canada 购买的。将该生物体在营养培养基中生长至对数期。合适的培养基包括 Thayer—Martin 培养基, 黄豆胰酶解酪蛋白, 脑—心浸汁肉汤, 或者其他任何适用于培养该细菌的丰富培养基, 因为没有特定的培养基对此种阴道栓的成功制备起着关键作用。唯一重要因子是该微生物的存活性和量, 而这两因子总是由标准的临床实验室稀释方法测定的, 如在 37℃, 5—10% 二氧化碳气氛中, 将定量稀释的细菌在血琼脂平板上培养 24—48 小时, 然后进行菌落计数。通过在 0—4℃ 以 14,000 x g 离心而除去营养培养基, 然后在起始的离心步骤后用无菌的平衡盐和 5% 葡萄糖溶液至少洗涤三次。然后用液氮将该细菌“快速冰冻”, 然后在高度真空条件下冻干。

#### 包囊方法 A:

将上面描述方法中获得的新鲜的, 经洗涤的并冻干的细菌悬浮于 10ml 的 5% 葡萄糖盐水溶液中, 所加入的细菌的体积为: 得到在 4℃ 时每升中含有 10 亿—100 亿个生物体的细菌浓悬液所需体积。除非另有说明, 所有这些操作都是在 0—4℃ 温度范围内完成的, 以便使在室温下将丧失生命力的乳杆菌保持存活性。向该细菌悬液中加入 0.2—0.4ml 的海藻酸钠溶液 (1.5% W/V) 后快速但温和地振荡该悬液。使用氮气流, 通过一个包了外鞘的 14 计量注射针将上述混合物转移到一个 4 升圆底烧瓶中。在完成该步骤前事先用 5% 白蛋白溶液洗涤该 4 升圆底烧瓶, 之后在 65℃ 至少加热 10 小

时,并且在该步骤中使用的注射针和管道也用该方法处理。

然后在加压条件下利用一个大量注射器和氮气流将上述混和物强行通过一个 30 计量多个倾斜角的注射针。在该注射针的末端产生非常少的微滴,这些微滴被 30 计量注射针周围的氮和空气气流干燥,当这些微滴形成凝胶时将它们收集于 1.3—2%CaCl<sub>2</sub> 的水溶液中。之后,用 0.08—0.13%2—(N—环乙基—氨基)乙烷磺酸(CHES)溶液和 1.0—1.5%氯化钙溶液至少洗涤三次。

进一步用至少 5 倍以上的 0.1%CHES 和 1.1%CaCl<sub>2</sub> 以及正常的盐水溶液洗涤已成胶状的微滴或球。然后将得到的小球在液氮中“快速冰冻”,然后冻干。完成这些步骤之后,将该胶囊包被的生物体用于制备本发明的药剂。

#### 包囊方法 B:

由于在包囊方法 A 的基础上进行了改进,因而完成下面的步骤给该细菌提供了更强的抗阳离子抗菌剂的抗性。这些步骤是在 0—4℃下完成的。因此,在包囊方法 A 中描述的洗涤步骤之后,将所得物质与聚 L—赖氨酸(Sigma)溶液(0.05%W/V)球体一起反应 10 分钟。然后用被乳酸缓冲至 pH 为 4.5 的普通盐水洗涤球状体。然后将得到的球体体在液氮中“快速冰冻”,然后冻干。在完成这些步骤后,将胶囊包被的生物体用于制备本发明的药剂。

#### 包囊方法 C:

在 0—4℃,用羟基丙基甲基纤维素与刚制备的,经过洗涤的,冻干的细菌一起混合,以达到细菌与羟基丙基甲纤维

素的重量比为 10/90, 但该范围可分别在 1/99 至 99/1 范围内变化。这将影响胶囊包被的生物体的最终质量和存活性。应该明白, 较高的纤维素比率趋向于在包囊步骤中保护该细菌。由“盘状”胶膜包被冻干细菌和羟丙基甲基纤维素的混合物。这一过程是用首先已用悬于水中的 1% 硬脂酸镁“包被”的不锈钢圆底烧瓶来完成的。将无水的可渗透的丙烯酸异丁烯酯共聚物和含部分水的可渗透的丙烯酸异丁烯酸共聚物(分别为 EUDRAGIT RL™ 和 EVD RAGIT RS™ (从德国的 Rohm Parm. Ltd. 获得))的结合物以 5—10% 的浓度悬浮于含 1% W/V 蓖麻油的比例为 1:1 的丙酮—异丙醇中。两种共聚物的比例可在 1:1 至 1:10 范围内变化, 而优选的比例为 1:2。将该悬浮液置于不锈钢圆底烧瓶中。由于该共聚物悬浮液可快速地杀死细菌, 因而该方法不得不用羟丙基甲基纤维素与细菌的高比例来快速地完成。因此, 向该不锈钢烧瓶中加入小量的细菌与纤维素的混合物, 将该材料用氮气流干燥, 在干燥过程中剧烈搅拌 3—10 分钟。

#### 包囊方法 D:

在 0—4℃ 时边快速但轻度地摇动, 边向聚乙烯吡咯烷酮(从德国的 BASF 购买)的浓悬液中加入刚制备的, 经洗涤的, 冻干细菌, 其中所述浓悬液可用或不用溶于 pH 为 5.0 (4.5—8.0 范围)的 5% 葡萄糖平衡的盐溶液中的 0.1% 的二乙烯基苯(Biorad)溶液交联 2—12 小时。将该混合物摇动 1—12 小时而包被该乳杆菌。然后将该物质“快速冰冻”并冻干。

### 包囊方法 E:

通过快速而轻度地摇动而将刚制备的,经过洗涤的,冻干的细菌加入聚乙烯吡咯烷酮(Crospovidone™)悬液中。具体地讲,在 0—4℃时将 10 克冻干细菌加到 50 克聚乙烯吡咯烷酮(Crospovidone™)的悬液中。振动 30—60 分钟,但也可使用更长时间,出现了包囊作用。在一个干燥器中真空处理而从该混合物中除去水分,或将该材料“快速冰冻”并且冻干。

### 制备阴道栓方法 A:

在 35—37℃时边彻底地振动边向溶于无菌普通盐水溶液(其量足于制备一种浓稠糊剂,通常为 120ml)中的羟丙基甲基纤维素(每批约 100 个阴道栓用 40 克)和微晶纤维素(每批约 100 个阴道栓用 20 克)的悬液缓慢地加入杀藻铵或甲基氯化苄乙氧铵(每批 100 个阴道栓用 12.5 克),咪唑烷基脲(imidiazolidinyl urea)(每批 100 个阴道栓用 11 克)和二唑烷基脲(diazolidinyl urea)(每批 100 个阴道栓用 1.1 克,或者用 1.1 克的二唑烷基脲和 1.1 克的咪唑烷基脲使得浓度降低 10 倍)。用试剂级乳酸将 pH 缓慢地降至约 6.0—6.3。(该步骤将抗菌剂结合到“纤维素”赋形剂)。该悬浮液振动 2 小时,然后边轻度地振动边缓慢地加入 10.0 克抗坏血酸,该抗坏血酸溶于约 10—15ml 的无菌盐水中。此时,该物质是一种非常稠的糊剂。此时加入杀精子剂(每批 100 个阴道栓中加入 11 克 Nonoxynol 9)并且彻底地混合。在完成该步骤后,该方法在 0—4℃下完成。然后用试剂级乳酸将该混和物的

pH 值降至 4.3—4.5。然后加入刚制备的胶囊包被的乳杆菌,使其终浓度达到至少为每个阴道栓一百万个活细菌。由于目的是使其终浓度达到每个阴道栓至少含一百万个活细菌,因而通常加入 6 倍量的细菌,因为在各混合步骤中存活性出现一些损失。这意味着通常要加入约 500mg 的经胶囊包被的细菌。不仅彻底地混合这些生物体以确保混合物均一性是重要的,而且快速地混合也是重要的,因为水分会对生物体的存活性产生不利的影响。例如通过将糊剂在无菌玻璃平皿中铺成一薄层并且然后用一个复制照将细菌均匀地铺在糊剂层上,可以达到上面所述的快速和彻底混合。此后,以在每批的 100 个阴道栓中各加入约 2—4 克的量加入硬脂酸镁和二氧化硅,并且加入或不加 2—3 克乳糖。

在将上述物质在 0—4℃ 彻底混合后,将其挤压到一个模型中并在真空条件下 0—4℃ 时在一个干燥罐中干燥。(在室温(25℃)或更高的温度下进行干燥会降低活细菌数目)。然后将阴道栓密封于不透空气和水的容器中,直至使用。在贮存期间,应避免水分和高温以确保乳杆菌的存活性。

#### 阴道栓组合物 B:

按照制备阴道栓药剂 A 的方法实施制备该组合物的方法,所不同的是使用十六烷基吡啶氯化物(每批 100 个阴道栓使用 12.5 克)代替杀藻铵。

#### 阴道栓制剂 C:

基本上按阴道栓制剂 A 相同的制备方法该制剂,所不同的是用洗必太葡萄糖酸盐(每批 100 个阴道栓使用 12.5

克)代替杀藻铵。

含有碘伏(BETADINE™),甘油主剂的阴道栓制剂 D

该组合物和制备方法与上面描述阴道栓制剂 A 相似,不同之处如下:用碘伏(BETADINE™)(每批 100 个阴道栓中用 12.5 克)替代杀藻铵。缓慢地将三种抗菌剂咪唑烷基脲 1.1 至 11 克,二唑烷基脲 11—1.1 克以及碘伏)加入到溶于无菌的 0.15 普通(0.85%)盐水溶液中的浓度为 20—80% 的 1 升甘油悬液中,在加入的同时进行彻底的振荡。用试剂级乳酸将 pH 值缓慢地降至约 6.0—6.3。该步骤使该混和物稍微增稠。

在将悬液振荡 2 小时后,在轻度振荡条件下将溶于约 10—15ml 无菌盐水中 610—10 克抗坏血酸缓慢地加入。此时,该混和物是一种很稠的悬浮液。然后用试剂级乳酸整个混合物的 pH 值降至 4.3—4.5。如在前面描述的方法中所述,在加入刚制备的胶囊包被的细菌时将该物质快速地冷却到 0—4℃,但在本方法中通常加入约 600—800mg 的胶囊包被的细菌,同时加入 4—6 克乳糖并彻底地混合。与前面描述的方法和组合物不同的是,不加入硬脂酸镁或二氧化硅,此时该制剂是非常坚硬的,在 0—4℃ 时象软蜡,并且很容易倒入模子里。然后将得到的阴道栓密封于不透空气和水分的容器中直到使用。该组合物的阴道栓在 37℃ 时快速融化,此后特别小心地操作以使其在贮存期间和使用之前保持冷却。

阴道栓制剂 E(甘油为主剂)。

向溶于无菌 0.15 普通盐水溶液中的浓度为 20—80%

的 1 升甘油悬浮液中缓慢地加入杀藻铵(每批 100 个阴道栓用 12.5 克),咪唑烷基脲(imidiazolidinyl urea)(11 至 1.1 克)以及二唑烷基脲(diazolidinyl urea)(11 至 1.1 克),加入的同时彻底地振动。用试剂级乳酸将 pH 缓慢地降至约 6.0—6.3。该步骤稍微增加了该混合物的稠度。在将该悬浮液振动 2 小时之后,边轻度振动边缓慢地加入溶于约 10—15ml 无菌盐水中的 6.0—10 克的抗坏血酸。此时,该混合物是一种稠密的粘性悬浮液(其稠度类似于浓稠蜂蜜),然后加入 11 克的 Nonoxynol 9 并彻底地混合。用试剂级的乳酸将整个混合物的 pH 值降至 4.3—4.5。在加入刚制备的胶囊包被的乳杆菌同时将该物质快速冷却 0—4°C。通常将 600—800mg 的胶囊包被的细菌与 4—6 克乳糖一起加入并且彻底地混合,得到每个阴道栓至少含有  $10^6$  个活细菌的终产物。在该阶段,该制剂是非常坚硬的,在 0—4°C 时象松软的蜡,并且易于倾倒入模子里。然后将得的阴道栓密封于不透空气和水的外包装中直到使用。在贮存期间应避免水份,并且应特别注意使之保持冷却,因为以甘油为主剂的阴道栓在约 37°C 时融化。

#### 阴道栓制剂 F(以甘油为主剂)

基本上按照制剂 E 同样方法制备该制剂。并且基本上有相同成份,不同的是用十六烷基吡啶氯化物(每批 100 个阴道栓中用 12.5 克)代替杀藻铵。

#### 阴道栓制剂 H(以甘油为主剂)

基本上按照制剂 E 同样方法制备该制剂,并且基本上

具有同样的成分,不同的是用洗必太葡萄糖酸盐(每批的100个阴道栓中用12.5克)代替杀藻铵。

#### 阴道栓制 I (以甘油为主剂)

基本上按照制剂 E 同样的制备方法制备该制剂并且基本上具有同样的组分,所不同的是用聚乙烯吡咯烷酮碘(BE-TADINE™)(每批100个阴道栓用12.5克)代替杀藻铵。

#### 大批量制剂的制备(制剂 J)

在另外一种“试验性生产量”方案中,每个周期可制备约20,000个阴道栓。将按照需要足以达到在每个阴道栓中最终量分别为大约120—1000mg,10—100mg以及10—100mg所需量的杀藻铵,咪唑烷基脲和二唑烷基脲与足以在每个阴道栓中达到90—110mg的终浓度所需量的nonoxynol 9一起混合。将上述所有成分同时加入到足够量的无菌盐水溶液中,通过彻底混合而制备一种浓稠的糊剂。在彻底混合后加入乳酸将pH降至4.5,在室温下加入胶囊包被的乳杆菌。利用在“包囊方法 E”中介绍的大规模方法包被该乳杆菌。将得到的混合物与适当的硬脂酸镁和二氧化硅混合,得到可铸型的混合物并将它在35—38℃时用8磅的微湿的压力挤压到模子里。通常,要达到上面所述结果,硬脂酸镁和二氧化硅在该混合物中的浓度对每种试剂而言各占重量的0.01—0.1%。该方法得到了稳定的阴道栓,但是微生物的存活性是随不同的生产批量而变化的。

用单一的抗菌剂制备阴道栓制剂 K:

边彻底搅拌边在35—37℃时向溶于无菌普通盐水溶液



中的羟丙基甲基纤维素(每批约 100 个阴道栓用 40 克)和微晶纤维素(每批约 100 个阴道栓用 20 克的悬浮液(其量足以制备一种浓稠的糊剂,通常为 120ml)缓慢加入杀藻铵(每批 100 个阴道栓用 12.5 克)。用试剂级乳酸将 pH 缓慢地降至约 6.0—6.3。该步骤将抗菌剂结合到主剂上。此时,该混合物是一种非常浓稠的均匀的糊剂。完成该步骤后,所有操作都是在 0—4℃ 下完成。然后加入试剂级乳酸将整个混合物的 pH 降至 4.3—4.5。然后加入刚制备的胶囊包被的乳杆菌,使其终浓度达到每个阴道栓至少有 100 万个活细菌。通常要达到这一浓度需要加入 4—6 倍过量的胶囊包被的细菌(约 500mg),因为在操作过程中出现损失现象。由于水分对该生物体的存活有不利的影晌,因而快速而彻底地混合是至关重要的。通过将糊剂在无菌玻璃平皿上铺一薄层,然后再用一复制器将细菌均等地铺在糊状物上面而实现充分混合。暴露于约 25℃ 或更高的温度下对阴道栓中细菌的存活性产生不利的影晌。之后,将约各为 2—4 克的硬脂酸镁和二氧化硅与 2—3 克的乳糖一起加入或不加入乳糖。将该物质在 0—4℃ 彻底地混合,然后挤压到一个模型中并在 0—4℃,真空条件下在一个干燥罐中干燥。然后将阴道栓密封于不透空气和水分的容器中直到使用。在贮存期间应保护阴道栓免遭水分和高温,以确保乳杆菌存活。

用单一抗菌剂和甘油主剂制备的阴道栓制剂 L。

边彻底搅拌边向溶于 1 升无菌的 0.15 普通盐水溶液中的浓度为 20—80% 的甘油悬浮液中缓慢地加入杀藻铵(每

批 100 个阴道栓使用 12.5 克)。该步骤使混合物稍微增稠。在此时,混合物是一种类似浓蜂蜜的稠度的浓稠而发粘的悬浮液。然后用试剂级乳酸将整个混合物的 pH 值降至 4.3—4.5。将该物质快速地冷却至 0—4℃,并且加入刚制备的胶囊包被的乳杆菌。为了使最终浓度达到每个阴道栓含有一百万个活细菌,将 6—8 倍过量的胶囊包被的细菌(大约 600—800mg)与 4—6 克乳糖一起加入并彻底混合。在该阶段,制剂非常硬,在 0—4℃时类似软蜡,并且易于将它挤压到模子里。然后将阴道栓密封于不透空气和水的容器中直到使用。

#### 大批量制备制剂 M

按照本方案制备每批试验性规模批量约 300 个阴道栓,但是该方案也可用于制备更大或更少的量。按照需要将使其最终量分别达到每个阴道栓为 100—1,000mg, 10—100mg 和 10—100mg 所需的足够量的杀藻铵。咪唑烷基脲和二唑烷基脲与使其终浓度达到每个阴道栓为 90—110mg 所需的足够量的 nonoxynal 9 一起混合。将上述所有成分同时加入到足够量的无菌盐水溶液中,通过彻底混合制备一种浓稠的糊剂。在一个有代表性的实施方案中,在室温下将 30 克杀藻铵,2.5 克咪唑烷基脲和 2.5 克二唑烷基脲加入到大约 50ml 的无菌盐水溶液中。然后以每个阴道栓加入 100mg 的足够量(总共为 30.0 克)加入抗坏血酸,接着加入下列物质:14 克乳糖(Fast Flow™),甲基纤维素(Methocel™)2.5 克,硬脂酸 10 克,淀粉羟基醋酸钠(Tabco™)10 克,柠檬酸钠 1.5 克,二氧化硅 20—60 克。将上述物质彻底混合后,在室温下加入

胶囊包被乳杆菌(总共 3.0 克)。基本上按照上面描述的“包囊方法 B”的步骤,用胶囊包被该乳杆菌。在室温和温和的压力下用药丸压模机将得到的混合物挤压到模子里。

#### 体内和体外生物学试验

试验基本上按照方法 A 或 B 所述的步骤制备的本发明优选的阴道栓对下列病原生物体的作用效果,并且发现在通常计划的阴道栓的使用期间体内被达到的浓度时可以杀死这些生物体。

细菌: *Gardnerella vaginalis*, 化脓链球菌, 无乳链球菌, 粪链球菌, 金黄色葡萄球菌, 金黄色葡萄球菌(产生毒素的毒性株), 淋病杀瑟氏球菌, 大肠杆菌, 肺炎克氏杆菌, 痢疾志贺氏菌, 伤寒沙门氏菌, 人型支原体, 肺炎支原体, 解脲脲原体, *Mobiluncus curtisii*, 以及沙眼衣原体。

病毒: 人免疫缺陷性病毒, I 型单纯疱疹病毒, II 型单纯疱疹病毒, 巨细胞病毒(CMV), 甲型肝炎病毒, 乙型肝炎病毒。

酵母: 白色假丝酵母, 近平滑假比酵母, 热带假丝酵母, *Cardida glabrata*, 假热带假丝酵母。

毛滴虫属: 阴道毛滴虫

下文中进一步描述体外和体内试验:

在体外研究中,在约 30ml 体积的合适的丰富培养基中引入待测定病原体,以试验一个阴道栓的抗菌效果。总的来说,将  $10^6$  个对数生长期的病原生物体导入到培养基中,该数目比合理估计出的女性在与感染的男性配偶性交时可被

接触到的病原生物体(一个种类)的数目高出 2 或 3 个数量级。对于一个阴道栓,使用 30ml 的体积被认为与在性交之后一个阴道栓的抗菌剂在阴道里受到的稀释程度至少相同或者稀释程度更大。因此,可以认为,就所涉及的病原体的数目和抗菌剂的数目而言,这些检测试验至少与体内存在的状态,也就是按计划的方式使用本发明的阴道栓时的状态同样苛刻或更苛刻。

#### *Gardnerella vaginalis*

在试验抗 *Gardnerella vaginalis* 的效果时。将来自 300 个临床分离物(诊断为细菌性阴道疾病的患者)的  $10^6$  个活生物体(设置二个重复)加入到 Mueller—Hinton 丰富肉汤中。在 10%CO<sub>2</sub> 的培养箱中在 37°C 将本发明的阴道栓,培养基和生物体缓慢地搅拌。在 1,2 和 3 小时时将一份样品定量地涂布于巧克力(色)琼脂平板上并在一个 10%CO<sub>2</sub> 培养箱中 37°C 培养。在 24,48 和 72 小时时对平板上菌落计数。结果:在上述条件下完成的 *Gardnerella vaginalis* 的 300 个临床分离物抗本发明阴道栓的检测试验中,发现在 1,2,3 或 4 小时间隔取样的样本中没有存活的生物体。

化脓链球菌,粪链球菌,无乳链球菌,金黄色葡萄球菌以及产毒的金黄色葡萄球菌。

利用经典的实验室技术从妇科病人获得了化脓链球菌,粪链球菌,无乳链球菌,金黄色葡萄球菌和产毒金黄色葡萄球菌的临床分离株。将对数生长期的  $10^6$ /ml(1ml)的临床分离株加入到 Mueller—Hinton 丰富肉汤培养基中。在 10%CO<sub>2</sub>

的培养箱中 37℃时将本发明的阴道栓,培养基和生物体缓慢搅动。在 1,2 和 3 小时后,取一份样品定量于涂布于巧克力(色)琼脂平板上,并在一个 10%CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃培养。在 24,48 和 72 小时时读出平板上菌落数。结果:在 1,2 或 3 小时取样期取样时,对于金黄色葡萄球菌,无乳链球菌,粪链球菌,化脓链球菌的临床分离株以及产毒的金黄色葡萄球菌的 30 个临床分离株未出现有存活菌落。

#### 革兰氏阳性杆菌(细菌)

对大肠杆菌(100 个分离株),肺炎克氏杆菌(100 个分离株),痢疾志贺氏菌(30 个分离株)以及伤寒沙门氏菌(30 个分离株)的临床分离株进行检测,观察其对本发明阴道栓的抵抗性。

将 10<sup>6</sup>/(1ml)的临床分离株加入到 Mueller—Hinton 丰富肉汤中。在一个 10%CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃时将本发明的阴道栓,培养基,和生物体缓慢搅动。在 1,2 和 3 小时时,取一份样品定量涂布于巧克力(色)琼脂平板上并在一个 10%CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃培养。在 24,48 和 72 小时时对平板上菌落计数。结果:在上述条件下进行的抗本发明阴道栓的检测试验中,在 1,2 或 3 小时间隔取样时,未发现大肠杆菌,肺炎克氏杆菌,痢疾志贺氏杆菌,伤寒沙门氏杆菌的临床分离株出现活菌。

#### 酵母

从临床诊断患有阴道炎的妇科患者获得白色假丝酵母(100 个分离株),近平滑假丝酵母(50 个分离株),热带假丝

酵母(50个分离株), *Candida glabrata*(50个分离株)和假热带假丝酵母(50个分离株)的临床分离株。将这些临床分离株  $10^6/\text{ml}$ (1ml)加入到 Mueller—Hinton 丰富肉汤中。在 10%  $\text{CO}_2$  培养箱中 37°C 时将本发明阴道栓, 培养基和生物体缓慢搅动。在 1, 2 和 3 小时时取样定量地涂布于巧克力(色)琼脂平板上并置于 10%  $\text{CO}_2$  培养箱中 37°C 培养。在 24, 48 和 72 小时时计算平板上菌落数。结果: 在上述条件对白色假丝酵母, 近平滑假丝酵母, 热带假丝酵母, *Candida glabrata* 以及假热带假丝酵母的临床分离株进行的抗本发明阴道栓的检测试验中, 在 1, 2 或 3 小时间隔取样时未发现有存活菌。

#### 阴道毛滴虫

从临床诊断为阴道炎的妇科患者获得阴道毛滴虫的临床分离株。

将该临床分离株  $10^6/\text{ml}$ (1ml)加入到 Feinstein—Weiberg 丰富培养基中。在一个 10%  $\text{CO}_2$  培养箱中 37°C 时将本发明的阴道栓, 培养基和生物体缓慢搅动。在 1, 2 和 3 小进取样, 定量地加到其他的 Feinstein—Weiberg 培养基中并在 10%  $\text{CO}_2$  培养箱中 37°C 培养。在 24, 48 和 72 小时时对试管读数。结果: 在上述条件下对阴道毛滴虫的 30 个临床分离株进行的抗本发明的阴道栓的检测试验中, 在 1, 2 或 3 小时间隔取样时未发现有活生物体。

#### *Hemophilus ducrey*

从经诊断患有 *Hemophilus ducrey* 的病人以及从实验室原始菌株获得 *Hemophilus ducrey* 的临床分离株(30)。

将临床分离株  $10^6/\text{ml}$  (1ml) 加入到 Mueller—Hinton 丰富培养基中。在一个  $10\% \text{CO}_2$  培养箱中  $37^\circ\text{C}$  将本发明阴道栓, 培养基以及生物体缓慢搅动。在 1, 2 和 3 小时取样定量地涂布于另一富含 Mueller—Hinton 巧克力(色)琼脂平板上, 并在一个  $10\% \text{CO}_2$  培养箱中  $37^\circ\text{C}$  培养。在 24, 48 和 72 小时对平板进行读数。结果: 在上述条件下对 *Hemophilus ducreyii* 的临床分离株进行的抗本发明阴道栓的检验中, 在 1, 2 或 3 小时间隔取样时未发现存活的生物体。

#### 淋病奈瑟氏球菌

从临床诊断为患有阴道炎或子宫颈炎的女性病人获得淋病奈瑟氏菌的 100 个临床分离株。

将临床分离株  $10^6/\text{ml}$  (1ml) 加入到 Mueller—Hinton 丰富肉汤中。在一个  $10\% \text{CO}_2$  培养箱中  $37^\circ\text{C}$  时将本发明的阴道栓, 培养基和生物体缓慢搅动。在 1, 2 和 3 小时取样定量地涂布于巧克力(色)琼脂平板上, 并在  $10\% \text{CO}_2$  培养箱中  $37^\circ\text{C}$  培养。在 24, 48 和 72 小时对平板进行读数。结果: 在上述条件下对淋病奈瑟氏菌的临床分离株进行的抗本发明阴道栓的检测试验中, 在 1, 2 或 3 小时间隔取样未发现活生物体。

#### 专性的胞内病原体

沙眼衣原体, II 型单纯疱疹病毒, 以及最近发现的人免疫缺陷性病毒(HIV), 如果不是最重要的性传染的疾病, 也必定涉及到。所有这些病原菌是专性的, 胞内寄生物, 因此, 不能用上面描述的用本发明阴道栓进行的体外检测试验进

行检测。而且,阴道栓中的抗菌剂,杀精子剂和其他物质并不对组织培养物系统起作用,在检测本发明阴道栓抗这些病原体时,不能考虑到这些因素。因此,按下列方式进行试验。

将本发明阴道栓在 30ml 的培养基中溶解后,加到病毒或衣原体感染单位( $10^6$ )中,并在 10% $\text{CO}_2$  培养箱中 37℃ 培养 1 小时。通过超声处理破碎细胞,然后将整个 30C 的物质以  $5000\times g$  离心。将上清液和沉淀都接种到敏感细胞系中。在 1 小时间隔取样时发现本发明的阴道栓能杀灭 II 型单纯疱疹病毒,沙眼衣原体,以及 HIV 培养物。

#### 体外和体内的联合研究

设计一个试验,在仅给药一个本发明的阴道栓(基本上按方法 A 和 B 描述的步骤制备)后几小时,检测阴道内 pH 和抗菌剂水平。在该试验中,分别在插入阴道栓后 0 时,以及每间隔一小时直到 8 个小时检测阴道 pH 值,在 0 时以及每间隔一小时从后穹窿获得阴道液样。将阴道液样加到病原体或潜在病原体菌苔上,以试验在阴道内能保持多长的抗菌活性。选择出按革兰氏染色,湿滴法以及阴道液 pH 检测时未测出有性传染疾病迹象或症状的病人进行研究。在该方式中,对 21 至 35 岁的 30 个志愿病人进行评估。在进行一些试验后,发现用无菌巴斯德吸管的毛细作用引力连续地从阴道后穹窿中可取出 200—300ml 的液体。

每间隔一周给每个志愿者使用一个阴道栓。利用该方法,在每个间隔期获得适于研究 5—7 种生物体的材料。应注意在研究期间(三周),要求志愿者在插入阴道栓当天之前



至少 5 天抑制性活动。

用 pH 试纸检测阴道 pH 值。将 10ml 的阴道样液加到下列各种生物体在丰富的巧克力琼脂培养基上的刚接种的“菌苔上”：*Gardnerella Vaginalis*, 粪链球菌, 化脓链球菌, 无乳链球菌, 金黄色葡萄球菌, 金黄色葡萄球菌(产毒的毒珠); 淋病奈瑟氏球菌, 大肠杆菌, 肺炎克氏杆菌, 痢疾志贺氏杆菌, 伤寒沙门氏菌, 白色假丝酵母, 近平滑假丝酵母, 热带假丝酵母, 假热带假丝酵母以及 *Candida glabrata*。

结果: 在试验期间 pH 保持在 4.5。在整个研究期间阴道样液杀死上述微生物。

为了评估抗菌剂活性对病毒和沙眼衣原体的长期作用, 将按上述方法获得的阴道样液加入到含有敏感细胞以及  $10^4$  感染单位的沙眼衣原体或 II 型单纯疱疹病毒或 HIV 的 10cc 试管中。将该混合物培养 1 小时。然后超声振动破碎细胞, 并将以  $10,000 \times g$  离心后的上清物质加到易感细胞中并进行适当的培养。利用这些条件, 将沙眼衣原体以及病毒完全破坏。

每天使用本发明的阴道栓连续使用 60 天后安全性的估测

该项研究的目的是为了对健康人使用本发明的阴道栓的忍受以及任何有害作用进行评估。在该研究中, 患者每天插入一个阴道栓连续 60 天后并报道该患者或其性配偶在使用阴道栓后产生了有害作用。

对这些患者的临床和主观评估包括有或没有皮肤发炎,

有害作用,排泄物增加,感觉上改变等等,以及为了估测阴道菌群而进行的合适的微生物学检测以及如果适用于研究的话对其性伙伴也进行适当评价。

在该研究中,只有年龄为 18 岁至 45 岁之间的,一夫一妻制的,并且没有任何种类的妇科疾病,利用合适方法进行避孕的患者参加。下列患者应排除在本研究之外:即对本研究的产品过敏的患者,在整个研究时期内全身或局部需要使用抗菌剂的患者,有与念珠菌病相一致的临床或实验室病症的患者,有与活性 II 型单纯疱疹病毒感染相一致的损伤的患者,有萎缩性阴道炎的患者,有子宫颈炎的患者,或者是有与细菌性阴道炎相一致的迹象或症状的患者。

#### 结果:

每天使用本发明的阴道栓共使用 60 天的 103 名妇女中,有四名出现了轻度发炎,她们中的三名没有继续使用该产品。有四名患者其配偶出现发炎症状。没有患者抱怨敏感性发生了改变,干扰了其日常的活动或不利的排泄物。

因此,总的来说几乎在所有的研究群体中,都能很好地忍受本发明的阴道栓。本发明的阴道栓相对于其他类型的避孕和预防障碍方法更能被接受的原因应归纳于几个因素。它们是:本发明的阴道栓能很快分散。该阴道栓的赋形剂对于在优选实施方案的乳酸缓冲系统保持的自然温和酸性 pH 范围内的阴道上皮具有亲和力。由于阴道栓的组成成分对阴道上皮有亲和力,抗菌剂,包括杀精子剂不会引起阴道发炎。本发明的阴道栓不会导致不利的排泄物出现。总的来

说,在优选的实施方案中,2克小块的阴道栓相当于许多常规杀精子剂的5克剂量。由于其快速分散并吸附到上皮上,也可以快速地被生物降解。最后,该阴道栓具有帮助减少阴道排泄物的杀精子剂和某些抗菌剂的温和的去污作用。另外,该阴道栓不含有任何脂类(油,脂肪等),但含有吸附到整个阴道穹窿上的物质。因而使用该阴道栓不会有“乱糟糟”病症。

每隔一天使用本发明的阴道栓使用60天后的安全性的评估

本项研究的目的是为了评估健康人对使用本发明阴道栓的忍受性以及任何种类的不良影响。在该研究中,患者每隔一天插入一个阴道栓共使用60天,并且报告其自身或其性伙伴出现的不良影响。

临床和主观评估包括有或没有皮肤发炎,任何不良影响,排泄物的增加,感觉上的变化等等,以及为了评估阴道菌群而进行的适当的微生物学检测,以及如果适合该研究对其性伙伴进行的适当评估。在本项研究中,参加的患者的年龄为18至45岁之间,一夫一妻制的并且没有任何种类的妇科疾病,并且使用合适的避孕方法。

与患者每天使用一个阴道栓共使用60天的研究中排除患者的同样理由在本项研究中也排除同样情况的患者。

结果,在每隔一天使用本发明阴道栓的119名妇女中,有三人报告有轻度发炎。没有任何参加者的性伙伴报告对所使用的产品有中等或严重的副反应。只有6名患者抱怨

其性伙伴有轻度发炎。没有患者抱怨其感受性发生了改变，干扰了其通常的习惯或有不正当的排泄物。

### 本发明阴道栓对性病传染疾病发生率的影响

设计该项研究是为了评估本发明的阴道栓用于阻止非一夫一妻制患者阴道感染时的安全性及效果。只有申明每年有 4 或更多个不同性伙伴的患者才被考虑参与该项研究。患者还必须使用一种有效的避孕方式，适用于该研究目的的有效避孕方式的定义是子宫内装置 (IUD)，口服避孕药，阴道隔膜或子宫颈帽。参加该项研究的患者年龄在 18 至 45 岁之间并且月经有规律。

在该研究中，患者最好在性交前 5 分钟但也可以只有 2 分钟插入一个本发明的阴道栓。

基于参加者对安全性和效果的直接反应对其进行评估。例如患者回答这样的问题：你经受了灼烧或刺痛感吗？或者你想到你的配偶有同样问题吗？任何感受性上变化，以及对个人健康方面的影响例如在使用后存在不良排泄物都在被调查之列。此外，患者还应提供对其日常习惯的评估。在患者进入研究期间对其（阴道液）进行培养，估测是否存在酵母，淋病奈瑟氏菌，沙眼衣原体，*Gardnerella vaginalis* 以及定性地评估其主要的阴道细菌群。在研究开始和结束时都对患者进行 VDRL 和 HIV 检测。在研究开始和结束时还对患者进行结肠镜检查以估测是否存在人乳头瘤病毒 (HPV)。该项研究的持续时间为 6 个月。

结果：

主观判断结果：在被研究的 168 名妇女中，有四名抱怨有阴道发炎，两名抱怨其性伙伴有发炎现象。

临床结果：在被研究的 168 名妇女中，未发现有人感染了淋病奈瑟氏菌。VDRL 和 HIV 血清学结果保留阴性。四名患者感染了阴道毛滴虫，她们都没有症状。四名患者被诊断为细菌性阴道炎。在曾患有 II 型单纯疱疹毒感染的 43 名患者中，有 16 人爆发了 II 型单纯疱疹病毒临床症状。在以前没有 II 型单纯疱疹病毒感染史的患者中没有新的原始 II 型单纯疱疹发生。没有患者感染上沙眼衣原体，性病淋巴肉芽肿或性病肉芽肿。

所有患者在研究结束时阴道镜检查者正常。这不能绝对地排除研究期间患者能抗 HPV 感染，至少可以排除在本发明阴道使用期间 HPV 感染临床表现的发展。

关于该项研究，可以注意到在非一夫一妻制的人群中在每次接触前不能培养患者和其性伙伴的菌群（当然，培养是不可能的）因而要对其可能感染的危险性和类型进行定量估测显然是非常困难或不可能的。因此，只能以病人以前历史作为对照，才能从统计学计算和实际计算在性交之前使用本发明阴道栓，对研究群体中性传染疾病感染的发生率的降低程度。还值得注意的是，在研究期间没有遭受感染的患者承认她们不能保证，在性交之前“一直”使用了阴道栓。

本发明阴道栓对再发性念珠菌（酵母）感染的影响

该项研究的目的是为了调查本发明阴道栓在阻止有多种阴道酵母感染史的患者感染酵母时的安全性以及效果。

在该研究中参加的患者在前一年按季度分有至少四种不同的念珠菌感染症状。为了该研究目的,在每一种酵母感染症状出现前至少一周内没有症状出现(没有 puritis, 感染或排泄物出现)。此外,最近一次发病出现后至少一周没有症状出现。患者的年龄在 18 和 45 岁之间,并且月经期有规律。已知对本发明的产品成分有过敏性的患者不参与该项研究。在进入研究阶段时她们在临床和/或微生物检查中有阴门阴道炎症状时也不参加该研究。

基于其对涉及安全性和效果和临床检查的直观回答而对患者进行评估。例如被问这样的问题:你经受了灼烧,刺痛和或使用阴道栓后有排泄物吗? 研究持续期为 6 个月。如果没有症状每二个月以及在各种阴道炎症状出现时对患者菌群进行培养。

结果:每隔一天使用本发明阴道栓的所有患者都能很好地忍受。唯一的发炎症是由酵母感染引起的,在症状出现的任意间隔期内没有产生由于使用该阴道栓而导致的疾症。

在参加本项研究的四十名患者中,有 13 人四次发作酵母感染,12 人三次发作酵母感染,有 15 人在研究期间只有二次感染发作。

在遭受四次感染的 13 名患者中,有四人正使用细胞毒性药物,有二名使用细胞毒性药和糖皮(质)甾类以及四名使用糖皮(质)甾类。另外,四名患者有胰岛素依赖性糖尿病。也有过分肥胖的,体重超过理想值 50% 的患者。三次感染发作的 12 名患者中,有三名使用糖皮质甾类,二名使用胞毒剂,

三人有胰岛素依赖性糖尿病,四人过分肥胖。

从118次感染发作中分离到的酵母种中,有六十种是白色假丝酵母,18种是 *Candida glabrata*,有四种是热带假丝酵母,三种是近平滑假丝酵母。其余的人有混合感染,但在不同的感染速率组之间没有显著不同。

讨论:在有多种酵母感染史的患者中使用了本发明的阴道栓后可以明显地降低该患者群中疾病复发的发生率。而在该项研究中,患有再发性感染史的患者组要完全消除酵母感染发生是不可能的,遭受3—4种念珠菌感染的大多数患者使用胞毒剂和/或糖皮(质)甾类。此外,其他的代谢性有害状况例如糖尿病或过度肥胖,毫无疑问也会导致酵母感染难于治愈。

没有代谢紊乱状况,但有其他所谓的环境因素影响例如十分活跃性格以及穿紧身和约束性衣服的患者其感染速率最低。

重要的是这些患者中仅有5人在停止使用本发明阴道栓后二周内,不再具有作为主要阴道细菌群系的乳杆菌。这些资料意味着有多种因素与患者患有继发性发作的酵母感染有关。导致患有此症的至少一种因素是没有能力重建以乳杆菌作为主要菌群的阴道细菌群,该因素极大地和有利于地影响本发明的阴道栓。