



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106974932 B

(45) 授权公告日 2021.05.04

(21) 申请号 201610997927.6

(22) 申请日 2016.11.11

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106974932 A

(43) 申请公布日 2017.07.25

(30) 优先权数据  
15194288.5 2015.11.12 EP

(73) 专利权人 格洛克保健科学研究有限责任公  
司  
地址 奥地利德意志瓦格拉姆

(72) 发明人 G. 格洛克

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

A61K 33/06 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 15/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2009133413 A1, 2009.11.05

WO 2006132515 A1, 2006.12.14

CN 1301142 A, 2001.06.27

WO 2007054085 A2, 2007.05.18

WO 0064586 A1, 2000.11.02

审查员 李友

权利要求书1页 说明书12页 附图14页

(54) 发明名称

阴道炎的治疗

(57) 摘要

本发明涉及阴道真菌病,细菌性阴道病和其它形式的阴道炎(阴道的炎症)的治疗。根据本发明,为此目的外部使用具有0.2至10 μm之间粒度的斜发沸石,用于治疗哺乳动物和人类中的这些阴道病症,并且也用于恢复健康的阴道微生物群。斜发沸石可以与一种或多种以下佐剂一起使用:药学上可接受的载体材料,活的微生物和/或其提取物,用于健康阴道微生物群的营养物(例如乳糖等),有利地影响健康阴道微生物群的阴道环境的物质(例如雌二醇、有机酸等)。所用的组合物可以局部应用,优选以下列施用形式之一:泡沫、栓剂、阴道片剂、卵状小体、凝胶、气溶胶、粉剂、漂洗剂、灌洗剂、霜剂/软膏剂、悬浮剂。

1. 斜发沸石在制备用于治疗哺乳动物和人的阴道病症的药物中的用途,其中所述斜发沸石具有在0.2和10 $\mu\text{m}$ 之间的粒度,其中所述阴道病症是由白色念珠菌或近平滑假丝酵母引起的。

2. 根据权利要求1的用途,其特征在于所述斜发沸石已经不含重金属。

3. 根据权利要求1或2的用途,其特征在于所述斜发沸石与下列一种或多种佐剂一起使用:

- 药学上可接受的载体材料,
- 活的微生物和/或其提取物,
- 用于健康阴道微生物群的营养物,
- 有利地影响健康阴道微生物群的阴道环境的物质。

4. 根据权利要求3的用途,其中所述用于健康阴道微生物群的营养物为乳糖。

5. 根据权利要求3的用途,其中所述有利地影响健康阴道微生物群的阴道环境的物质为雌二醇或有机酸。

6. 根据权利要求1的用途,其特征在于所述斜发沸石以下列施用形式之一局部应用:泡沫、栓剂、阴道片剂、卵状小体、凝胶、气雾剂、粉剂、漂洗剂、灌洗剂、霜剂/软膏剂、悬浮剂。

## 阴道炎的治疗

[0001] 本发明涉及根据权利要求1的阴道霉菌病,细菌性阴道病(bacterial vaginosis),以及其它形式的阴道炎(阴道炎症)的治疗。

[0002] 从WO 00/64586已知一种用于粉碎矿物材料的设备和相关方法,对此,随后存在有它可以被成功使用的疾病的粗略列表,实际上没有遗漏疾病。几次提及涉及致癌性病、肝脏病症、糖尿病和多发性硬化的测试,根本没有测试构造(testing organization)的任何知识或任何细节。提及的申请的其它领域为食物、化妆品、作物保护产品、香烟,和建筑行业中原材料的生产。所描述的设备能够粉碎超过98%的所有低于4.3 $\mu\text{m}$ 的颗粒,所有颗粒的超过28%小于0.5 $\mu\text{m}$ 。这些细节和本申请的细节之间没有联系。

[0003] 来自同一发明人的是WO 2007/054085,其公开了粉碎至低于100纳米(对应于0.1 $\mu\text{m}$ )的斜发沸石(clinoptilolite),与作为抗病毒剂的蜂胶(propolis)和/或初乳(colostrum),用于治疗状况,包括流感、感冒、咳嗽、麻疹、腮腺炎、风疹、掌掴脸颊综合征(slapped cheek syndrome)、三日热(three-day fever)、水痘、普弗菲尔氏腺热(Pfeiffer's glandular fever)、SARS、巨细胞病毒,腹泻,肝炎,脊髓灰质炎,唇疱疹(herpes labialis)、疣、狂犬病、拉沙热(Lassa fever)、埃博拉(Ebola)、马尔堡热(Marburg fever)、汉坦病毒热(hantavirus fever)、FSME、RSSE、放射性脑炎(Louping-ill encephalitis)、波瓦生脑炎(Powassan encephalitis)、基萨那森林热(Kyasanur forest fever)、鄂木斯克出血热(Omsk hemorrhagic fever)、科罗拉多蜱热(Colorado tick fever)、黄热病(yellow fever)、登革热、日本脑炎、西尼罗热(West Nile fever)、奇昆尼亚热(Chikungunya fever)、Q'nyong-nyong热、裂谷热(Rift valley fever)、白蛉热 sandfly fever、罗斯河热(Ross river fever)、辛德比斯热(Sindbis fever)、马约罗热(Mayaro fever)、墨累谷脑炎(Murray valley encephalitis)、圣路易斯脑炎(St.Louis encephalitis)、罗西奥脑炎(Rocio encephalitis)、加利福尼亚脑炎(California encephalitis)、布尼亚维拉热(Bunyamwera fever)、奥罗波希热(Oropouche fever)、AIDS、生殖器疱疹(herpes genitalis)和/或单纯疱疹。作为AIDS的“治疗”的一部分,发生的临床情况之一特别被说成是阴道念珠菌病。没有提及临床测试,且一切都是纯粹怀有希望的想法。

[0004] 源自本申请发明人的WO 2008/003101公开了用于纯化斜发沸石以除去重金属的方法。

[0005] WO 2010/057849描述了通过应用粉碎的斜发沸石(其降低了胺的浓度)的伤口愈合的改善。没有更为详细地提到个体应用,叙述了2到16 $\mu\text{m}$ 的粒度(particle size),其还需要拥有规定的zeta电位和规定的比表面积;没有叙述测量方法。指示的实例仅是使用人工创建的含胺的水溶液的体外实验。

[0006] 从EP 956 858已知益生菌在阴道感染的治疗中是有用的。

[0007] 通常可以观察到以下情况:

[0008] 在典型的(健康)情况下,成年女性的阴道微生物群(microbiota)在很大程度上由各种乳杆菌(lactobacilli)(取决于种族划分,卷曲乳杆菌(Lactobacillus crispatus)、

加氏乳杆菌 (*L. gasseri*)、惰性乳杆菌 (*L. iners*)、詹氏乳杆菌 (*L. jensenii*) 构成,其除了别的以外还确保最佳pH和抑制病原体的生长。受各种环境因素的影响,天然阴道菌群受到攻击,并且作为不平衡的结果(生态失调),可以存在致病微生物的流行。

[0009] 本发明的目标和目的在于规定一种治疗,其首先尽可能有效地控制病原微生物,且第二,尽量远地保留有用的乳杆菌。

[0010] 根据本发明的这个目的是通过权利要求1中详述的特征来实现的;换句话说,局部(外部)使用粒度在0.2到10 $\mu$ m之间的斜发沸石以治疗哺乳动物和人的诸如细菌性阴道炎、外阴阴道念珠菌病和毛滴虫病的细菌性阴道炎,以及也用于恢复健康的阴道微生物群。对于这是可能或获得的管辖权(jurisdictions),本发明在于使用具有在0.2到10 $\mu$ m之间的粒度的斜发沸石制造药用产品,用于治疗开始确定的病症。

[0011] 斜发沸石优选已不含(been freed from)重金属,更优选地通过根据EP2 040 837或相应的US 8,173,101中所指出的方法实现。对于可能的管辖权,这些出版物的公开内容通过引用成为本专利申请的内容的一部分。

[0012] 根据本发明的物质的有效性从对许多不同微生物菌株的研究和实验(如下概述)中来看是显而易见的。已经证明所述物质对念珠菌属(*Candida*)的成员具有生长抑制效果,还对阴道菌群的选择的细菌病原体具有生长抑制效果,而事实上促进健康阴道菌群的代表的生长。

[0013] 为了说明粒度和活性之间的联系,在实验结束时附加相应的比较实验来证明活性。

[0014] 在[n]中放置的指示指在说明书结尾给出的参考文献。结果以附图的形式表示于各种表格和图形中,其中:

[0015] 图1:显示了白色念珠菌(*Candida albicans*)在含有/不含沸石的Sab肉汤中的生长,

[0016] 图2:显示了萨布罗肉汤(Sabouraud broth)中沸石对白色念珠菌的生长的效果,

[0017] 图3:显示了孵育300min后,沸石对白色念珠菌培养物的微生物计数的效果,

[0018] 图4:显示了萨布罗肉汤中沸石对白色念珠菌的生长的效果(Vialight测定),

[0019] 图5:显示了萨布罗肉汤中沸石对近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)生长的效果,

[0020] 图6:显示了萨布罗肉汤中沸石对近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)生长的效果,

[0021] 图7:显示了孵育15小时后,通过Vialight测定测量的沸石对阴道加德纳菌(*Gardnerella vaginalis*)存活力(viability)的生长效果,

[0022] 图8:显示了孵育15小时后通过Vialight测定测量的沸石对阴道加德纳菌存活力的生长效果,

[0023] 图9:显示了沸石对卷曲乳杆菌(*L. crispatus*)的生长的效果-孵育6和24小时后ATP测量,

[0024] 图10:显示了孵育24小时后通过菌落计数确定的卷曲乳杆菌培养物的细胞计数,

[0025] 图11:显示了孵育24小时后卷曲乳杆菌的培养基和培养物的pH值,

[0026] 图12:显示了3小时内MRS肉汤中沸石对詹氏乳杆菌(*L. jensenii*)生长的效果,

- [0027] 图13:显示了4和7小时内MRS肉汤中沸石对詹氏乳杆菌生长的效果,
- [0028] 图14:显示了MRS肉汤中沸石对于干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 的生长效果—刃天青 (Resazurin) 测定,
- [0029] 图15:显示了MRS肉汤中沸石对于干酪乳杆菌的生长效果—Vialight测定,
- [0030] 图16:显示了孵育6小时后各种培养物和共培养物的乳酸含量,
- [0031] 图17:显示了各种24小时龄的培养物和共培养物的乳酸含量,
- [0032] 图18-20:显示了具有不同培养物的琼脂平板,
- [0033] 图21-23:显示了在比较实验中使用的粒度分布。
- [0034] 图24和25显示了粒度分布依赖的白色念珠菌的生长—刃天青测量,
- [0035] 图26-28显示了相同的对于光滑假丝酵母 (*C.glabrata*) 和
- [0036] 图29显示了粒度分布依赖的光滑假丝酵母的生长—Vialight测定。
- [0037] 病症及其治疗:
- [0038] 阴道真菌病:
- [0039] 阴道真菌病代表位于细菌性阴道炎之后的阴道感染的第二大常见原因。
- [0040] 确认的感染的主要致病生物是念珠菌属的酵母,其中白色念珠菌占有所有阴道真菌感染的85-90%。
- [0041] 促进阴道真菌病的风险因素有:
- [0042] 怀孕
- [0043] 抗生素的使用
- [0044] 糖尿病
- [0045] 免疫抑制剂
- [0046] 癌症治疗药物
- [0047] 含可的松的药物
- [0048] 压力或精神负荷 (Stress or mental loading)
- [0049] 现有技术中,推荐的疗法在于诸如多烯 (polyenes) (制霉菌素 (nystatin))、咪唑 (imidazoles) (布康唑 (butoconazoles)、克霉唑 (clotrimazole) 等) 或环吡酮胺 (ciclopirox olamine) 的各种抗真菌剂 (antimycotics) 的局部应用 (topical application)。它们以如阴道片剂、卵状小体 (ovules) 或阴道霜剂 (vaginal cream) 的大量不同制剂形式阴道内施用。治疗的持续时间可以是1至7天。进一步的可能性在于活性三唑成分 (氟康唑 (fluconazole)、伊曲康唑 (itraconazole)) 的单次施用。与抗真菌治疗平行,局部施用益生菌 (probiotics) (如Gynoflor, Multi-Gyn Flora plus等等) 可以支持重建阴道菌群 (flora) 和降低局部pH。这些产品 (阴道片剂、卵状小体、凝胶、霜剂等) 可尤其含有活的乳杆菌 (“德得来因杆菌 (Doderlein bacilli)”) 或其裂解物,且还可含有雌三醇 (其作为雌激素衍生物促进“健康”粘膜环境的发展) 和作为乳杆菌营养物的乳糖。
- [0050] 在局部免疫缺陷的情况下,在治疗结束后仅短时间就有复发。针对这种长期复发的白色念珠菌外阴阴道炎 (vulvovaginitis), 在缺乏替代品的情况下,推荐局部或口服维持治疗以避免复发。在此,作为初始治疗,施用如上所述的局部产品7-14天,且与此平行,在第一周口服施用3x200mg氟康唑 (fluconazole)。维持治疗随后由每周施用150mg氟康唑组成。

[0051] 除非另有说明,否则说明书、权利要求和附图中的所有浓度数字应被视为mg/ml或%M/V[kg/升]。

[0052] 根据本发明,具有在0.2和10 $\mu$ m之间粒度的斜发沸石以1mg/ml至10mg/ml的浓度{对应于0.1%M/V至1%M/V,当M以kg计且V以升计}被局部施用,且对白色念珠菌具有以下效果:

[0053] 第一实验:

[0054] 根据常规常用的方法,在酵母葡萄糖氯霉素(YGC)琼脂上培养白色念珠菌(DSM No.1386)[4]并此后转移到液体培养基(萨布罗肉汤)中。

[0055] 在使用Thoma计数室确定细胞计数后,产生12个实验培养物,每个具有1 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞/ml,其中四个培养物中不加入沸石粉末(对照),四个培养物中加入1mg/ml量的沸石粉末,且进一步的四个培养物中加入10mg/ml量的沸石粉末。将实验培养物在37 $^{\circ}$ C有氧条件下振荡孵育。

[0056] 为了确定空白值,还用所有没有微生物的培养基进行实验。

[0057] 在6小时的期间内,每小时取等份的培养物以通过存活力测定(刃天青测定)[7]的方式确定代谢活性。

[0058] 结果(从该结果看高活性是立即明显的)在图1中以图形形式示出;曲线从上到下:0%;0.1%和1%沸石。

[0059] 第二实验:

[0060] 重复上述实验,具有以下两个改变:

[0061] -实验时间延长至7小时

[0062] -在孵育5小时后稀释等份的培养物以确定实际细胞计数,然后铺在萨布罗琼脂上,并在孵育后通过菌落计数进行评价。

[0063] 图2显示刃天青测定的结果;曲线如图1。证实了前述生长实验的结果。以图形方式表示于图3中的是实验组的以经验确定的微生物计数(从左:0%,0.1%和1%沸石)。

[0064] 第三实验:

[0065] 在实验的进一步重复中,选择代谢活性的替代测量(Vialight测定)[8]以加强实验的结果。图4(柱,在每种情况下从左起:0、0.1%和1%沸石)显示在孵育3、4和5小时后的实验组。可以看出,使用根据本发明的物质再一次可能实现降低肉汤培养物中白色念珠菌的代谢活性。

[0066] 随后在10mg/ml和50mg/ml的浓度下,在近平滑假丝酵母(自用分离物(in-house isolate);S 0811-01)[9]上测试根据本发明的物质的效果:

[0067] 首先根据常规实践中常用的方法在YGC琼脂上培养近平滑假丝酵母,然后转移到液体培养基(萨布罗肉汤)中并孵育。

[0068] 在使用计数室确定细胞计数后,生产9个实验培养物(酵母培养物),每个具有1 $\times$ 10<sup>6</sup>个酵母细胞/ml,其中不向3种培养物中加入沸石粉末(对照),向3种培养物中加入10mg/ml(1%M/V)量的沸石粉末,向另外3个培养物中加入50mg/ml(5%M/V)量的沸石粉末。将实验培养物在30 $^{\circ}$ C下振荡孵育:

[0069] 3x 12ml萨布罗肉汤

[0070] 3x 12ml萨布罗肉汤,1%沸石

[0071] 3x 12ml 萨布罗肉汤和5%沸石

[0072] 为了测定空白值,将所有培养基的等分试样也在没有微生物的情况下温育,并且也用这些等份试样进行实验。

[0073] 在60min、120min,以及接着每再30min后,使用常见的存活力测试(刃天青测定)间接测定每个实验培养物的代谢活性。对相同条件的三个培养物的测量进行平均,包括标准差,示于图5(曲线,从顶部起:0mg/ml、10mg/ml和50mg/ml)。

[0074] 可以看出,使用根据本发明的物质的两种剂量都导致实验微生物生长的显著抑制。

[0075] 第四实验:

[0076] 根据本发明的物质在1mg/ml和0.2mg/ml的浓度下对近平滑假丝酵母的效果:

[0077] 首先根据常规实践中常用的方法在YGC琼脂上培养近平滑假丝酵母,然后转移到液体培养基(萨布罗肉汤)中并孵育。

[0078] 在使用Neubauer计数室测定细胞计数后,生产9个实验培养物(酵母培养物),每个具有 $1 \times 10^6$ 个酵母细胞/ml,其中不向3种培养物中加入沸石粉末(对照),向3种培养物中加入1mg/ml (0.1%M/V)量的沸石粉末,和向另外3个培养物中加入0.2mg/ml (0.02%M/V)量的沸石粉末。将实验培养物在30°C下振荡孵育:

[0079] 3x 12ml 萨布罗肉汤

[0080] 3x 12ml 萨布罗肉汤,0.1%沸石

[0081] 3x 12ml 萨布罗肉汤和0.02%沸石

[0082] 为了测定空白值,将所有培养基的等分试样也在没有微生物的情况下温育,并且也用这些等份试样进行实验。

[0083] 在60min、120min,以及接着每再30min后,使用常见的存活力测试(刃天青测定)间接测定每个实验培养物的代谢活性。对相同条件的三个培养物的测量进行平均,包括标准差,示于图6(曲线,从顶部:0%、0.02%和0.1%沸石)。

[0084] 即使在使用的最低浓度(0.02%),图6的中线,根据本发明的物质对近平滑假丝酵母具有显著的生长阻滞(growth-retarding)作用。

[0085] 细菌性阴道炎

[0086] 细菌性阴道炎代表阴道炎的最常见形式。

[0087] 其发生在健康的 $H_2O_2$ -生产阴道菌群(主要是乳杆菌的各种代表)生态失调(dysbiosis)中主要被厌氧细菌所替代时。这些细菌主要包括阴道加德纳菌(*Gardnerella vaginalis*)和阴道阿托波氏菌(*Atopobium vaginae*),但也代表巨球藻属(*Megasphaera*)、小杆菌属(*Dialister*)、动弯杆菌(*Mobiluncus*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)等。

[0088] 促进细菌性阴道炎的风险因素包括以下项:

[0089] 低社会经济地位(Low socioeconomic status)(-->压力)

[0090] 频繁阴道冲洗(Frequent vaginal douching)

[0091] 抽烟

[0092] 与频繁变化的伴侣的无保护的性关系

[0093] 子宫中的避孕药

[0094] 频繁使用相对高剂量的杀精子剂壬苯醇醚-9(Nonoxynol-9)

[0095] 推荐疗法:

[0096] 在怀孕外,使用甲硝唑 (Metronidazol) (2x 500mg/天) 进行7天治疗。其它可能性在于以2%阴道霜剂形式的甲硝唑或克林霉素 (Clindamycin) 的局部施用(持续时间:7天)。也可以使用阴道片剂,每日两次局部施用500mg甲硝唑,持续7天。还有用于阴道内施用克林霉素的卵状小体(每日100mg,持续3天)。

[0097] 然而,所述的疗法不能消除粘附的细菌生物膜,且因此3个月后的治愈率仅为60-70%,且甚至在6个月后更低。通过使用益生菌,其作用包括降低阴道pH和促进健康的阴道菌群,可以将BV的复发率降低大约一半(参见[2]:阴道真菌病的S1治疗)

[0098] 根据本发明的物质的有效性从下面描述的对阴道加德纳菌的实验和研究中是显而易见的:

[0099] 第五实验:

[0100] 根据本发明的物质在1mg/ml (0.1%M/V) 和10mg/ml (1%M/V) 的浓度下对阴道加德纳菌的效果:

[0101] 根据常规实践中常用的方法将阴道加德纳菌 (DSM No. 4944) [5] 培养于卡斯曼琼脂 (Casman agar) 上并随后转移到液体培养基 (TSB+5% 马血清) 中。

[0102] 使用Thoma计数室测定细胞计数后,生产12个实验培养物,每个具有 $1 \times 10^5$ 细胞/ml,其中不向4种培养物中加入沸石粉末(对照),向4种培养物中加入1mg/ml量的沸石粉末,和向另外4个培养物中加入10mg/ml量的沸石粉末。将实验培养物在37°C厌氧条件下振荡孵育15小时。

[0103] 为了测定空白值,也在没有微生物的所有培养基上进行实验。

[0104] 随后,取等份的培养物用于通过存活力测试 (Vialight测定) 的方式确定代谢活性。

[0105] 结果以图形的形式示于图7(柱,从左:0%、0.1%和1%沸石)。

[0106] 第六实验:

[0107] 以甚至更低的起始细胞数 ( $5 \times 10^4$ 细胞/ml) 重复生长测试,并给出类似的结果;参见图8(柱,从左:0%,0.1%和1%沸石)。

[0108] 从下面描述的对乳杆菌属细菌进行的研究和实验中,根据本发明的物质促进健康阴道菌群的生长是显而易见的:

[0109] 第七实验:

[0110] 根据常规实践中常用的方法在de Man Rogosa Sharp (MRS) 琼脂上厌氧培养卷曲乳杆菌 (DSM No. 20584) [6],并随后转移到液体培养基 (MRS肉汤) 中。

[0111] 使用Thoma计数室测定细胞计数后,生产12个实验培养物,每个具有 $1 \times 10^6$ 细胞/ml,其中不向4种培养物中加入沸石粉末(对照),向4种培养物中加入1mg/ml量 (0.1%M/V) 的沸石粉末,和向另外4个培养物中加入10mg/ml (1%M/V) 量的沸石粉末。将实验培养物在37°C厌氧条件下振荡孵育。

[0112] 为了测定空白值,也在没有微生物的所有培养基上进行实验。

[0113] 在6和24小时后,取等份的培养物用于通过存活力测试 (Vialight测定) 确定代谢活性;参见图9(柱,从左,在每种情况下:0%,0.1%和1%沸石)。另外,24小时后,稀释等份的培养物并铺板到MRS琼脂上;参见图10(柱,从左:0%,0.1%和1%沸石);并且在实验结束

时通过pH电极测量实验培养物的pH值；参见图11（柱，在每种情况下：培养基在左侧，培养物在右侧，在每种情况下从左：0%，0.1%和1%沸石）。

[0114] 菌落计数的结果（图10）证实了存活力测量；图11显示了孵育24h后的培养物的pH值。不论是否加入本发明的物质，在所有情况下，微生物将培养基的pH降低至3.8以下。

[0115] 第八实验：

[0116] 根据常规实践中常用的方法，将詹氏乳杆菌（DSM No.20557）[12]厌氧培养于de Man Rogosa Sharp（MRS）琼脂上，并随后转移到液体培养基（MRS肉汤）中。

[0117] 使用Thoma计数室测定细胞计数后，生产12个实验培养物，每个具有 $5 \times 10^5$ 细胞/ml，其中不向4种培养物中加入沸石粉末（对照），向4种培养物中加入1mg/ml量（0.1%M/V）的沸石粉末，和向另外4个培养物中加入10mg/ml（1%M/V）量的沸石粉末。将实验培养物在37°C厌氧条件下振荡孵育。

[0118] 为了测定空白值，也在没有微生物的所有培养基上进行实验。

[0119] 在3小时后，取等份的培养物用于通过存活力测试（Vialight测定）确定代谢活性。图12以图形形式显示实验的结果。通过与根据本发明的物质孵育，代谢性能的提高是明显的。

[0120] 第九实验：

[0121] 在延长孵育时间的情况下重复生长实验。以与上述相同的方式在4和7小时后测量代谢活性（Vialight测定）。图13以图形形式显示了测量结果的分析。根据本发明的物质在7小时后对詹氏乳杆菌的生长促进作用比实验8中的3小时后更为清晰可见。

[0122] 第十实验：

[0123] 根据常规实践中常用的方法，将干酪乳杆菌（DSM No.20011）[11]厌氧培养于de Man Rogosa Sharp（MRS）琼脂上，随后转移到液体培养基（MRS肉汤）中。

[0124] 使用Thoma计数室测定细胞计数后，生产12个实验培养物，每个具有 $5 \times 10^5$ 细胞/ml，其中不向4种培养物中加入沸石粉末（对照），向4种培养物中加入1mg/ml量（0.1%M/V）的沸石粉末，和向另外4个培养物中加入10mg/ml（1%M/V）量的沸石粉末。将实验培养物在37°C有氧条件下振荡孵育。

[0125] 为了测定空白值，也在没有微生物的所有培养基上进行实验。

[0126] 在1、3和5小时后，取等份的培养物，通过活力测试（刃天青测定和Vialight测定）确定代谢活性；（参见图14和图15；两个柱，从左：0%，0.1%和1%沸石）。

[0127] 图14和15中的结果令人惊讶地显示，根据本发明的物质在测试时间内对实验微生物的代谢活性根本没有影响。在实验的宽部分里（Over wide sections of the experiment），可能既不能通过刃天青测定也不能通过ATP测定来测量个体条件之间的显著差异。

[0128] 令人惊奇的是，根据本发明的物质明显地并且相当具体地在其生长上促进了与健康阴道菌群有关的卷曲乳杆菌和詹氏乳杆菌物种，但同时没有对与阴道菌群不相关的干酪乳杆菌物种的生长产生影响。

[0129] 以下研究和实验证明，根据本发明的物质与阴道乳杆菌菌株组合促进健康阴道环境的再生，并对阴道加德纳菌（阴道病的主要病原体之一）起生长抑制作用。

[0130] 第十一实验：

[0131] 根据常规实践中常用的方法,首先将卷曲乳杆菌(DSM No.20584) [6]和阴道加德纳菌(DSM No.4944) [5]培养于纯培养物中。

[0132] 在使用Thoma计数室确定预培养物的细胞计数后,在混合培养基(TSB+HS和MRS中,比例为7+3)中产生各自具有 $5 \times 10^5$ 细胞/ml的12个实验培养物(培养物和共培养物):

[0133] 1x 10ml的培养基(7ml TSB+5%马血清和3ml MRS肉汤)

[0134] 1x阴道加德纳菌

[0135] 1x阴道加德纳菌+0.5%沸石

[0136] 1x卷曲乳杆菌

[0137] 1x卷曲乳杆菌+0.5%沸石

[0138] 1x卷曲乳杆菌+阴道加德纳菌(5:1)A

[0139] 1x卷曲乳杆菌+阴道加德纳菌+0.5%沸石(5:1)A

[0140] 1x卷曲乳杆菌+阴道加德纳菌(5:1)B

[0141] 1x卷曲乳杆菌+阴道加德纳菌+0.5%沸石(5:1)B

[0142] 1x卷曲乳杆菌+阴道加德纳菌(10:1)A

[0143] 1x卷曲乳杆菌+阴道加德纳菌+0.5%沸石(10:1)A

[0144] 1x卷曲乳杆菌+阴道加德纳菌(10:1)B

[0145] 1x卷曲乳杆菌+阴道加德纳菌+0.5%沸石(10:1)B

[0146] 将实验培养物在定轨摇床上37°C厌氧条件下孵育。在6和24h后,离心等份的培养物(5分钟,15000g),将上清液在80°C的水浴中失活15min,并进行乳酸的酶法定量[13]。由阴道乳杆菌产生的乳酸代表了健康阴道环境的主要因素之一。

[0147] 孵育6h后的测量结果以图形的形式示于图16中。在每种情况下将共培养物的值取平均值用于该图。

[0148] 从图16可以清楚地看出,将根据本发明的物质加入到共培养物中促进了通过卷曲乳杆菌的乳酸产生。

[0149] 在饱和培养物中,在24h的孵育时间之后,所有共培养物具有与卷曲乳杆菌纯培养物大致相等的乳酸盐含量(参见图17),这表明该微生物是环境的决定因素。

[0150] 第十二实验:

[0151] 根据常规实践中常用的方法,在液体培养基中厌氧培养卷曲乳杆菌(DSM No.20584) [6]和詹氏乳杆菌(DSM No.20557) [12]。所使用的营养培养基是具有和不具有根据本发明的物质(10mg/ml)添加的MRS肉汤,其在实验前已在相同培养基中预条件化。将等份的饱和培养物离心并如下所述测试上清液对阴道加德纳菌的生长抑制作用。

[0152] 阴道加德纳菌在TSB+5%马血清中生长过夜,并密集接种到BHI+5%马血清琼脂平板上。然后使用无菌移液管尖端将三个孔打孔到每个板中。将乳杆菌培养物的上清液移液到琼脂平板中的这些凹处(recesses)中。所使用的阳性对照是抗生素(青霉素/链霉素)的混合物,而使用培养基(离心的MRS肉汤)用作阴性对照。将平板在37°C厌氧培养,直到可检测到阴道加德纳菌的菌苔(lawn)生长。为了提高空气湿度,将湿布加入到培养容器中。

[0153] 在评估时,阴道加德纳菌的生长抑制以抑制区的形式是明显的,在含有培养物上清液的凹处的四周是可见的。这种效果可以在所测试的两种乳杆菌菌株的情况下发现(其中上清液含有和不含有根据本发明的物质的添加),但是对卷曲乳杆菌比对詹氏乳杆菌更

强烈地显示。下面的图(图18、19和20)通过例子的方式显示了在实验的评价时的琼脂板。阴道加德纳菌的致密菌苔在乳杆菌培养物的上清液(以及作为阳性对照进行的抗生素的上清液)四周凹陷。

[0154] 总之,可以说,首先,通过根据本发明的物质对潜在致病性阴道微生物的生长可能显示出抑制或负面影响。第二,已经可以记录,健康阴道微生物群的相关微生物不仅不损害它们的生长,而且事实上促进它们的生长。根据本发明的物质对致病性阴道微生物的这种生长抑制作用,伴随着健康阴道微生物群的促进趋势和特异性促进,可以被认为是令人惊讶和新颖的。

[0155] 关于根据本发明的沸石粉末的粒度分布的效果,为下面描述的比较实验生产三个不同的批次。在此,符合图21的分布被称为“超细沸石粉末”(ultrafine zeolite powder),符合图22的分布称为“标准沸石粉末”(standard zeolite powder),以及符合图23的分布被称为“粗沸石粉末”(coarse zeolite powder)。在这方面的表格数据如下:

[0156] “超细沸石粉末”

[0157]		<b>d (0.1) <math>[\mu\text{m}]</math></b>	<b>d (0.5) <math>[\mu\text{m}]</math></b>	<b>d (0.9) <math>[\mu\text{m}]</math></b>	<b>残渣</b>
	<b>MW</b>	0.19	0.38	1.06	5.36
[0158]	<b>S</b>	0.00	0.00	0.01	0.14
	<b>RSD</b>	0.54	1.13	1.37	2.69

[0159] “标准沸石粉末”(还用于实施例1-12)

[0160]	<b>008-02-08-4-0-0</b>	<b>d (0.1) <math>[\mu\text{m}]</math></b>	<b>d (0.5) <math>[\mu\text{m}]</math></b>	<b>d (0.9) <math>[\mu\text{m}]</math></b>	<b>残渣</b>
	<b>MW</b>	1.35	3.09	5.85	0.98
	<b>S</b>	0.01	0.01	0.01	0.05
	<b>RSD</b>	0.54	0.25	0.14	5.04

[0161] “粗沸石粉末”

[0162]		<b>d (0.1) <math>[\mu\text{m}]</math></b>	<b>d (0.5) <math>[\mu\text{m}]</math></b>	<b>d (0.9) <math>[\mu\text{m}]</math></b>	<b>残渣</b>
	<b>MW</b>	1.63	9.51	35.66	0.56
	<b>S</b>	0.00	0.05	0.24	0.02
	<b>RSD</b>	0.15	0.56	0.66	2.93

[0163] 因此,“超细沸石粉末”对应于本发明的下范围(lower range),“标准沸石粉末”对应于本发明的上范围(upper range),并且“粗沸石粉末”具有约50%的位于本发明范围之外(高于)的其质量。

[0164] 实验方案如下:

[0165] 根据常规实践中常用的方法,在液体培养物(萨布罗肉汤)中培养白色念珠菌。在使用Thoma计数室确定细胞计数后,生产12个实验培养物,每个具有 $1 \times 10^5$ 细胞/ml,其中不

向3个培养物中加入沸石粉末(对照),向3个培养物中加入10mg/ml量的标准尺寸分布的沸石粉末,向另外3个培养物中加入10mg/ml量的超细沸石粉末,和再向3个培养物中加入10mg/ml量的粗沸石粉末。将实验培养物在37℃有氧条件下振荡孵育。

[0166] 为了测定空白值,也在没有微生物的所有培养基上进行实验。

[0167] 在7小时期间,以每小时一次的间隔取等份的培养物,通过活力测定(刃天青测定)确定代谢活性。刃天青测定是在用于测量物质的细胞毒性的生物医学研究中经常使用的测定。将氧化还原指示剂刃天青加入到培养物样品中,并通过在细胞代谢中产生的NADH还原形成荧光试卤灵(resorufin),该试卤灵的浓度通过荧光测定法测定[7]。

[0168] 图24以图形形式示出了结果。清楚明显的是,沸石粉末对实验微生物生长的影响主要取决于颗粒尺寸。因此,具有超细沸石粉末的实验培养物(虚线曲线,图的右手侧区中的最低曲线)和标准沸石粉末(短虚线曲线,超细沸石曲线上方的下一个曲线)比粗粒度级分(fraction)(长虚线曲线,依次为上方的下一个)显示出显著更大的代谢性能抑制。最上面的曲线,对应于对照组,在早得多的阶段达到对数生长期(其也更加强烈明显)。

[0169] 图25以柱状图形式显示孵育5、6和7小时后的测量。在这种情况下的排列,在每种情况下从左到右为粗沸石粉末、标准沸石粉末、超细沸石粉末和对照组。清楚明显的是,粗粒度级分(最左)的数值最接近于那些不含沸石的对照(最右)的数值。

[0170] 为了检查是否所使用的沸石粒度的不同效果还可以由来念珠菌属的其它阴道病原体所证明,对于光滑假丝酵母(*Candida glabrata*) [ATCC 2001] (外阴阴道念珠菌病的另一种微生物)进行了以下实验:

[0171] 实验方案如下:

[0172] 根据常规实践中常用的方法,在液体培养(萨布罗肉汤)中培养光滑假丝酵母。在使用Thoma计数室确定细胞计数后,生产12个实验培养物,每个具有 $6 \times 10^5$ 细胞/ml,其中不向3个培养物中加入沸石粉末(对照),向3个培养物中加入10mg/ml量的标准尺寸分布的沸石粉末,向另外3个培养物中加入10mg/ml量的超细沸石粉末,和再向3个培养物中加入10mg/ml量的粗沸石粉末。将实验培养物在37℃有氧条件下振荡(110rpm)孵育。

[0173] 为了测定空白值,也在没有微生物的所有培养基上进行实验。

[0174] 在7小时期间,以每小时间隔取等份的培养物,以通过如上所述的活力测定(刃天青测定)确定代谢活性。

[0175] 结果在图26中以图形形式示出。对于光滑假丝酵母也很清楚,沸石粉末的生长抑制作用受粒度的强烈影响。再次,含有超细沸石粉末的实验培养物(虚线曲线,右手边缘的从底部起第二个)和标准沸石粉末(短虚曲线,在右手边缘的最底部)比粒度级份(fraction)(长虚线曲线,从顶部起的第二曲线)显示出显著更大的代谢性能抑制。

[0176] 为了更好地说明结果,图27以柱状图形式显示了孵育5和6h后的测量数值。粗粒度级分(图中最右侧的柱)的测量数值最接近于那些不含沸石的对照(图中最左侧的柱)的数值。标准的沸石生长组描述于内侧左边,超细沸石群体描述于内侧右边。

[0177] 为了支撑如上所述的研究结果,进行如上所述的生长实验,但是这次将接种的细胞数目减少至约 $1 \times 10^4$ 细胞/ml,但是将孵育时间延长至16h。从图28显而易见,获得了与先前结果非常好地匹配的结果。

[0178] 为了进一步支撑实验确定的数据,进行如上所述的生长实验,但是这次将使用的

沸石粉末的活性浓度提高到50mg/ml,并且以Vialight测定的形式,用第二种方法确定代谢活性。这种测定基于通过测量当ATP被切割时萤光素酶发射的生物发光测量来定量细胞在其代谢中产生的腺苷三磷酸(ATP)。<sup>[8]</sup>

[0179] 从图29中的生长曲线可以看出,也在这些测试条件下,标准产物(短虚线,最低曲线)比粗沸石粉末(从顶部起的长虚线曲线)实现显著更大的生长抑制效果。

[0180] 总之,如果考虑所使用的“粗沸石粉末”还具有来自根据本发明的尺寸范围的明显级份,则在本发明的上限(upper margin)处存在非常好的活性限制。“超细沸石粉末”的活性解释下限(lower margi)的限度,其中考虑到颗粒的细小(smallness),据推测沸石的结构被损坏或部分损坏。

[0181] 粒度的确定不是关键的,并且优选使用来自Malvern Instruments GmbH的Mastersizer 2000来完成。该仪器在光学基础上根据激光束的衍射原理操作。测量来自激光束的散射光的强度,该光束以连续运动穿透分散的颗粒样本。比较已经显示了,相应地测量的粒度对应于现实中存在的粒度。

[0182] 存在于用于评价的组合物中但不在所述的和要求保护的粒度范围内的颗粒被认为是不存在的并且被忽略的。

[0183] 根据本发明的物质可以以任何药学上可接受的组合物来施用;例如,尤其是,可以使用一种或多种以下佐剂(adjuvants):药学上可接受的载体材料;活微生物和/或其提取物;用于健康阴道微生物群的营养物(例如乳糖等);有利地影响用于健康阴道微生物群的阴道环境的物质,例如雌二醇、有机酸等。

[0184] 给药可以尤其是以乳膏、软膏、凝胶、栓剂、阴道片剂、卵状小体(ovules)、子宫托(pessary)、泡沫剂(foams)、气溶胶(aerosols)、粉剂、漂洗剂(rinses)、灌洗剂(douches)、悬浮剂等的形式进行。

[0185] 在两个实施方案中,可以使用的材料和方法是从现有技术已知的,并且可以由知道待治疗(应用)的病症和知道本发明的药剂师在没有困难的情况下选择和实施。

[0186] 参考文献:

[0187] [1]Hainer,B.,L.(2011)Vaginitis:Diagnosis and Treatment;American Academy of Family Physicians;[http://www.sonoma.edu/users/w/wilkosz/n540a-07/VaginitisDX and TX.pdf](http://www.sonoma.edu/users/w/wilkosz/n540a-07/VaginitisDX%20and%20TX.pdf)

[0188] [2]AWMF online:S1 guidance:Bacterial vaginosis (BV) in gynecology and midwifery;AWMF guidance register No.015/28;current version:07/2013.

[0189] [3]AWMF online:S2k guidance:Vulvovaginal candidiasis;AWMF register No.015/072;version 12/2013.

[0190] [4]Candida albicans DSM No.1386

[0191] [https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-1386.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=304](https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-1386.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304)

[0192] [5]Gardnerella vaginalis DSM No.4944

[0193] [https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-4944.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=304](https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-4944.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304)

[0194] [6]Lactobacillus crispatus DSM No.20584

- [0195] [https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-20584.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=304](https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-20584.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304)
- [0196] [7]Rampersad,S.,N. (2012) Multiple Applications of Alarm Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays;Review,Sensors 2012,12,12347-12360.
- [0197] [8]Vialight™ MDA plus-High sensitivity microbial detection kit with extended signal stability;Lonza LT07-122.
- [0198] [9]Protocol for microbiological investigation S0811-01
- [0199] [10]Protocol for microbiological investigation S0903-19
- [0200] [11]Lactobacillus casei DSM No.20011
- [0201] [https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-20011.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=304](https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-20011.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304)
- [0202] [12]Lactobacillus jensenii DSM No.20557
- [0203] [https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-20557.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=304](https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-20557.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304)
- [0204] [13]Enzytec™ D/L Lactic acid Art.No.E1255-Usage instructions;r-Biopharm.
- [0205] [14]Candida glabrata ATCC No.2001
- [0206] <https://www.atcc.org/~ps/2001.ashx>

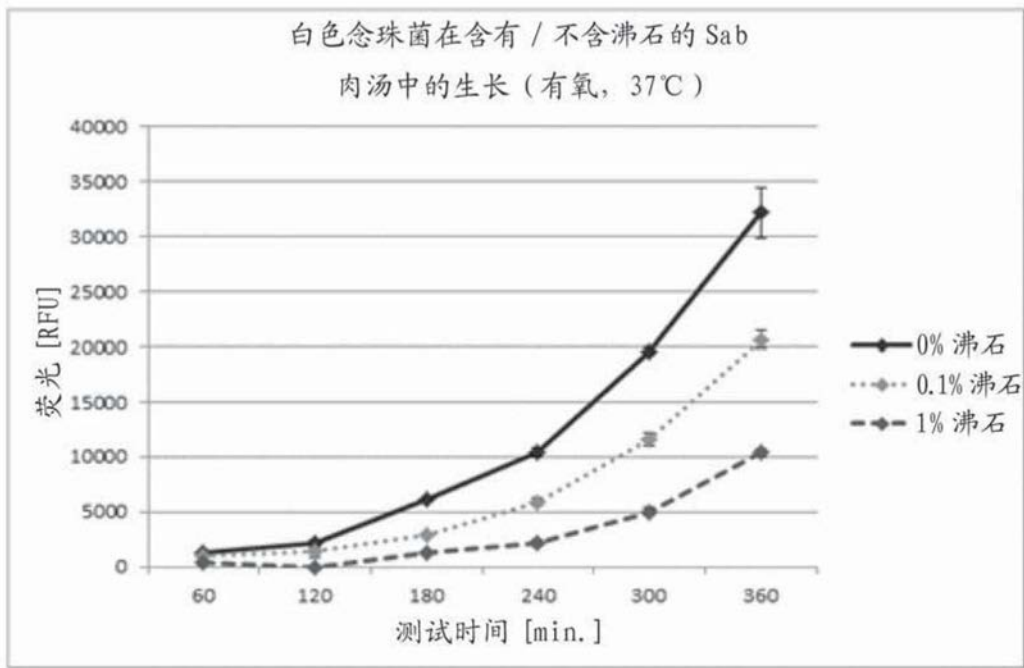


图1

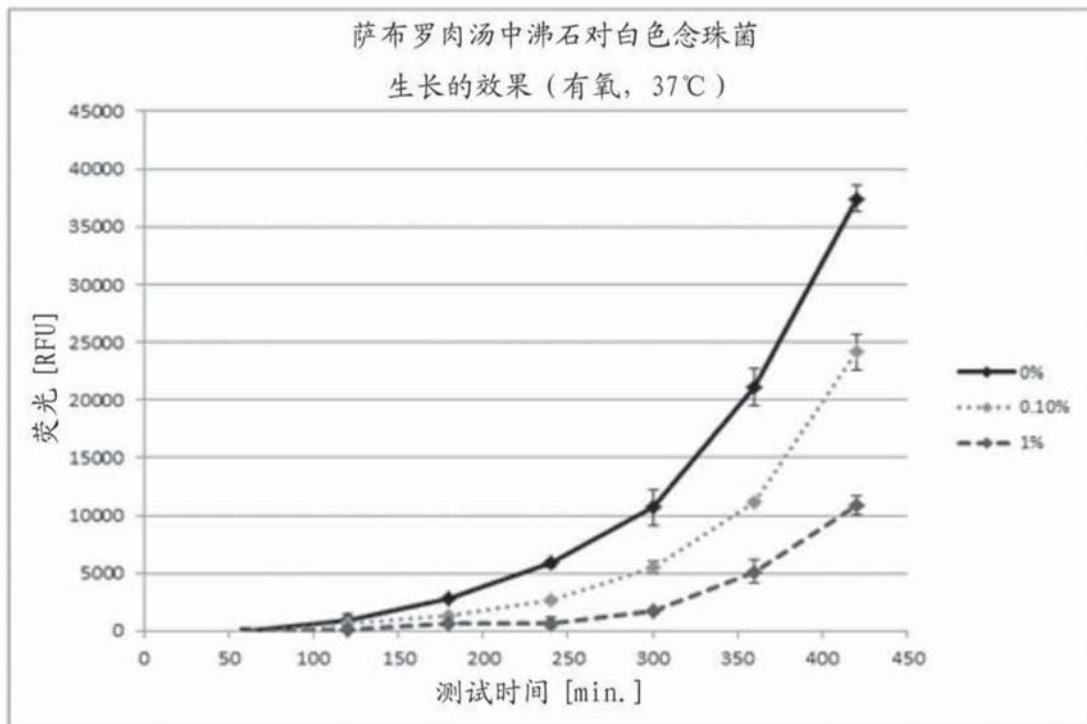


图2

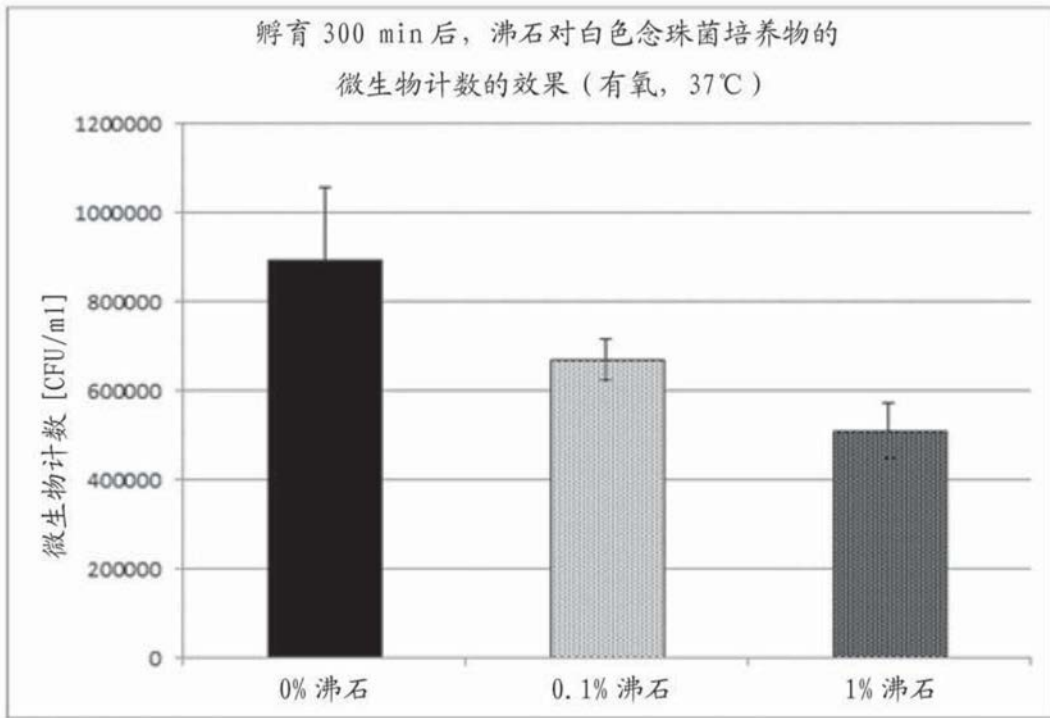


图3

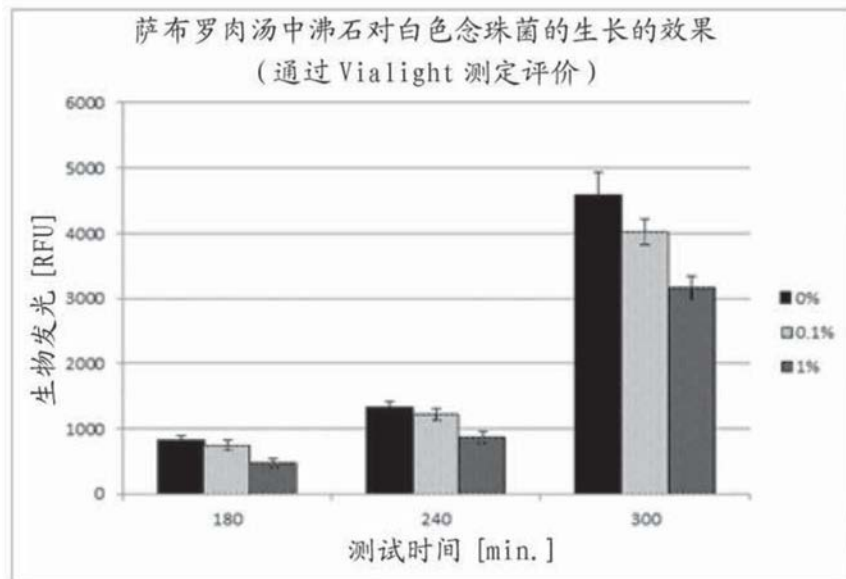


图4

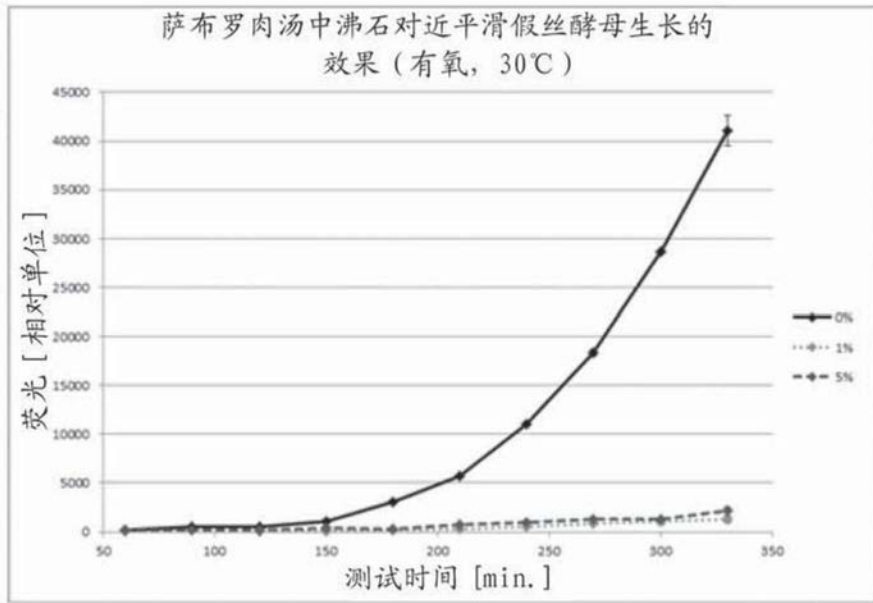


图5

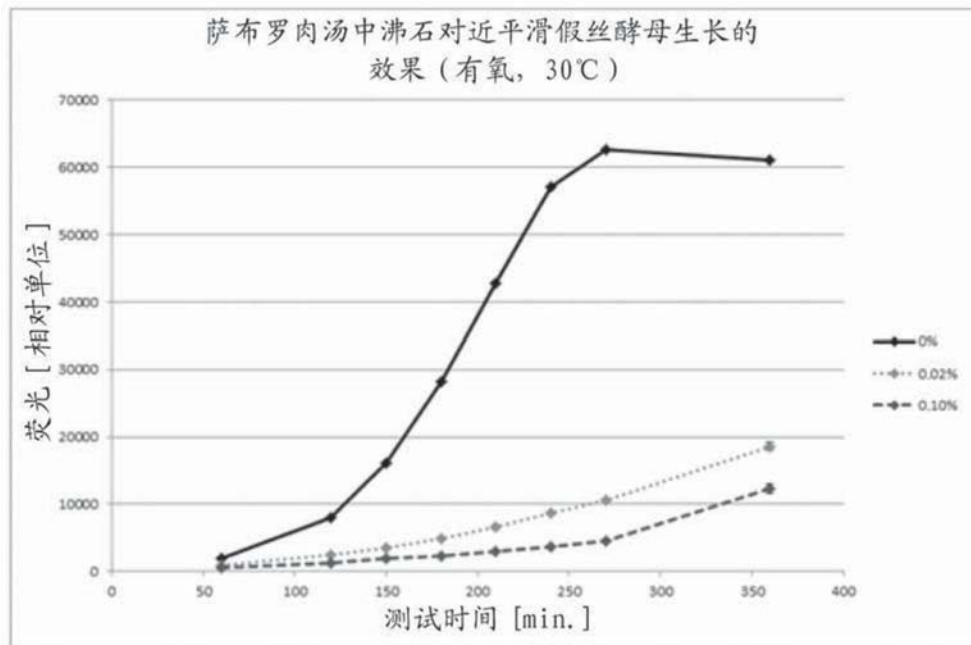


图6

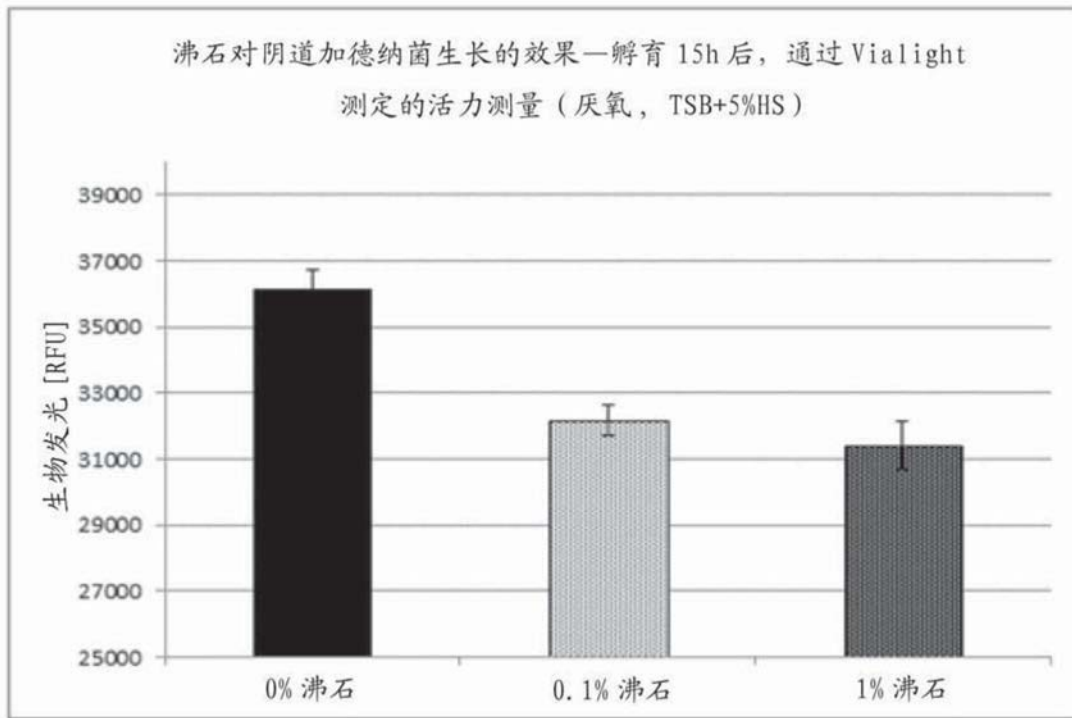


图7

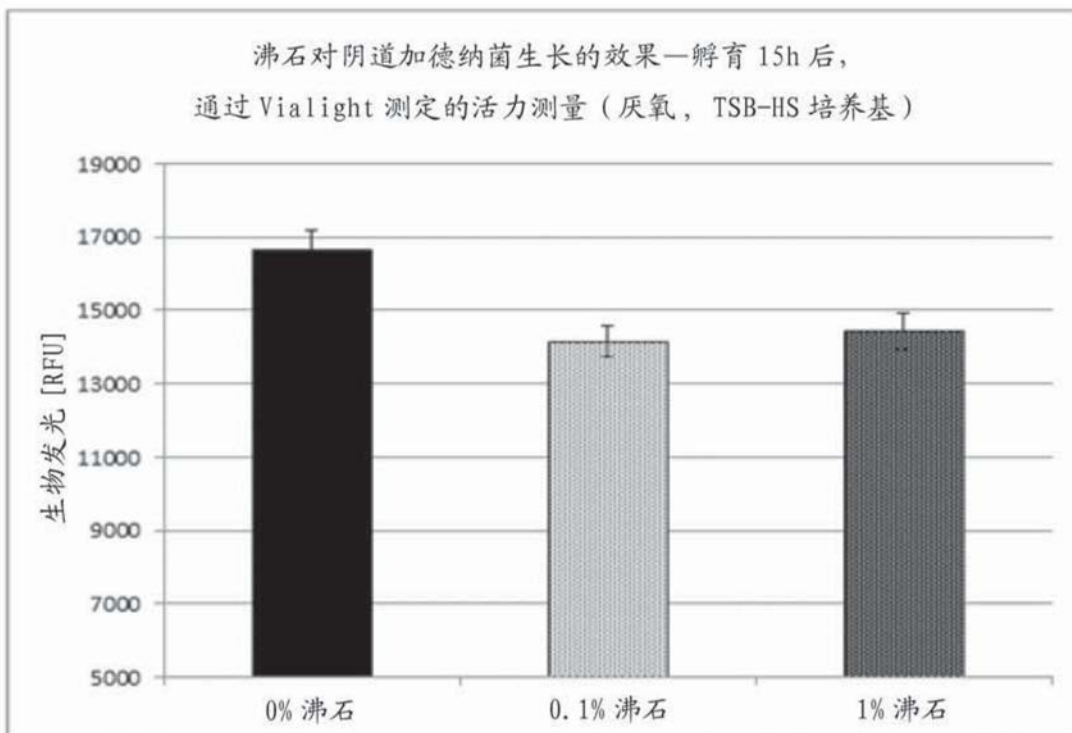


图8

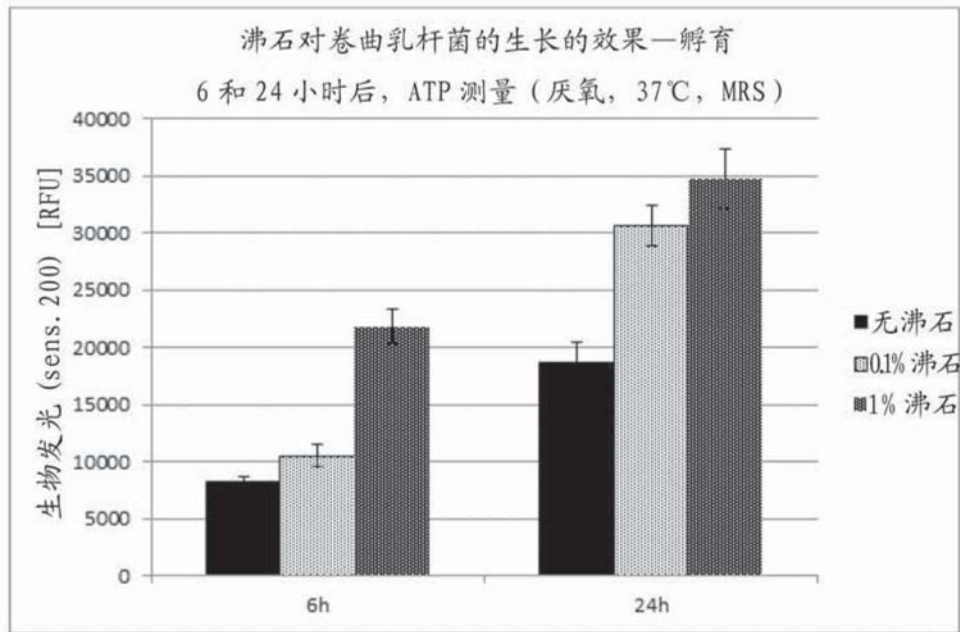


图9

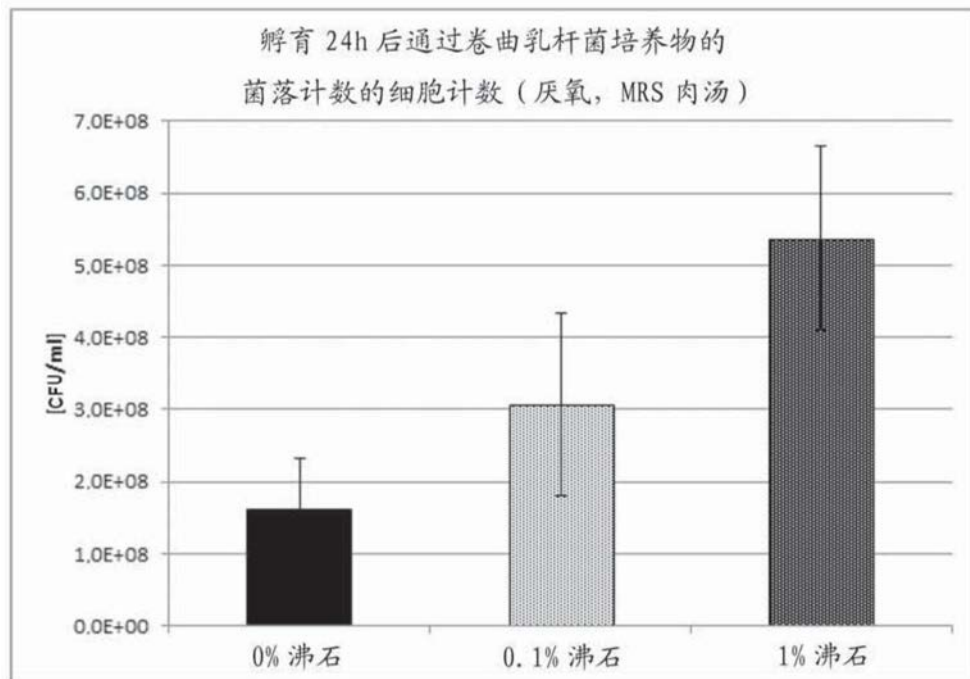


图10

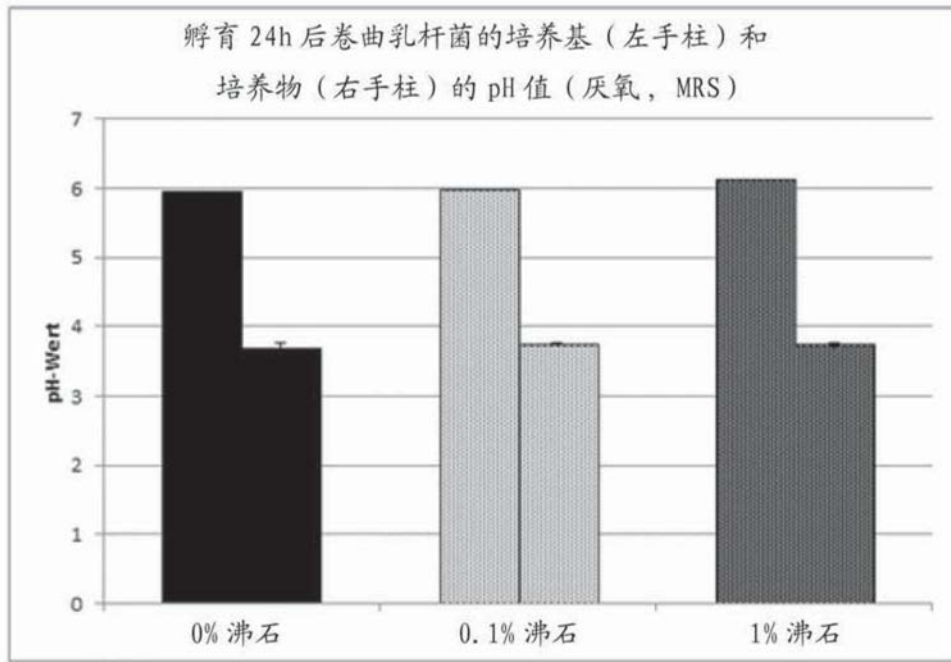


图11

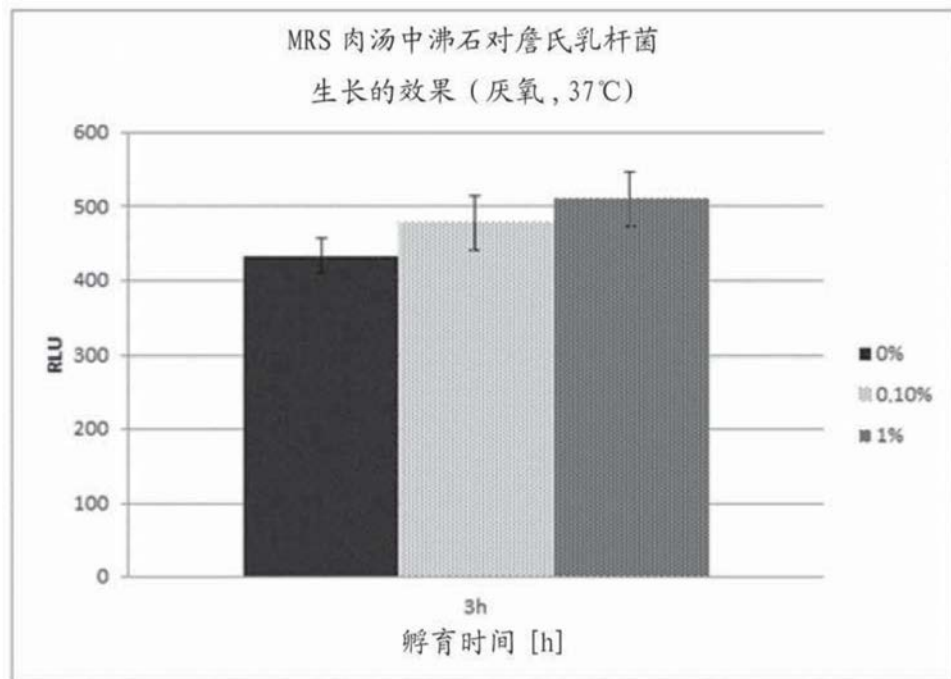


图12

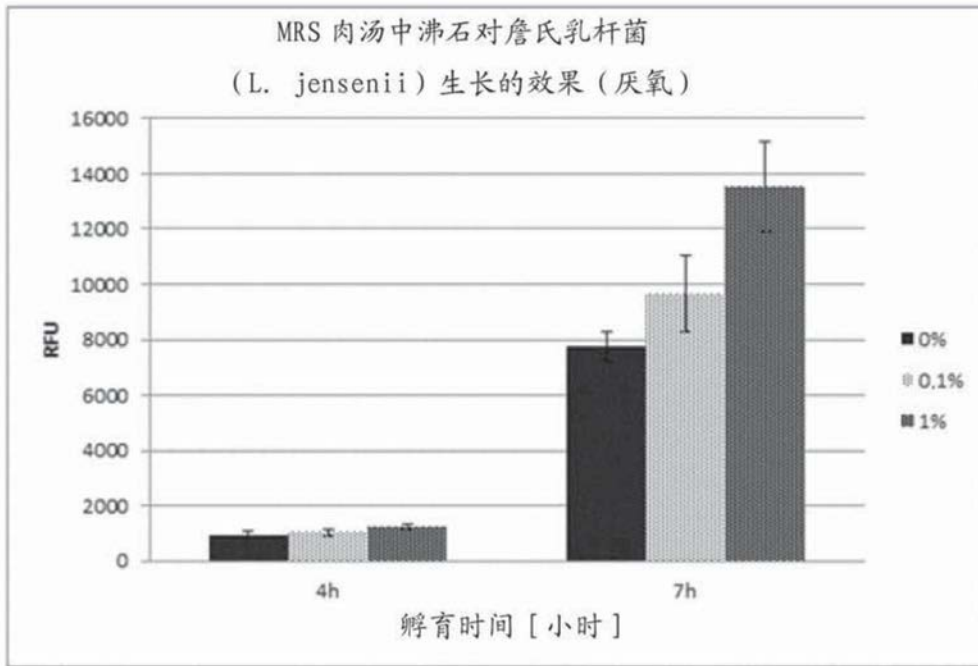


图13

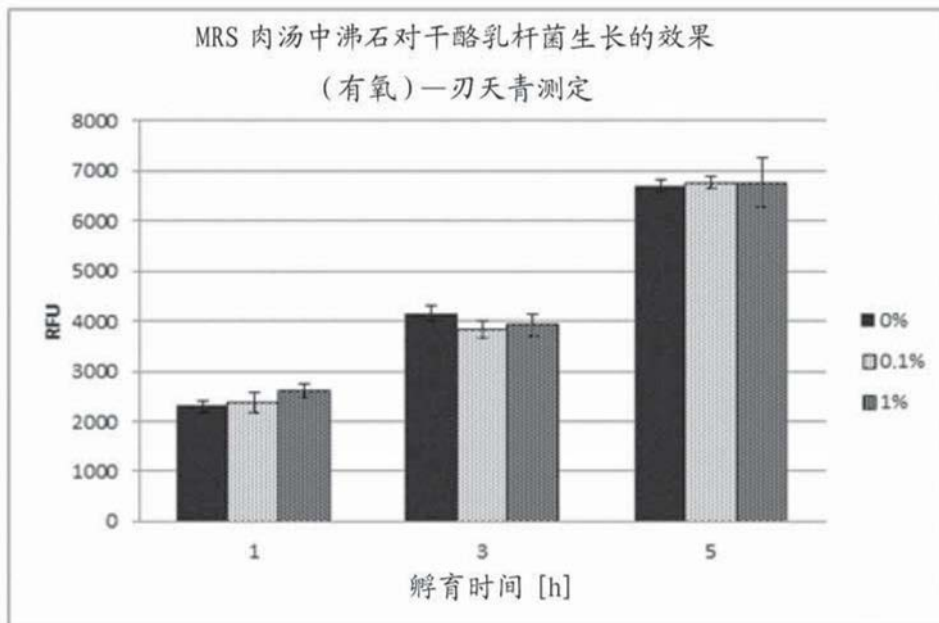


图14

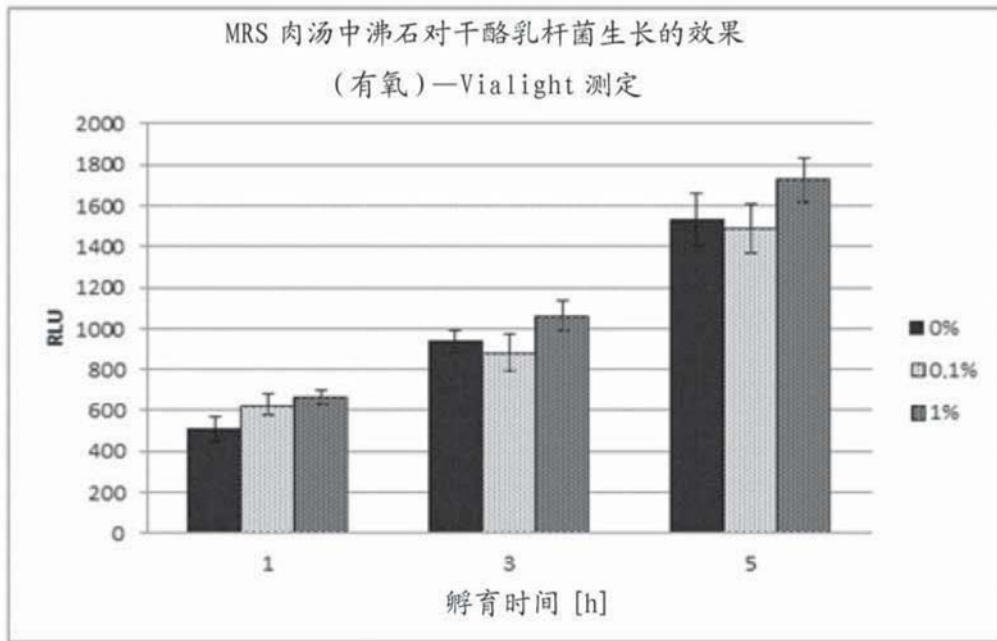


图15

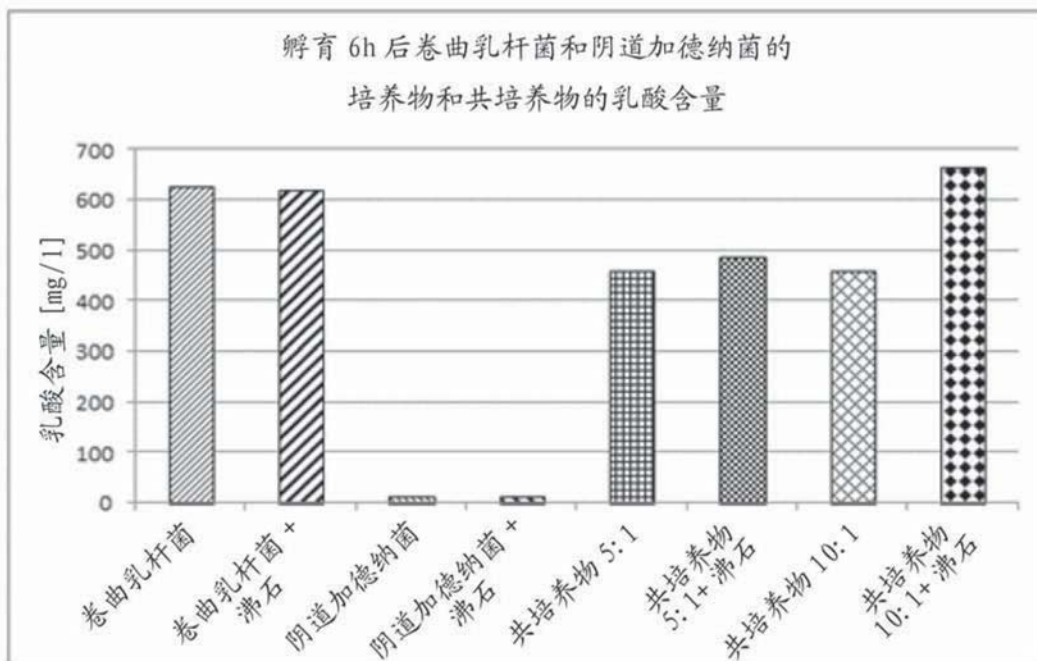


图16

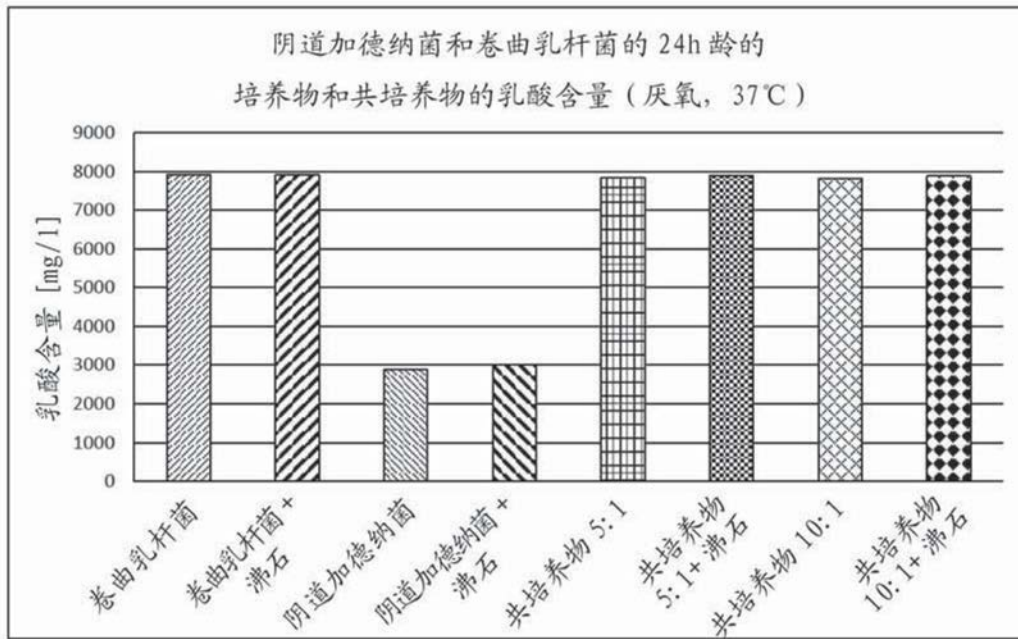


图17

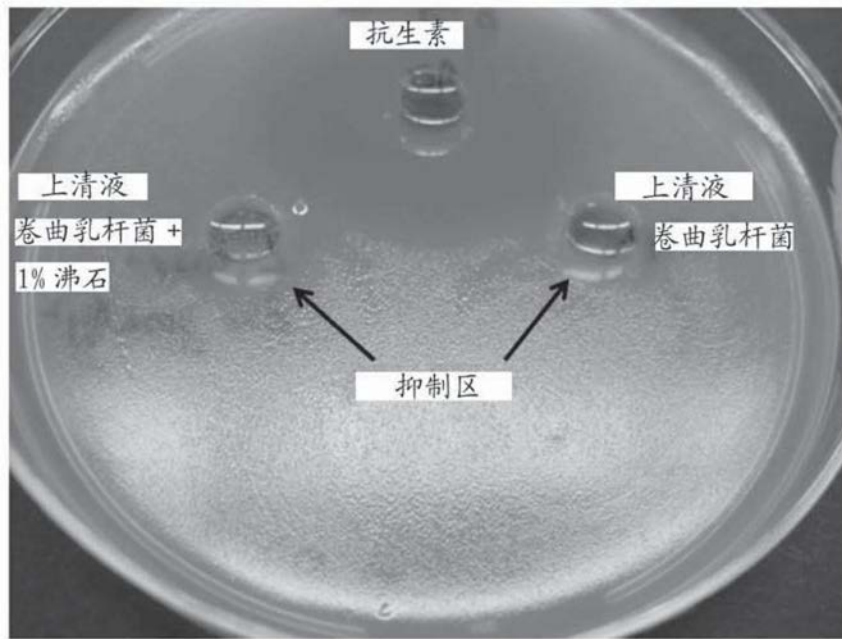


图18

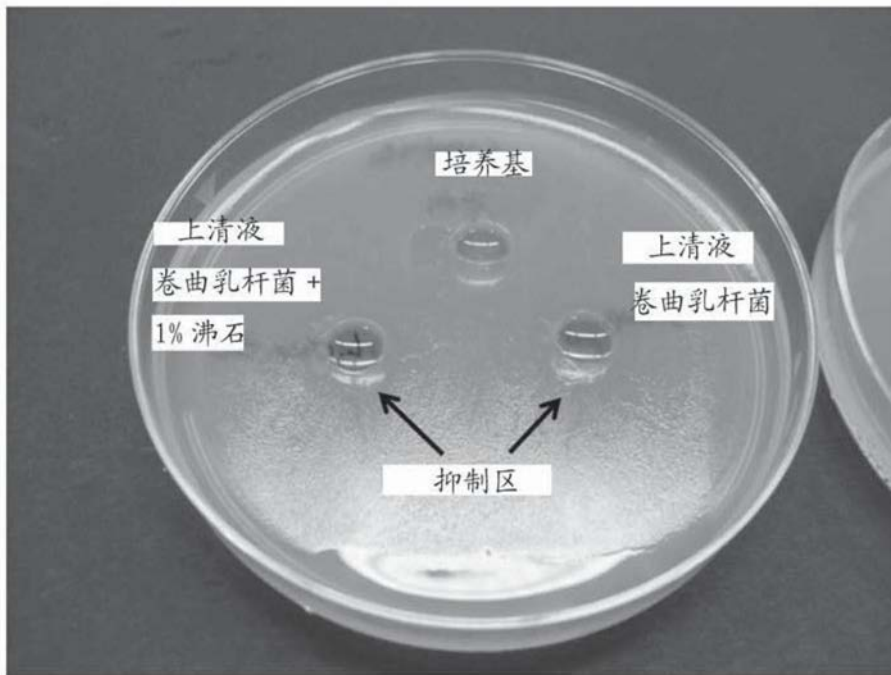


图19

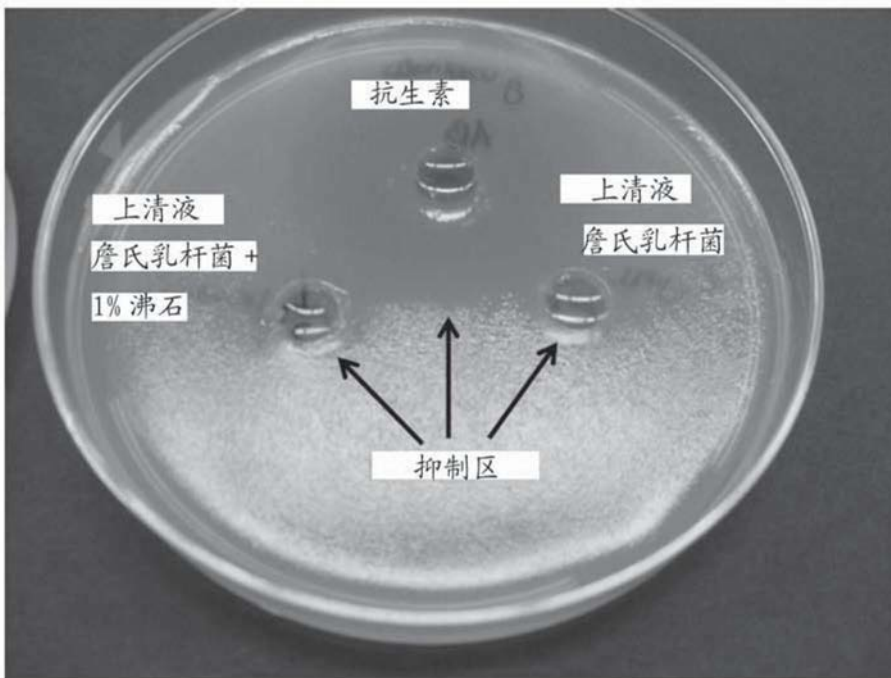


图20

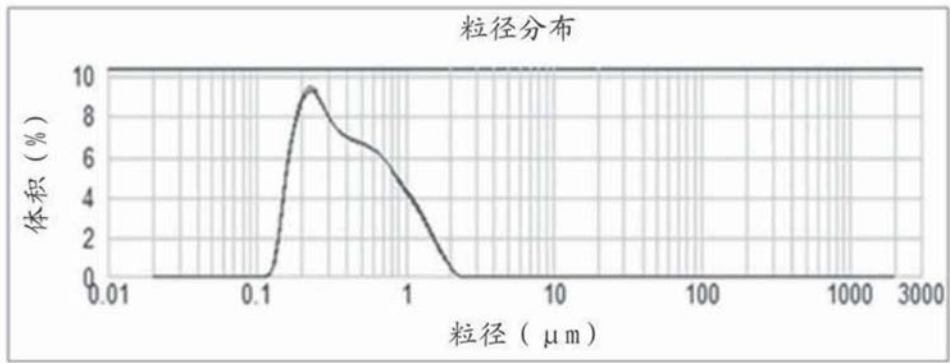


图 21 超细沸石粉末体积%相对于粒径

图21

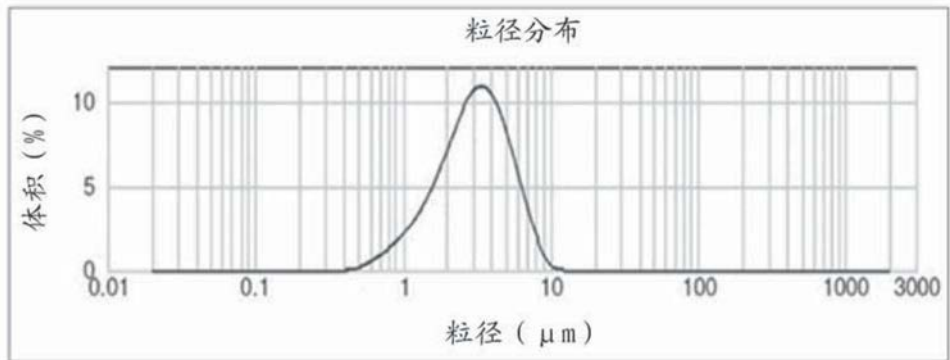


图 22 标准沸石粉末体积%相对于粒径

图22

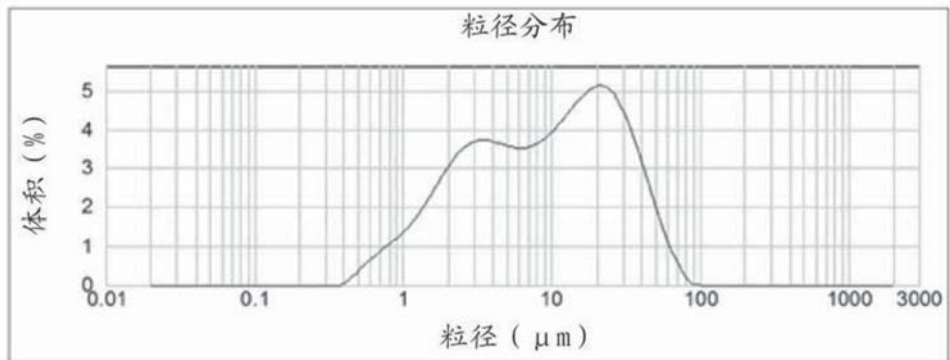


图 23 粗沸石粉末体积%相对于粒径

图23

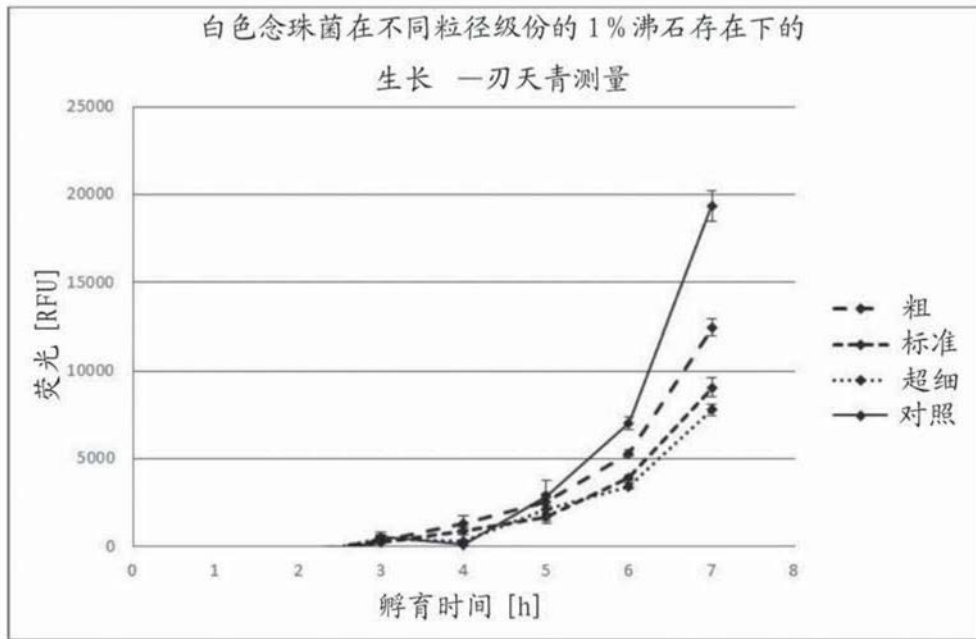


图24

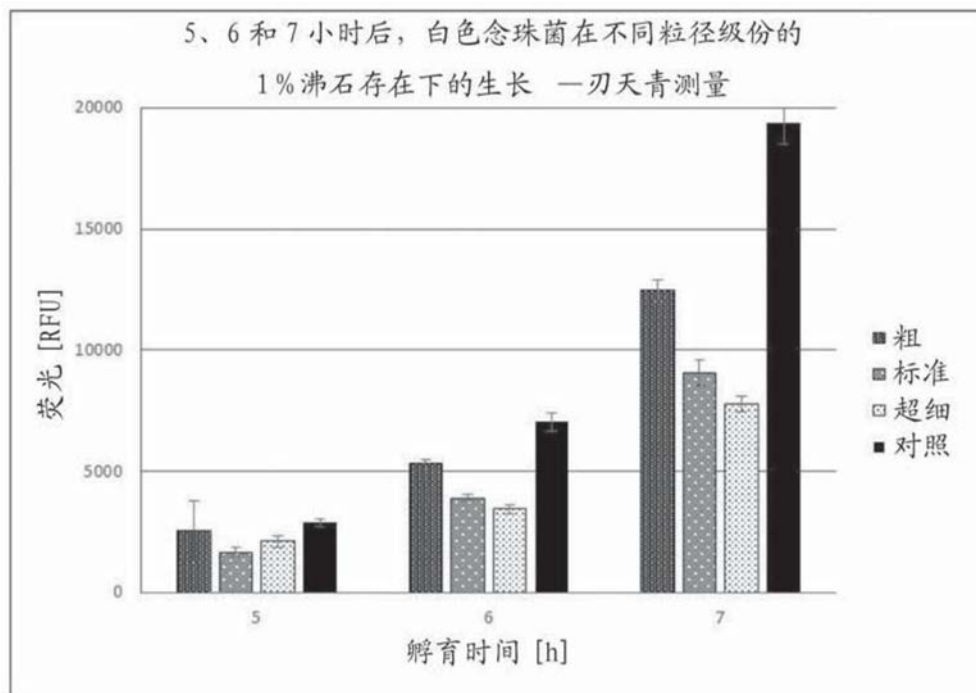


图25

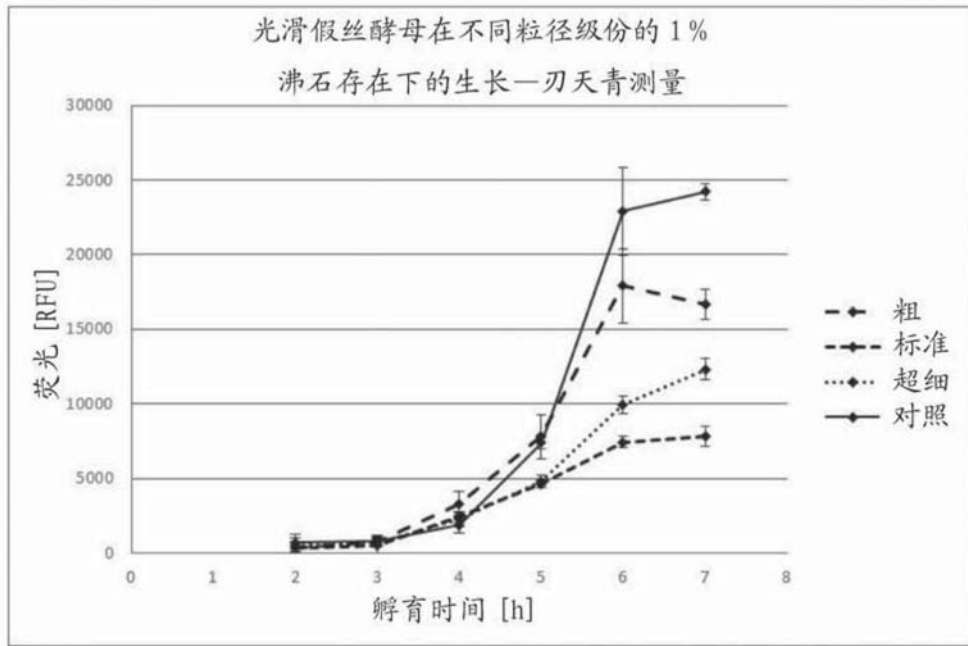


图26

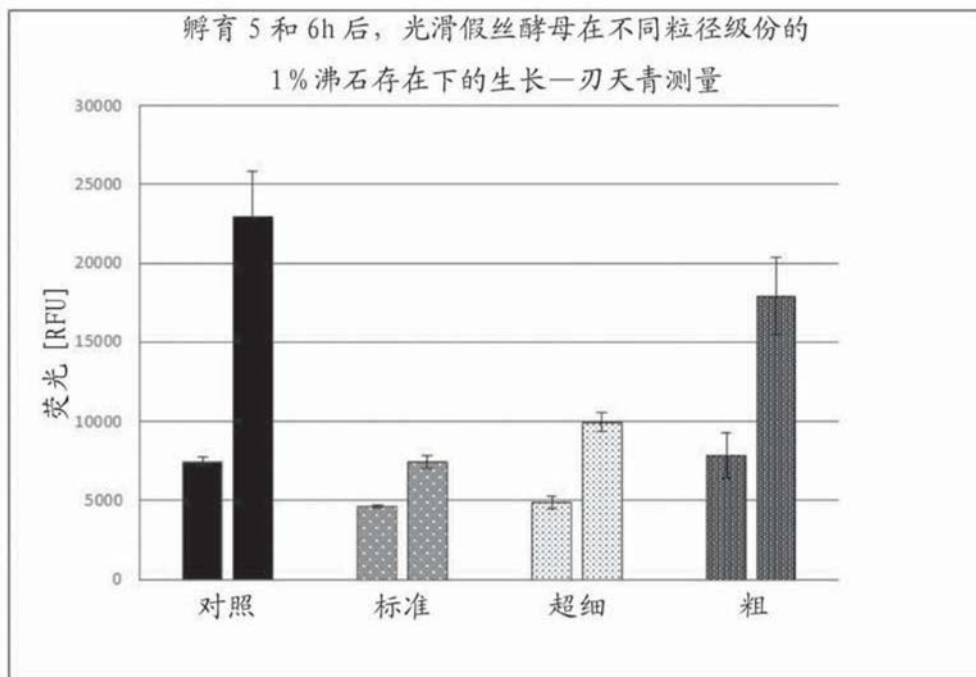


图27

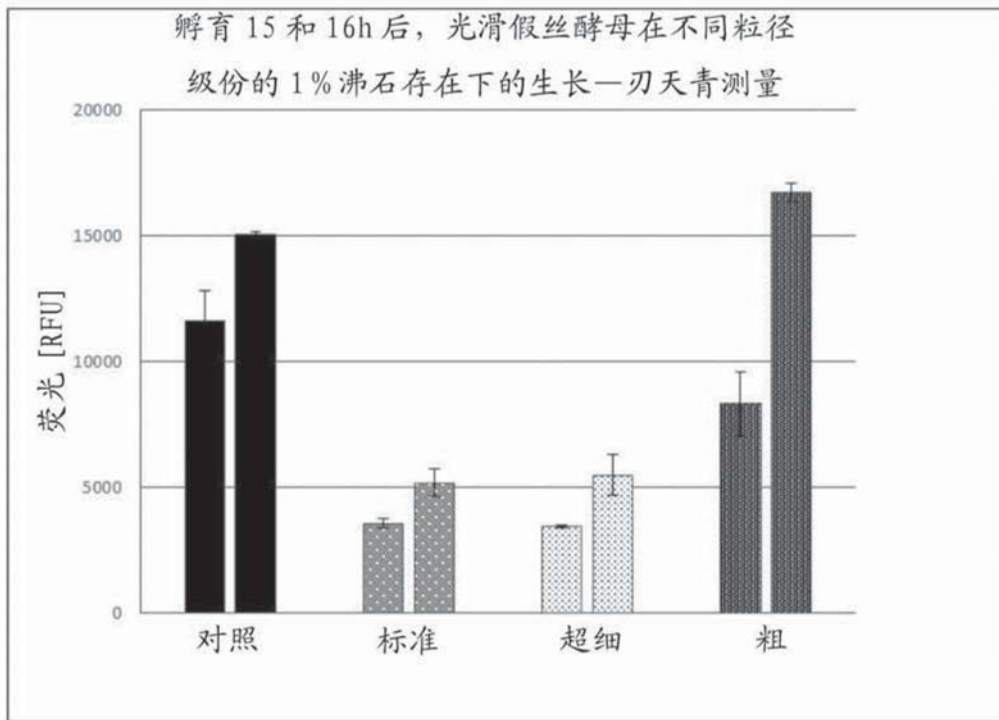


图28

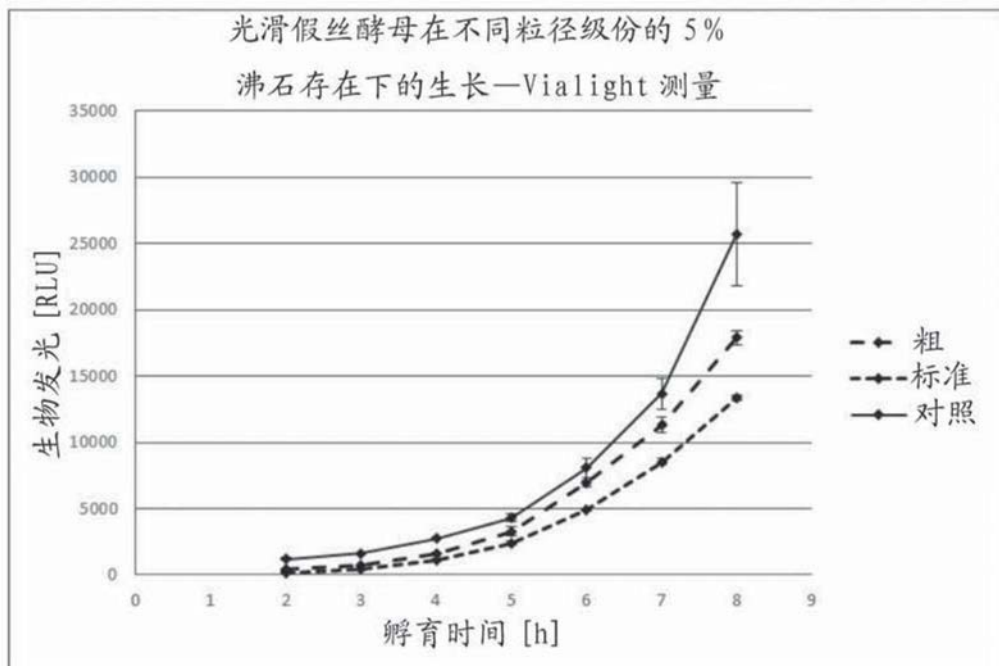


图29