



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108697750 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201680070042.X

(22)申请日 2016.09.30

(30)优先权数据

62/236,114 2015.10.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/054787 2016.09.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/059255 EN 2017.04.06

(71)申请人 光动力公司

地址 加拿大哈利法克斯

申请人 谢莉·迈克法兰

(72)发明人 谢莉·迈克法兰

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限  
责任公司 11240

代理人 张英 沈敬亭

(51)Int.Cl.

A61K 36/704(2006.01)

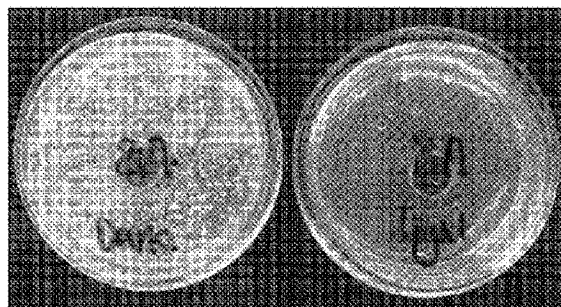
权利要求书2页 说明书37页 附图15页

(54)发明名称

新型虎杖提取物及它们作为光动力灭活剂的用途

(57)摘要

本发明描述了能够对微生物如细菌、病毒、真菌和原生动物光动力灭活(PDI)且能够杀灭或灭活癌细胞的虎杖提取物和相关的组合物。本发明进一步描述了使用所述虎杖提取物和光动力灭活(PDI)作为治疗微生物感染的疗法以及使用虎杖提取物和相关组合物作为治疗癌症的光动力疗法试剂的方法。



1. 一种包含虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 提取物和赋形剂的组合物。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述赋形剂选自由磨料,去污剂,粘合剂,保湿剂,调味剂,甜味剂,着色剂,防腐剂和组成的组。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述赋形剂选自由水,二氧化硅,山梨糖醇,甘油,木糖醇,椰油醇硫酸酯盐,癸基葡糖苷,调味剂,黄原胶,角叉菜胶和谷氨酸盐组成的组。
4. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物配制为溶液或悬浮液。
5. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物配制为糊剂。
6. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物配制为凝胶。
7. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物配制为泡沫。
8. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物中的虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 提取物的百分比为0.01%至20%。
9. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物中的虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 提取物的百分比为约0.1%。
10. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物中的虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 提取物的百分比为约1%。
11. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物中的虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 提取物的百分比为0.1%至10%,并且进一步包含20%至45%的磨料,1%至2%的去污剂,0.5%至4%的粘合剂,10%至30%的保湿剂,1%至5%的调味剂、甜味剂和着色剂,0.05%至0.5%的防腐剂,和余量至100%的水。
12. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物中的虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 提取物的百分比为0.1%至10%,并且进一步包含10%至40%的二氧化硅,0%至5%的山梨糖醇,0%至5%的甘油,0%至1.5%的木糖醇,0%至2.5%的椰油醇硫酸酯钠,0%至1.5%的调味剂,0%至1.5%的黄原胶,0%至1.5%的角叉菜胶和余量至100%的水。
13. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物中的虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 提取物的百分比为0.1%至10%,并且进一步包含约25%的二氧化硅,约1%的山梨糖醇,约1%的甘油,约0.5%的木糖醇,约1%的椰油醇硫酸酯钠,约0.25%的调味剂,约0.5%的黄原胶,约0.5%的角叉菜胶和余量至100%的水。
14. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物中的虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 提取物的百分比为约1%,并且进一步包含约76.65%的水,约10%的甘油,约8%的山梨糖醇,约1%的木糖醇,约0.35%的天然香料和约3%的月桂酰谷氨酸钠。
15. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物中的虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 提取物的百分比为约0.1%,并且进一步包含约79.55%的水,约10%的甘油,约8%的山梨糖醇,约1%的木糖醇,约0.35%的天然香料和约1%的椰油醇硫酸酯钠。
16. 一种杀灭或灭活微生物的方法,包括:  
使所述微生物与包含虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 提取物和赋形剂的组合物接触,以及  
用光源照射所述微生物。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中,所述方法在氧气存在下进行。
18. 根据权利要求16所述的方法,其中,所述微生物选自由细菌,病毒,真菌和原生动物

组成的组。

19. 根据权利要求16所述的方法,其中,所述微生物处于受试者的口腔中。

20. 根据权利要求16所述的方法,其中,所述微生物是生物膜的一部分。

21. 根据权利要求16所述的方法,其中,所述微生物附着于牙科器具上。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中,所述牙科器具选自由正畸托架、带、扣、粘合附件、粘合线、牙冠、镶嵌物、填补物、修复体、牙基台和牙种植体组成的组。

23. 一种杀灭癌细胞,癌或肿瘤的方法,包括:

使所述癌细胞,癌或肿瘤与包含虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 提取物和赋形剂的组合物接触,和

用光源照射所述癌细胞,癌或肿瘤。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中,所述方法在氧气存在下进行。

25. 一种治疗良性口腔或口咽部肿瘤的方法,包括:

使所述口腔或口咽部肿瘤与包含虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 提取物和赋形剂的组合物接触,和

用光源照射所述口腔或口咽部肿瘤。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中,所述方法在氧气存在下进行。

27. 根据权利要求16至26中任一项所述的方法,其中,光的辐射曝量为1至300J cm<sup>-2</sup>。

28. 根据权利要求16至27中任一项所述的方法,其中,光的表面功率密度为0.001至0.25W cm<sup>-2</sup>。

## 新型虎杖提取物及它们作为光动力灭活剂的用途

[0001] 相关申请的引证

[0002] 本申请要求享有2015年10月1日提交的美国临时专利申请序列号62/236,114的优先权,其全部内容通过引证结合于本文中。

### 背景技术

[0003] 虎杖(*Polygonum cuspidatum*) (*P.cuspidatum*)是一种多年生植物物种,其特征为在散布的根状茎,红棕色的茎干,有柄叶和下垂的圆锥花序(panicle)中的白色的花。虎杖的根及其提取物作为中药是众所周知的并官方列于中国药典中,在东亚草药中用于治疗病症如炎症,肝炎,肿瘤,月经不调,腹泻,皮肤烧伤,胆结石和骨髓炎(Ban, S.H. et al. *Fitoterapia* 2010, 81, 30-34. Song, J.H. et. al. *J. Ethnopharmacol* 2007, 112, 419-425. Chu, X. et. al. *J Chromatogr A* 2005, 1097, 33-39)。虎杖源于中国,在中国称为Hu Zhang (HZ), 或Hu Chang, 然后移植到日本,在日本被称为KojoKon。今天,虎杖可以发现作为一种顽强的杂草生长于整个北美洲,被称为日本蓼(Japanese knotweed) (JK), 墨西哥竹(MB) 或日本竹(JB)。虽然虎杖被视为一种入侵物种,并且在北美一般被认为是一种麻烦,但其对于疾病如莱姆病的治疗特性却引起了一定的兴趣(Suvarna R. *Altern Complement Ther* 2012, 18, 220-5)。

[0004] 在韩国,虎杖的根已被用于维持口腔卫生并控制口腔疾病,特别是与生物膜有关的疾病。这些传统用途促使最近的一些研究致力于阐明虎杖提取物对浮游培养物中的和在羟基磷灰石(HA) 盘上生长的变形链球菌(*Streptococcus mutans*) 和远缘链球菌(*Streptococcus sobrinus*) 的活力和毒力因子的影响(Song, J.H. et. al. *Arch Oral Biol* 2006, 51, 1131-1140), 两种变形链球菌被认为是龋齿的重要病因学决定因素(Loesche, W.J. *Microbiol Rev* 1986, 50, 353-380. Hamada, S.; Slade, H.D. *Microbiol Rev* 1980, 44, 331-384)。在这些研究中,某些虎杖提取物表现出抗各种变形链球菌和远缘链球菌菌株的宽抗菌浓度曲线,0.5至4mg • mL<sup>-1</sup>的MIC (MIC=最小抑制浓度),且在悬浮液中高出2至4倍的MBC (MBC=最小杀菌浓度)。然而,治疗后至少需要8小时才能使抗微生物性达到3-log降低,且剩余10<sup>3</sup>CFU • mL<sup>-1</sup> (CFU=菌落形成单位)。这种时间依赖性的抑菌和杀菌活性延伸到生物膜,但如对更有回复性的形式所预期的那样大大减弱。最大log降低仅为2倍,其取决于暴露和采样时间,并且严重受到生物膜厚度的影响。虽然这些发现提供了虎杖提取物可以降低浮游培养物中的细菌加载和生长于羟基磷灰石(HA) 盘上的薄生物膜的概念性证据,但抗微生物作用的程度远小于金标准的广谱抗生素氯己定(CHX)。此外,虎杖根的抗菌作用的时间依赖性降低了其在口腔中(在其中直接性(substantivity) 是关键性的) 的效力。氯己定由于有利的吸附性质和优异的直接性而提供了有效的杀菌活性和延长效抑菌作用,几乎没有产品满足的口服抗微生物剂的理想品质(Jenkins, S. et. al. *J Clin Periodontol*, 1988, 15, 415-424)。不幸的是,氯己定制剂会污染牙齿,改变味觉,并通常被指定用于短期使用(Guggenheim, B.; Meier A. *Schweiz Monatsschrift Für Zahnmed* 2011, 121, 432-441)。这些因素,以及对抗生素的广泛使用和抗生素耐药性的发展的担忧(Horner, C. et. al. *J*

Antimicrob Chemother 2012,67,2547-2559),成为了有效、速效或高度直接性和关于细菌靶的广谱和作用机制的新策略的理由。

[0005] 微生物的光动力灭活 (photodynamic inactivation) (PDI) 代表了传统抗生素的强大替代方案,超越了这些标准。简而言之,PDI通过由光敏剂的激发态产生细胞毒性单线态氧 ( $^1O_2$ ) 和其他活性氧类 (ROS),利用光敏剂 (PS),光和氧灭活和破坏细菌,病毒,真菌和原生动物。光动力效应的开始是瞬时的,因此PDI是立即生效的,且其作用机制是非特异性的。因此,没有关于抗生素对ROS毒性突释的抗性的报道。即刻响应消除了对口腔中长时间作用具有高直接性的抗微生物剂的需要。选择性是PDI的固有属性,由此活性仅限于提取物、光和氧在空间和时间上重叠的区域。因此,通过控制光照射的位置,可以留出健康组织。

[0006] PDI的概念代表了也可以用于治疗癌症的杀灭细胞的一般方法。当用于癌细胞和肿瘤时,该方法被称为光动力疗法 (PDT)。与微生物的光动力灭活一样,PDT通过由光敏剂的激发态产生细胞毒性的单线态氧 ( $^1O_2$ ) 和其他活性氧类 (ROS),利用光敏剂 (PS)、光和氧灭活和破坏癌细胞和肿瘤。

[0007] 本领域仍然需要具有杀菌或抗癌活性的新型组合物和制剂及其制备和使用方法,特别是包括使用具有杀菌或抗癌活性的组合物和制剂的光动力灭活和光动力疗法的方法。本发明满足了这些需求。

## 发明内容

[0008] 在一方面中,本发明涉及包含虎杖提取物和赋形剂的组合物。在一个实施方式中,赋形剂选自由磨料,去污剂 (detergent),粘合剂,保湿剂,调味剂,甜味剂,着色剂,防腐剂和水组成的组。在另一个实施方式中,赋形剂选自由水,二氧化硅,山梨糖醇,甘油,木糖醇,椰油醇硫酸酯盐,癸基葡糖苷,调味剂,黄原胶,角叉菜胶和谷氨酸盐组成的组。在一个实施方式中,组合物配制为溶液或悬浮液。在另一个实施方式中,组合物配制为糊剂。在另一个实施方式中,组合物配制为凝胶。在另一个实施方式中,组合物配制为泡沫。在一个实施方式中,组合物中的虎杖提取物的百分比为0.01%至20%。在另一个实施方式中,组合物中的虎杖提取物的百分比为约0.1%。在另一个实施方式中,组合物中的虎杖提取物的百分比为约1%。

[0009] 在一个实施方式中,组合物中的虎杖提取物的百分比为0.1%至10%,并且进一步包含20%至45%的磨料,1%至2%的去污剂,0.5%至4%的粘合剂,10%至30%的保湿剂,1%至5%的调味剂、甜味剂和着色剂,0.05%至0.5%的防腐剂和余量至100%的水。在另一个实施方式中,组合物中的虎杖提取物的百分比为0.1%至10%,并且进一步包含10%至40%的二氧化硅,0%至5%的山梨糖醇,0%至5%的甘油,0%至1.5%的木糖醇,0%至2.5%的椰油醇硫酸酯钠,0%至1.5%的调味剂,0%至1.5%的黄原胶,0%至1.5%的角叉菜胶和余量至100%的水。在另一个实施方式中,组合物中的虎杖提取物的百分比为0.1%至10%,并进一步包含约25%二氧化硅,约1%的山梨糖醇,约1%的甘油,约0.5%的木糖醇,约1%的椰油醇硫酸酯钠,约0.25%的调味剂,约0.5%的黄原胶,约0.5%的角叉菜胶和余量至100%的水。在另一个实施方式中,组合物中的虎杖提取物的百分比为约1%,并且进一步包含约76.65%的水,约10%的甘油,约8%的山梨糖醇,约1%的木糖醇,约0.35%的天然香料和约3%的月桂酰谷氨酸钠。在另一个实施方式中,组合物中的虎杖提取物的百分比

为约0.1%，并且进一步包含约79.55%的水，约10%的甘油，约8%的山梨糖醇，约1%的木糖醇，约0.35%的天然香料和约1%椰油醇硫酸酯钠。

[0010] 在另一方面中，本发明涉及杀灭或灭活微生物的方法，包括：使微生物与包含虎杖提取物和赋形剂的组合物接触，并用光源照射微生物。在一个实施方式中，方法在氧气存在下进行。在一个实施方式中，微生物选自自由细菌，病毒，真菌和原生动物组成的组。在一个实施方式中，微生物处于受试者的口腔中。在另一个实施方式中，微生物是生物膜的一部分。在另一个实施方式中，微生物附着于牙科器具上。在一个实施方式中，牙科器具选自自由正畸托架，带，扣，粘合附件，粘合线，牙冠，镶嵌物，填补物，修复体，牙基台和牙种植体组成的组。

[0011] 在另一方面中，本发明涉及杀死癌细胞，癌或肿瘤的方法，包括：使癌细胞、癌或肿瘤与包含虎杖提取物和赋形剂的组合物接触，并用光源照射癌细胞、癌或肿瘤。在一个实施方式中，方法在氧气存在下进行。在另一方面中，本发明涉及一种治疗良性口腔或口咽部肿瘤的方法，包括：使口腔或口咽部肿瘤与包含虎杖提取物和赋形剂的组合物接触，并用光源照射口腔或口咽部肿瘤。在一个实施方式中，方法在氧气存在下进行。

[0012] 在一方面中，本发明涉及杀灭或灭活微生物的方法，杀死癌细胞、癌或肿瘤的方法，以及治疗良性口腔或口咽部肿瘤的方法，方法包括光的辐射曝量为1至300J cm<sup>-2</sup>的光照射。在一些实施方式中，光的表面功率密度为0.001至0.25W cm<sup>-2</sup>。

## 附图说明

[0013] 图1：采用虎杖提取物(100μg)在黑暗中(左)和用光活化(右)处理普通土壤细菌。光处理是来自光反应器的35J cm<sup>-2</sup>的光。光源向样品表面传递0.0096W cm<sup>-2</sup>。

[0014] 图2：采用虎杖提取物在黑暗中(实曲线)和用光活化(虚曲线)处理人白血病癌细胞的PDT处理。光处理是来自光反应器的28J cm<sup>-2</sup>的光。

[0015] 图3：虎杖提取物对浮游培养物生长的(a)金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)和(b)变形链球菌的抗生素活性。黑条形代表保持于黑暗中的样品；红条形是光处理的样品(35J cm<sup>-2</sup>)。无条形表示>99.9%的杀菌活性。

[0016] 图4：人牙冠的扫描电子显微镜照片(SEM)：(a)未处理的牙齿表面上的微生物生物膜(3500X)，(b)用提取物处理时生物膜的形态学变化(3500X)，和(c)当用提取物处理并用光照射时对生物膜形成的抑制作用(3500X)。

[0017] 图5：虎杖提取物介导的光敏化对小鼠(a)上颌切牙(maxillary incisor)周围的上部牙龈区和(b)舌的前背区(anterior dorsal region)的顶点上的变形链球菌的活力的影响。使用LED在5分钟内传输30J cm<sup>-2</sup>的光剂量。对照动物采用用于配制提取物的载体(5%丙二醇水溶液)处理，并保持于黑暗中或提供光照处理。在采用11mg mL<sup>-1</sup>提取物和光照处理的动物中未检测到细菌。

[0018] 图6：虎杖提取物的HPLC图谱。

[0019] 图7：金黄色葡萄球菌(a)和变形链球菌(b)对以20mL递送至TSA琼脂板的虎杖提取物的浓度增加(0.1mg mL<sup>-1</sup>, 1.0mg mL<sup>-1</sup>, 10mg mL<sup>-1</sup>和100mg mL<sup>-1</sup>)的抗微生物敏感性。左：暗处的板；右：用光(35J cm<sup>-2</sup>)照射的板。包括氯己定和DMSO作为抗生素活性的阳性和阴性对照。

[0020] 图8:金黄色葡萄球菌(a)和变形链球菌(b)对两种浓度的虎杖提取物( $10\text{mg mL}^{-1}$ 和 $100\text{mg mL}^{-1}$ ),市售氯己定(Oro-Clense),市售ListerineZero和由TSA琼脂扩散探测的1%甲苯胺蓝(TB)溶液的抗微生物敏感性。左:暗处的板;右:用光( $36\text{J cm}^{-2}$ )照射的板。

[0021] 图9:变形链球菌对虎杖提取物( $40\text{mg}$ ,在作为载体的DMSO中)和作为对照的DMSO的抗微生物敏感性。左:暗处的板;右:用光( $36\text{Jcm}^{-2}$ )照射的板。钻孔上的标记DK,1h和2h分别对应于先前没有暴露于光,1小时暴露和2小时暴露的虎杖提取物。长时间暴露于光后,虎杖提取物保持了其PDI活性,表现出光稳定性。

[0022] 图10:接受最少干预(a:载体5%丙二醇水溶液,暗处)和最大治疗(b: $11\text{mg mL}^{-1}$ 提取物,光照)的小鼠的上颌切牙周围的上部牙龈区域(左)和舌的前背部区域顶点(右)的宏观视图。照片采用配备Vivitar系列1 105mm微距镜头和AF540FGZ无线闪光灯的Pentax K20相机拍摄。

[0023] 图11:用虎杖提取物和光照处理的小鼠舌前背区的 $6\mu\text{m}$ 切片的组织学图像(40x放大)。由于PDI治疗,组织没有显示出炎症浸润的证据。

[0024] 图12:虎杖提取物(虚线)和大黄素(emodin)(实线)对皮肤成纤维细胞(CCD-1064Sk细胞系)的细胞毒性。

[0025] 图13:变形链球菌对未配制的虎杖提取物和配制的虎杖提取物的抗微生物敏感性。左:暗处的板;右:用光( $36\text{J cm}^{-2}$ )照射的板。未配制的提取物是1%虎杖提取物的DMSO溶液。配制的提取物是表13中所示的配方中的1%虎杖提取物溶液。

[0026] 图14:变形链球菌对纯大黄素或白藜芦醇以及大黄素和白藜芦醇混合物的抗微生物敏感性。左:暗处的板;右:用光( $36\text{J cm}^{-2}$ )照射的板。

[0027] 图15:虎杖提取物的HPLC色谱图。

## 具体实施方式

[0028] 本发明涉及能够光动力灭活微生物例如细菌、病毒、真菌和原生动物的新型虎杖提取物。本发明的新型虎杖提取物能够在光存在下光动力灭活微生物如细菌,病毒和真菌。另外,根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物适用于在光存在下杀死微生物。此外,能够光动力灭活微生物的虎杖提取物适用于在光和氧气存在下通过将所述能够光动力灭活微生物的虎杖提取物给予至对其有需要的受试者而治疗受试者中的微生物感染。

### [0029] 定义

[0030] 如本文所用,以下术语中的每一个在本节中具有与其相关的含义。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语通常具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。一般地,本文使用的术语和实验室程序是本领域中众所周知的和常用的术语,并使用了标准技术或其修改。

[0031] 冠词“一个”和“一种”在本文中用于指示一个或多个,即指示至少一个冠词的语法对象。举例而言,“一个要素”是指一个要素或多个要素。

[0032] 当指示如量、持续时间等的可测量值时,本文所使用的“约”是指包括由指定值 $\pm 20\%$ , $\pm 10\%$ , $\pm 5\%$ , $\pm 1\%$ 或 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这种变化适合于执行所公开的方法。

[0033] 除非明确指出仅指代替代或替代是相互排斥的,否则本文使用的术语“或”意指“和/或”,但是本公开支持仅指代替代和“和/或”的定义。

[0034] 如本文所用,术语“抑制”,“降低”或“预防”,“减少”和这些术语的变体都包括任何可测量的减少,包括完全或基本上完全的抑制。

[0035] 如本文所用,词语“包含 (comprising)” (以及包含的任何形式,如“包含 (comprise)”和“包含 (comprises)”),“具有 (having)” (以及任何形式的具有,如“具有 (have)”和“具有有 (has)”的),“包括” (including) (以及包括的任何形式,如“包括 (include)”和“包括 (includes)”)或“含有 (containing)” (以及任何形式的含有,如“含有 (containe)”和“含有 (contains)”)是包含性的或开放式的,而不排除其它的,未列举的要素或方法步骤。

[0036] 在整个说明书中,在组合物被描述为具有,包括或包含特定组分,或方法被描述为具有,包括或包含特定处理步骤的情况下,设想本教导的组合物也基本上由所引述的组分组成,或由其组成,并且本教导的方法也基本上由引述的处理步骤组成,或由其组成。

[0037] 在本申请中,在要素或组分据称包括于所引述的要素或组分的列表中和/或选自其中的情况下,应当理解的是,要素或组分可以是所引述的要素或组分中的任何之一,并且可以选自由要素或组分组成的组的两个或更多个。

[0038] 除非另有特别说明,否则单数的使用包括复数 (反之亦然)。另外,除非特别声明,否则术语“约”的使用处于定量值之前,本教导还包括具体的定量值本身。

[0039] 应该理解的是,只要本教导保持是可操作的,则步骤的顺序或执行某些动作的顺序是不重要的。此外,可以同时两个或更多个步骤或动作。

[0040] 本文使用的术语“治疗 (treat)”,“治疗 (treating)”和“治疗 (treatment)”是指部分或完全缓解,抑制,减轻和/或缓和患者疑似患有的病症。

[0041] 如本文所用,“治疗有效”和“有效剂量”是指引发所期望的生物活性或效果的物质或用量。

[0042] 除非注明,术语“受试者”或“患者”可互换使用,并是指哺乳动物如人类患者和非人类灵长类动物,以及动物如兔,大鼠,小鼠,狗,猫和其他动物。因此,本文使用的术语“受试者”或“患者”是指可以给予本发明化合物的任何哺乳动物患者或受试者。在本发明的示范性实施方式中,为了确定根据本发明的方法进行治疗的受试者患者,采用公认的筛选方法测定与目标的或疑似的疾病或病症相关的风险因子或确定受试者中现有疾病或病症的状态。这些筛查方法包括,例如,常规检查以确定可能与目标或疑似的疾病或病症相关的风险因子。这些和其他常规方法允许临床医生选择出需要使用本发明的方法和化合物的疗法的患者。

[0043] 在整个本公开中,本发明的各个方面可以以范围形式呈现。应该理解的是,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,而不应该解释为对本发明范围的呆板限制。因此,范围的描述应该视为专门公开了所有可能的子范围以及范围内的单个数值。例如,如1至6的范围的描述应该认为专门公开了子范围,如1至3,1至4,1至5,2至4,2至6,3至6等,以及范围内的整数和分数,例如,1,2,3,4,5,5.5和6。无论范围的宽度如何,这都是适用的。

[0044] 如本文所用的细菌的非限制性实例包括幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*),嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*),结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*),鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*),胞内分枝杆菌 (*Mycobacterium intracellulare*),堪萨斯分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*),戈登分枝杆菌 (*Mycobacterium gordonae*),孢子分

枝杆菌 (*Mycobacteria sporozoite*), 金黄色葡萄球菌, 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*), 淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*), 脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*), 单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*), 酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A群链球菌), 化脓性无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae pyogenes*) (B群链球菌), 停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactia*), 粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*), 牛链球菌 (*Streptococcus bovis*), 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*), 致病性弯曲杆菌孢子 (*pathogenic Campylobacter sporozoites*), 肠球菌孢子 (*Enterococcus sporozoites*), 流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*), 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*), 杰氏棒状杆菌 (*Corynebacterium jeikeium*), 棒状杆菌孢子 (*Corynebacterium sporozoites*), 猪红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*), 产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*), 破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*), 艰难梭菌 (*Clostridium difficile*), 产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*), 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 多杀性巴氏杆菌 (*Pasturella multocida*), 多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotamicron*), 单形拟杆菌 (*Bacteroides uniformis*), 普通拟杆菌 (*Bacteroides vulgatus*), 核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*), 念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*), 钩端螺旋体 (*Leptospira*), 衣氏放线菌 (*Actinomyces israeli*), 乳酸杆菌 (*lactobacilli*) 如嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*), 放线菌属 (*Actinomyces spp.*), 诺卡氏菌属 (*Nocardia spp.*), 伴放线放线杆菌 (*A. actinomycetemcomitans*), 牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*), 中间普氏菌 (*P. intermedia*), 福赛氏类杆菌 (*B. forsythus*), 直形弯曲菌 (*C. rectus*), 缠结优杆菌 (*E. nodatum*), 微小消化链球菌 (*P. micros*), 中间葡萄球菌 (*S. intermedius*), 密螺旋体属 (*Treponema sp.*), 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) (MRSA) 和耐万古霉素肠道链球菌 (*Vancomycin Resistant Enterococci*) (VRE)。

[0045] 如本文所用, 病毒的非限制性实例包括逆转录病毒科 (例如, 人类免疫缺陷病毒, 如HIV-1 (也称为HTLV-III, LAV或HTLV-III/LAV) 或HIV-III; 和其它分离物, 如HIV-LP; 小核糖核酸病毒 (*Picornaviridae*) (例如, 脊髓灰质炎病毒 (*polio viruses*), 甲型肝炎病毒; 肠道病毒, 人柯萨奇病毒 (*human coxsackie viruses*), 鼻病毒 (*rhinoviruses*), 埃可病毒 (*echoviruses*)); 钙化病毒科 (*Calciviridae*) (例如, 引起胃肠炎的病毒株); 披膜病毒科 (*Togaviridae*) (例如, 马脑炎病毒 (*equine encephalitis viruses*), 风疹病毒 (*rubella viruses*)); 黄病毒科 (*Flaviridae*) (例如, 登革病毒 (*dengue viruses*), 脑炎病毒 (*encephalitis viruses*), 黄热病病毒 (*yellow fever viruses*)); 冠状病毒科 (*Coronaviridae*) (例如, 冠状病毒, 严重急性呼吸综合征 (SARS) 病毒); 弹状病毒科 (*Rhabdoviridae*) (例如, 水泡性口炎病毒 (*vesicular stomatitis viruses*), 狂犬病病毒 (*rabies viruses*)); 丝状病毒科 (*Filoviridae*) (例如, 埃博拉病毒 (*ebola virus*)); 副粘病毒科 (*Paramyxoviridae*) (例如, 副流感病毒 (*parainfluenza viruses*), 腮腺炎病毒 (*mumps virus*), 麻疹病毒 (*measles virus*), 呼吸道合胞病毒 (*respiratory syncytial virus*)); 正粘病毒科 (*Orthomyxoviridae*) (例如, 流感病毒); 布尼亚病毒科

(Bunyaviridae) (例如,汉坦病毒 (Hantaan virus),布尼亚病毒 (bunya viruses),白蛉热病毒 (phleboviruses) 和内罗病毒 (Nairo viruses));砂粒病毒科 (Arenaviridae) (出血热病毒 (hemorrhagic fever viruses));呼肠弧病毒科 (Reoviridae) (例如,呼肠弧病毒 (reoviruses),环状病毒 (orbiviruses) 和轮状病毒 (rotaviruses));双核糖核酸病毒科 (Birnaviridae);嗜肝DNA病毒科 (Hepadnaviridae) (例如,乙型肝炎病毒);细小病毒科 (Parvoviridae) (细小病毒);乳头瘤病毒科 (Papovaviridae) (乳头瘤病毒 (papilloma viruses),多瘤病毒 (polyoma viruses));腺病毒科 (Adenoviridae) (大多数腺病毒);疱疹病毒科 (Herpesviridae) (例如,单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus) (HSV) 1和2,水痘带状疱疹病毒 (varicella zoster virus),巨细胞病毒 (cytomegalovirus) (CMV),疱疹病毒);痘病毒科 (Poxviridae) (例如,天花病毒 (variola viruses),牛痘病毒 (vaccinia viruses),痘病毒 (pox viruses));和虹彩病毒科 (Iridoviridae) (例如,非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus));和未分类的病毒 (例如,海绵状脑病 (Spongiform encephalopathies) 的病原体,三角洲肝炎病原体 (agent of delta hepatitis) (认为是乙型肝炎病毒的缺陷卫星),非甲非乙型肝炎的病原体 (1类=内部传播;类2=父母传播,即丙型肝炎);诺沃克病毒 (Norwalk) 和相关病毒,以及星状病毒 (astroviruses))。

[0046] 如本文所用,真菌的非限制性实例包括新生隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*),荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*),粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*),皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*),沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*),白色念珠菌 (*Candida albicans*),热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*),光滑假丝酵母 (*Candida glabrata*),克鲁斯假丝酵母 (*Candida krusei*),近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*),都柏林念珠菌 (*Candida dubliniensis*),葡萄牙假丝酵母 (*Candida lusitanae*),絮状表皮癣菌 (*Epidermophyton floccosum*),奥氏小孢子菌 (*Microsporum audouinii*),犬小孢子菌 (*Microsporum canis*),犬小孢子菌库克氏小孢子菌 (*Microsporum canis* var. *distortum* *Microsporum cookei*),马小孢子菌 (*Microsporum equinum*),铁锈色小孢子菌 (*Microsporum ferrugineum*),黄褐色小孢子菌 (*Microsporum fulvum*),鸡小孢子菌 (*Microsporum gallinae*),石膏样小孢子菌 (*Microsporum gypseum*),矮小孢子菌 (*Microsporum nanum*),桃色小孢子菌 (*Microsporum persicolor*),*Trichophyton ajelioi*,同心毛癣菌 (*Trichophyton concentricum*),马毛癣菌 (*Trichophyton equinum*),淡黄毛癣菌 (*Trichophyton flavescens*),光辉毛癣菌 (*Trichophyton gioriae*),麦格尼毛癣菌 (*Trichophyton megnini*),人类须毛癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*),人类趾间须毛癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*),土壤须毛癣菌 (*Trichophyton phaseoliforme*),人类红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*),毛癣菌摩擦朗姆酒株 (*Trichophyton rubrum* downy strain),红色毛癣菌颗粒状品系 (*Trichophyton rubrum* granular strain),许兰毛癣菌 (*Trichophyton schoenleinii*),猴发癣菌 (*Trichophyton simii*),苏丹毛癣菌 (*Trichophyton soudanense*),土生毛癣菌 (*Trichophyton terrestre*),断发毛癣菌 (*Trichophyton tonsurans*),土壤毛癣菌 (*Trichophyton vanbreuseghemii*),动物疣状毛癣菌 (*Trichophyton verrucosum*),人类紫色毛癣菌 (*Trichophyton violaceum*),人类赤非毛癣菌 (*Trichophyton yaoundei*),烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*),黄曲霉

(*Aspergillus flavus*) 和棒曲霉 (*Aspergillus clavatus*)。

[0047] 如本文所用, 原生动物的非限制性实例包括阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*), 贾第鞭毛虫 (*Giardia lamblia*), 溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*), 结肠小袋纤毛虫 (*Balantidium coli*), 小隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*) 和贝氏等孢子球虫 (*Isospora belli*), 克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*), 冈比亚锥虫 (*Trypanosoma gambiense*), 杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*) 和福勒(氏)耐格里原虫 (*Naegleria fowleri*)。

[0048] 如本文所用, 癌细胞、癌和肿瘤的非限制性实例包括白血病细胞和肿瘤, 黑色素瘤细胞和肿瘤, 基底细胞癌, 鳞状细胞癌, 疣状癌, 小唾液腺癌, 淋巴瘤, 腺样囊性癌细胞和肿瘤, 膀胱细胞和肿瘤, 乳腺细胞和肿瘤, 以及结肠癌细胞和肿瘤。

[0049] 如本文所用, 良性口腔和口咽部肿瘤的非限制性实例包括嗜酸性肉芽肿 (eosinophilic granulomas), 纤维瘤, 颗粒细胞肿瘤, 角化棘皮瘤 (keratoacanthomas), 平滑肌瘤 (leiomyomas), 骨软骨瘤 (osteochondromas), 脂肪瘤, 神经鞘瘤 (schwannomas), 神经纤维瘤, 乳头状瘤 (papillomas), 尖锐湿疣 (condyloma acuminatum), 疣状黄瘤 (verruciform xanthoma), 化脓性肉芽肿 (pyogenic granulomas), 横纹肌瘤 (rhabdomyoma) 和牙源性肿瘤 (odontogenic tumors)。

[0050] 以下提供的材料、方法和实施例为制备本发明的示例性虎杖提取物的提供了代表性的方法。以下提供的材料、方法和实施例进一步提供了证明虎杖提取物提供对微生物如细菌、病毒、真菌和原生动物的光动力灭活 (PDI) 的能力的代表性方法。熟练的从业者将知道如何替换本领域技术人员已知的合适试剂, 起始材料和纯化方法, 以制备出本发明的虎杖提取物并证明虎杖提取物提供对微生物如细菌、病毒、真菌和原生动物的光动力灭活 (PDI) 的能力。

#### [0051] 描述

[0052] 本发明涉及能够光动力灭活选自自由幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*), 嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*), 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*), 鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*), 胞内分枝杆菌 (*Mycobacterium intracellulare*), 堪萨斯分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*), 戈登分枝杆菌 (*Mycobacterium goodii*), 孢子分枝杆菌 (*Mycobacterium sporozoite*), 金黄色葡萄球菌, 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*), 淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*), 脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*), 单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*), 酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A群链球菌), 化脓性无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B群链球菌), 停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*), 粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*), 牛链球菌 (*Streptococcus bovis*), 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*), 致病性弯曲杆菌孢子 (pathogenic *Campylobacter* sporozoites), 肠球菌孢子 (Enterococcus sporozoites), 流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*), 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*), 杰氏棒状杆菌 (*Corynebacterium jeikeium*), 棒状杆菌孢子 (*Corynebacterium sporozoites*), 猪红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix*

rhusiopathiae),产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*),破伤风梭菌(*Clostridium tetani*),艰难梭菌(*Clostridium difficile*),产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*),肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*),多杀性巴氏杆菌(*Pasturella multocida*),多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotamicron*),单形拟杆菌(*Bacteroides uniformis*),普通拟杆菌(*Bacteroides vulgatus*),核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*),念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*),钩端螺旋体(*Leptospira*),衣氏放线菌(*Actinomyces israeli*),乳酸杆菌(*Lactobacilli*)如嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*),放线菌属(*Actinomyces spp.*),诺卡氏菌属(*Nocardia spp.*),伴放线放线杆菌(*A.actinomycetemcomitans*),牙龈卟啉单胞菌(*P.gingivalis*),中间普氏菌(*P.intermedia*),福赛氏类杆菌(*B.forsythus*),直形弯曲菌(*C.rectus*),缠结优杆菌(*E.nodatum*),微小消化链球菌(*P.micros*),中间葡萄球菌(*S.intermedius*),密螺旋体属(*Treponema sp.*),耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) (MRSA)和耐万古霉素肠道链球菌(*Vancomycin Resistant Enterococci*) (VRE)组成的组的细菌的新型虎杖提取物。

[0053] 本发明涉及能够光动力灭活选自由逆转录病毒科(例如,人类免疫缺陷病毒,如HIV-1(也称为HTLV-III,LAV或HTLV-III/LAV)或HIV-III;和其它分离物,如HIV-LP;小核糖核酸病毒(Picornaviridae)(例如,脊髓灰质炎病毒(polio viruses),甲型肝炎病毒;肠道病毒,人柯萨奇病毒(human coxsackie viruses),鼻病毒(rhinoviruses),埃可病毒(echoviruses));钙化病毒科(Calciviridae)(例如,引起胃肠炎的病毒株);披膜病毒科(Togaviridae)(例如,马脑炎病毒(equine encephalitis viruses),风疹病毒(rubella viruses));黄病毒科(Flaviridae)(例如,登革病毒(dengue viruses),脑炎病毒(encephalitis viruses),黄热病病毒(yellow fever viruses));冠状病毒科(Coronaviridae)(例如,冠状病毒,严重急性呼吸综合征(SARS)病毒);弹状病毒科(Rhabdoviridae)(例如,水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis viruses),狂犬病病毒(rabies viruses));丝状病毒科(Filoviridae)(例如,埃博拉病毒(ebolavirus));副粘病毒科(Paramyxoviridae)(例如,副流感病毒(parainfluenza viruses),腮腺炎病毒(mumps virus),麻疹病毒(measles virus),呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus));正粘病毒科(Orthomyxoviridae)(例如,流感病毒);布尼亚病毒科(Bunyaviridae)(例如,汉坦病毒(Hantaan virus),布尼亚病毒(bunya viruses),白蛉热病毒(phleboviruses)和内罗病毒(Nairo viruses));砂粒病毒科(Arenaviridae)(出血热病毒(hemorrhagic fever viruses));呼肠弧病毒科(Reoviridae)(例如,呼肠弧病毒(reoviruses),环状病毒(orbiviruses)和轮状病毒(rotaviruses));双核糖核酸病毒科(Birnaviridae);嗜肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)(例如,乙型肝炎病毒);细小病毒科(Parvoviridae)(细小病毒);乳头瘤病毒科(Papovaviridae)(乳头瘤病毒(papilloma viruses),多瘤病毒(polyoma viruses));腺病毒科(Adenoviridae)(大多数腺病毒);疱疹病毒科(Herpesviridae)(例如,单纯疱疹病毒(herpes simplex virus)(HSV)1和2,水痘带状疱疹病毒(varicella zoster virus),巨细胞病毒(cytomegalovirus)(CMV),疱疹病毒);痘病毒科(Poxviridae)(例如,天花病毒(variola viruses),牛痘病毒(vaccinia viruses),痘病毒(pox viruses));和虹彩病毒科(Iridoviridae)(例如,非洲猪瘟病毒

(African swine fever virus));和未分类的病毒(例如,海绵状脑病(Spongiform encephalopathies)的病原体,三角洲肝炎病原体(agent of delta hepatitis)(认为是乙型肝炎病毒的缺陷卫星),非甲非乙型肝炎的病原体(1类=内部传播;类2=父母传播,即丙型肝炎);诺沃克病毒(Norwalk)和相关病毒,以及星状病毒(astroviruses))组成的组的病毒的新型虎杖提取物。

[0054] 本发明涉及能够光动力灭活选自由新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*),荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*),粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*),皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*),沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*),白色念珠菌(*Candida albicans*),热带假丝酵母(*Candida tropicalis*),光滑念珠菌(*Candida glabrata*),克鲁斯念珠菌(*Candida krusei*),近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*),杜伊灵念珠菌(*Candida dubliniensis*),葡萄牙假丝酵母(*Candida lusitanae*),絮状表皮癣菌(*Epidermophyton floccosum*),奥氏小孢子菌(*Microsporum audouinii*),犬小孢子菌(*Microsporum canis*),犬小孢子菌库克氏小孢子菌(*Microsporum canis* var. *distortum* *Microsporum cookei*),马类小孢子菌(*Microsporum equinum*),铁锈色小孢子菌(*Microsporum ferrugineum*),黄褐色小孢子菌(*Microsporum fulvum*),鸡小孢子菌(*Microsporum gallinae*),石膏样小孢子菌(*Microsporum gypseum*),矮小孢子菌(*Microsporum nanum*),桃色小孢子菌(*Microsporum persicolor*),*Trichophyton ajelioi*,同心发毛癣菌(*Trichophyton concentricum*),马发癣菌(*Trichophyton equinum*),淡黄毛癣菌(*Trichophyton flavescens*),光辉发癣菌(*Trichophyton gloriae*),麦格尼毛癣菌(*Trichophyton megnini*),人类须毛癣菌(*Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*),人类趾间须毛癣菌(*Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*),土壤须毛癣菌(*Trichophyton phaseoliforme*),人类红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*),毛癣菌摩擦朗姆酒株(*Trichophyton rubrum* downy strain),红色毛癣菌颗粒状品系(*Trichophyton rubrum* granular strain),许兰毛癣菌(*Trichophyton schoenleinii*),猴发癣菌(*Trichophyton simii*),苏丹毛癣菌(*Trichophyton soudanense*),土生毛癣菌(*Trichophyton terrestre*),断发毛癣菌(*Trichophyton tonsurans*),土壤毛癣菌(*Trichophyton vanbreuseghemii*),动物疣状毛癣菌(*Trichophyton verrucosum*),人类紫色毛癣菌(*Trichophyton violaceum*),人类赤非毛癣菌(*Trichophyton yaoundei*),烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*),黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和棒曲霉(*Aspergillus clavatus*)组成的组的真菌的新型虎杖提取物。

[0055] 本发明涉及能够光动力灭活选自由阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*),贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*),溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*),结肠小袋纤毛虫(*Balantidium coli*),小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)和贝氏等孢子球虫(*Isospora belli*),克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*),冈比亚锥虫(*Trypanosoma gambiense*),杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)和福氏耐格里变形虫(*Naegleria fowleri*)组成的组的真菌的新型虎杖提取物。

[0056] 本发明进一步涉及可用作能够杀死癌细胞、癌和肿瘤的光动力治疗剂的新型虎杖提取物。

[0057] 本发明进一步涉及可用作能够杀死选自由白血病细胞和肿瘤,黑色素瘤细胞和肿瘤,基底细胞癌,鳞状细胞癌,疣状癌,小唾液腺癌,淋巴瘤,腺样囊性癌细胞和肿瘤,膀胱细胞和肿瘤,乳腺细胞和肿瘤,以及结肠癌细胞和肿瘤组成的组的癌细胞、癌和肿瘤的光动力治疗剂的新型虎杖提取物。

[0058] 本发明进一步涉及可用作能够治疗良性口腔和口咽部肿瘤的光动力治疗剂的新型虎杖提取物。

[0059] 本发明进一步涉及可用作能够治疗选自由嗜酸性肉芽肿(eosinophilic granulomas),纤维瘤,粒细胞肿瘤,角化棘皮瘤(karatoacanthomas),平滑肌瘤(leiomyomas),骨软骨瘤(osteochondromas),脂肪瘤,神经鞘瘤(schwannomas),神经纤维瘤,乳头状瘤(papillomas),尖锐湿疣(condyloma acuminatums),疣状黄瘤(verruciform xanthoma),化脓性肉芽肿(pyogenic granulomas),横纹肌瘤(rhabdomyoma)和牙源性肿瘤(odontogenic tumors)组成的组的良性口腔和口咽部肿瘤的光动力治疗剂的新型虎杖提取物。

[0060] 本发明进一步涉及包含有效量的根据本发明的能够光动力灭活微生物的一种或多种虎杖提取物和赋形剂的组合物。

[0061] 本发明进一步涉及杀灭微生物如细菌、病毒、真菌和原生动物的方法,所述方法包括在光和氧气存在下使所述微生物与一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物接触。

[0062] 本发明进一步涉及杀灭微生物如细菌、病毒、真菌和原生动物的方法,所述方法包括在光和氧气存在下使微生物与一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂接触。

[0063] 本发明进一步涉及治疗受试者中的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向受试者给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0064] 本发明进一步涉及治疗受试者中的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向受试者给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0065] 本发明进一步涉及治疗受试者口腔中微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向受试者口腔给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0066] 本发明进一步涉及治疗受试者口腔中微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向受试者口腔给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0067] 本发明进一步涉及一种消除受试者口腔中的生物膜的方法,其中生物膜包含细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向受试者的口腔中给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0068] 本发明进一步涉及一种消除受试者口腔中的生物膜的方法,其中生物膜包含细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向受试者的口腔中给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0069] 本发明进一步涉及一种预防受试者口腔中生物膜形成的方法,其中生物膜含有细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向受试者的口腔中给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0070] 本发明进一步涉及一种预防受试者口腔中的生物膜形成的方法,其中生物膜含有细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向受试者的口腔中给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0071] 本发明进一步涉及一种降低受试者口腔中的微生物负荷的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向受试者的口腔中给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0072] 本发明进一步涉及降低受试者口腔中的微生物负荷的方法,所述方法包括向在光和氧气存在下受试者的口腔中给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0073] 本发明还涉及一种治疗牙齿表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0074] 本发明还涉及一种治疗牙齿表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物,其中所述牙齿表面选自自由后牙的舌侧、咬合、邻接和颊侧表面,以及前牙的舌侧、切缘、邻接和唇侧表面组成的组。

[0075] 本发明进一步涉及一种治疗牙齿表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0076] 本发明进一步涉及一种治疗牙齿表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂,其中所述牙齿表面选自自由后牙的舌侧、咬合、邻接和颊侧表面,以及前牙的舌侧、切缘、邻接和唇侧表面组成的组。

[0077] 本发明进一步涉及一种预防牙齿表面微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物感染的方法,方法包括向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的在光和氧气的存在下能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0078] 本发明进一步涉及一种预防牙齿表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物,其中所述牙齿表面选自自由后牙的舌侧、咬合、邻接和颊侧表面,以及前牙的舌侧、切缘、邻接和唇侧表面组成的组。

[0079] 本发明进一步涉及一种预防牙齿表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0080] 本发明进一步涉及一种预防牙齿表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂,其中所述牙齿表面选自自由后牙

的舌侧、咬合、邻接和颊侧表面,以及前牙的舌侧、切缘、邻接和唇侧表面组成的组。

[0081] 本发明进一步涉及一种降低牙齿表面的微生物负荷的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0082] 本发明进一步涉及一种降低牙齿表面微生物负荷的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物,其中所述牙齿表面选自由后牙的舌侧、咬合、邻接和颊侧表面,以及前牙的舌侧、切缘、邻接和唇侧表面组成的组。

[0083] 本发明进一步涉及一种降低牙齿表面的微生物负荷的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0084] 本发明进一步涉及一种降低牙齿表面微生物负荷的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂,其中所述牙齿表面选自由后牙的舌侧、咬合、邻接和颊侧表面,以及前牙的舌侧、切缘、邻接和唇侧表面组成的组。

[0085] 本发明进一步涉及一种消除牙齿表面的生物膜的方法,其中生物膜含有细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0086] 本发明进一步涉及一种消除牙齿表面的生物膜的方法,其中生物膜含有细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物,其中所述牙齿表面选自由后牙的舌侧、咬合、邻接和颊侧表面,以及前牙的舌侧、切缘、邻接和唇侧表面组成的组。

[0087] 本发明进一步涉及一种消除牙齿表面生物膜的方法,其中生物膜含有细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0088] 本发明进一步涉及一种消除牙齿表面的生物膜的方法,其中生物膜含有细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂,其中所述牙齿表面选自由后牙的舌侧、咬合、邻接和颊侧表面,以及前牙的舌侧、切缘、邻接和唇侧表面组成的组。

[0089] 本发明进一步涉及一种预防在牙齿表面形成生物膜的方法,其中生物膜含有细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0090] 本发明进一步涉及一种预防在牙齿表面形成生物膜的方法,其中生物膜含有细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物,其中所述牙齿表面选自由后牙的舌侧、咬合、邻接和颊侧表面,以及前牙的舌侧、切缘、邻接和唇侧表面组成的组。

[0091] 本发明进一步涉及一种预防在牙齿表面形成生物膜的方法,其中生物膜含有细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0092] 本发明进一步涉及一种预防在牙齿表面形成生物膜的方法,其中生物膜含有细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂,其中所述牙齿表面选自自由后牙的舌侧、咬合、邻接和颊侧表面,以及前牙的舌侧、切缘、邻接和唇侧表面组成的组。

[0093] 本发明进一步涉及一种治疗牙齿中的龋洞的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0094] 本发明进一步涉及一种治疗牙齿中的龋洞的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0095] 本发明进一步涉及一种预防牙齿中的龋洞的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0096] 本发明还涉及一种预防牙齿中的龋洞的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0097] 本发明进一步涉及一种治疗牙龈表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0098] 本发明进一步涉及一种治疗牙龈表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物,其中所述牙龈表面选自自由龈缘(gingival margin),龈沟(sulcus)和牙周袋的开放表面组成的组。

[0099] 本发明进一步涉及一种治疗牙龈表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0100] 本发明进一步涉及一种治疗牙龈表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂,其中所述牙龈表面选自自由龈缘,龈沟和牙周袋的开放表面组成的组。

[0101] 本发明进一步涉及一种预防牙龈表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0102] 本发明进一步涉及一种预防牙龈表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙齿表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物,其中所述牙龈表面选自自由龈缘,龈沟和牙周袋的开放表面组成的组。

[0103] 本发明进一步涉及一种预防牙龈表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0104] 本发明进一步涉及一种预防牙龈表面的微生物感染如细菌、病毒、真菌和原生动物的感染的方法,所述方法包括向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的在光和氧气存在下能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂,其中所述牙龈表面选自自由龈缘,龈沟和牙周袋的开放表面组成的组。

[0105] 本发明进一步涉及降低牙龈表面上的微生物负荷的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0106] 本发明进一步涉及一种降低牙龈表面上的微生物负荷的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物,其中所述牙龈表面选自自由龈缘,龈沟和牙周袋的开放表面组成的组。

[0107] 本发明进一步涉及一种降低牙龈表面上的微生物负荷的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0108] 本发明进一步涉及一种降低牙龈表面上的微生物负荷的方法,所述方法包括在光和氧气存在下向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂,其中所述牙龈表面选自自由龈缘,龈沟和牙周袋的开放表面组成的组。

[0109] 本发明进一步涉及一种消除牙龈表面上的生物膜的方法,其中生物膜包含细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0110] 本发明进一步涉及一种消除牙龈表面上的生物膜的方法,其中生物膜包含细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物,其中所述牙龈表面选自自由龈缘,龈沟和牙周袋的开放表面组成的组。

[0111] 本发明进一步涉及一种消除牙龈表面上的生物膜的方法,其中生物膜包含细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0112] 本发明进一步涉及一种消除牙龈表面上的生物膜的方法,其中生物膜包含细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂,其中所述牙龈表面选自自由龈缘,龈沟和牙周袋的开放表面组成的组。

[0113] 本发明进一步涉及一种预防牙龈表面上形成生物膜的方法,其中生物膜包含细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0114] 本发明进一步涉及一种预防牙龈表面上形成生物膜的方法,其中生物膜包含细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物,其中所述牙龈表面选自自由龈缘,龈沟和牙周袋的开放表面组成的组。

[0115] 本发明进一步涉及一种消除牙龈表面上的生物膜的方法,其中生物膜含有细菌,

病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0116] 本发明进一步涉及一种消除牙龈表面上的生物膜的方法,其中生物膜含有细菌,病毒,真菌和原生动物,所述方法包括在光和氧气存在下向牙龈表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂,其中所述牙龈表面选自自由龈缘,龈沟和牙周袋的开放表面组成的组。

[0117] 本发明进一步涉及一种治疗下颌弓和上颌弓上的微生物感染的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向下颌弓和上颌弓给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0118] 本发明进一步涉及一种治疗下颌弓和上颌弓上的微生物感染的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向下颌弓和上颌弓给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0119] 本发明进一步涉及一种预防下颌弓和上颌弓上的微生物感染的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向下颌弓和上颌弓给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0120] 本发明进一步涉及一种预防下颌弓和上颌弓上的微生物感染的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向下颌弓和上颌弓给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0121] 本发明进一步涉及一种降低下颌弓和上颌弓上的微生物负荷的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向下颌弓和上颌弓给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0122] 本发明进一步涉及一种降低下颌弓和上颌弓上的微生物负荷的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向下颌弓和上颌弓给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0123] 本发明进一步涉及一种消除下颌弓和上颌弓上的生物膜的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向下颌弓和上颌弓给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0124] 本发明进一步涉及一种消除下颌弓和上颌弓上的生物膜的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向下颌弓和上颌弓给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0125] 本发明进一步涉及一种预防下颌弓和上颌弓上形成生物膜的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向下颌弓和上颌弓给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0126] 本发明进一步涉及一种预防下颌弓和上颌弓上形成生物膜的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向下颌弓和上颌弓给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0127] 本发明进一步涉及一种杀灭牙科器具表面上的微生物如细菌、病毒、真菌和原生动物的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向牙科器具表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物。

[0128] 本发明进一步涉及一种杀灭牙科器具表面上的微生物如细菌、病毒、真菌和原生动物的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向牙科器具表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物,其中所述牙科器具选自由正畸托架,带,扣,粘合附件,粘合线,牙冠,镶嵌物,填补物,修复体,牙基台和牙种植体组成的组。

[0129] 本发明进一步涉及一种杀灭牙科器具表面上的微生物如细菌、病毒、真菌和原生动物的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向牙科器具表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂。

[0130] 本发明进一步涉及一种杀灭牙科器具表面上的微生物如细菌、病毒、真菌和原生动物的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下向牙科器具表面给药有效量的一种或多种根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物和赋形剂,其中牙科器具选自由正畸托架,带,扣,粘合附件,粘合线,牙冠,镶嵌物,填补物,修复体,牙基台和牙种植体组成的组。

[0131] 本发明进一步涉及包含有效量的一种或多种根据本发明的能够杀死癌细胞、癌和肿瘤的虎杖提取物和赋形剂的组合物。

[0132] 本发明进一步涉及一种杀死癌细胞、癌和肿瘤的方法,所述方法包括在光和氧气存在下使所述癌细胞和肿瘤与一种或多种根据本发明的能够作用为光动力治疗剂的虎杖提取物接触。

[0133] 本发明进一步涉及一种杀死癌细胞、癌和肿瘤的方法,所述方法包括在光和氧气的存在下使所述癌细胞和肿瘤与一种或多种根据本发明的能够作用为光动力治疗剂的虎杖提取物接触,其中所述癌细胞、肿瘤和癌选自由白血病细胞和肿瘤,黑色素瘤细胞和肿瘤,基底细胞癌,鳞状细胞癌,疣状癌,小唾液腺癌,淋巴瘤,腺样囊性癌细胞和肿瘤,膀胱细胞和肿瘤,乳腺细胞和肿瘤,以及结肠癌细胞和肿瘤组成的组。

[0134] 本发明进一步涉及一种杀死癌细胞、癌和肿瘤的方法,所述方法包括在光和氧气存在下使所述癌细胞和肿瘤与一种或多种根据本发明的能够作用为光动力治疗剂的虎杖提取物和赋形剂接触。

[0135] 本发明进一步涉及一种杀死癌细胞、癌和肿瘤的方法,所述方法包括在光和氧气存在下使所述癌细胞和肿瘤与一种或多种根据本发明的能够作用为光动力治疗剂的虎杖提取物和赋形剂接触,其中所述癌细胞、肿瘤和癌选自由白血病细胞和肿瘤,黑色素瘤细胞和肿瘤,基底细胞癌,鳞状细胞癌,疣状癌,小唾液腺癌,淋巴瘤,腺样囊性癌细胞和肿瘤,膀胱细胞和肿瘤,乳腺细胞和肿瘤,以及结肠癌细胞和肿瘤组成的组。

[0136] 本发明进一步涉及包含有效量的一种或多种可用作能够治疗良性口腔和口咽部肿瘤的光动力治疗剂的虎杖提取物的组合物。

[0137] 本发明进一步涉及一种治疗良性口腔和口咽部肿瘤的方法,所述方法包括在光和氧气存在下使所述口腔和口咽部肿瘤与一种或多种根据本发明的能够作用为光动力治疗剂的虎杖提取物接触。

[0138] 本发明进一步涉及一种治疗良性口腔和口咽部肿瘤的方法,所述方法包括在光和氧气存在下使所述口腔和口咽部肿瘤与一种或多种能够作用为根据本发明的光动力治疗剂的虎杖提取物接触,其中良性口腔和口咽部肿瘤选自由嗜酸性肉芽肿,纤维瘤,颗粒细胞肿瘤,角化棘皮瘤,平滑肌瘤,骨软骨瘤,脂肪瘤,神经鞘瘤,神经纤维瘤,乳头状瘤,尖锐湿疣,疣状黄瘤,化脓性肉芽肿,横纹肌瘤和牙源性肿瘤组成的组。

[0139] 本发明进一步涉及一种治疗良性口腔和口咽部肿瘤的方法,所述方法包括在光和氧气存在下使所述口腔和口咽部肿瘤与一种或多种根据本发明的能够作用为光动力治疗剂的虎杖提取物和赋形剂接触。

[0140] 本发明进一步涉及一种治疗良性口腔和口咽部肿瘤的方法,所述方法包括在光和氧气存在下使所述口腔和口咽部肿瘤与一种或多种根据本发明的能够作用为光动力治疗剂的虎杖提取物和赋形剂接触,其中良性口腔和口咽部肿瘤选自嗜酸性肉芽肿,纤维瘤,颗粒细胞肿瘤,角化棘皮瘤,平滑肌瘤,骨软骨瘤,脂肪瘤,神经鞘瘤,神经纤维瘤,乳头状瘤,尖锐湿疣,疣状黄瘤,化脓性肉芽肿,横纹肌瘤和牙源性肿瘤组成的组。

[0141] 本发明进一步涉及用于制备根据本发明的能够光动力灭活微生物的虎杖提取物的方法。

[0142] 通过阅读以下详细描述和所附权利要求,这些和其他目的、特征和优点对于本领域的普通技术人员将变得显而易见。除非另有说明,本文中所有的百分比、比率和比例均以重量计。除非另有说明,所有的温度都以摄氏度(°C)计。所引用的所有文件都在相关部分中,通过结合于本文中作为参考;任何文档的引用都不应该解释为承认它是关于本发明的现有技术。

[0143] 本发明的组合物

[0144] 从虎杖的根中分离出多于30种化合物。这些成分中有:芪,蒽醌,类黄酮,酚,甾醇,精油和氨基酸。具有已报道的可能是其在传统民间医药中的用途的原因的虎杖根的生物活性组分包括:白藜芦醇,虎杖苷(polydatin),大黄素,大黄素甲醚(phycion),大黄酸(rhein)和蒽甙(anthraglycosides)A和B。一些这些生物活性剂具有在辐照时会产生激发三重态的结构特征,其会参与光敏反应。在一些实施方式中,辐照时产生的激发三重态会参与与氧气和其他物质的光敏化反应。大黄素,大黄素甲醚,及它们各自的糖基化衍生物,蒽甙A和B都会产生微生物的光动力灭活和光动力疗法效果。在一些实施方式中,开发出分离方法以富集产生光动力疗法和微生物的光动力灭活的光敏分子的所获得的提取物。

[0145] 在一个实施方式中,虎杖提取物中的各种化学物质的相对量如表1中所述。

[0146] 表1:在1mg提取物中发现的已知虎杖组分的相对含量。

[0147]

组分	每1mg提取物中的含量(μg)
虎杖苷	63.2
白藜芦醇	60.4
蒽甙B	12.1
大黄酸	5.6
大黄素	50.1
大黄素甲醚	10.4

[0148] 示例性虎杖提取物的代表性HPLC色谱图显示于图6和15中,表2中列出了保留时间。五种化合物鉴定为提取物的部分。

[0149] 表2.HPLC保留时间,254nm处的强度和已知组分的对应身份。

	时间(min)	254nm 下的强度(AU)	化合物
[0150]	13.029	22.182	未知
	14.882	36.22	未知
	15.975	32.031	未知
	16.509	33.62	未知
	18.329	146.915	未知
	19.455	50.72	未知
	20.542	214.201	虎杖苷
	21.735	26.353	未知
	25.709	349.624	白藜芦醇
	30.255	30.675	未知
[0151]	32.902	26.428	未知
	35.209	49.795	未知
	36.169	20.306	未知
	36.531	197.13	蒽甙 B
	38.383	43.604	未知
	44.189	52.799	大黄酸
	51.175	1440.695	大黄素
	55.209	225.496	大黄素甲醚

[0152] 据发现,通过光照显著放大了虎杖植物提取物的抗微生物性能。在一个实施方式中,光照采用可见光。在另一个实施方式中,光照采用蓝光。在另一个实施方式中,光照采用绿光。在另一个实施方式中,光照采用紫外(UV)光。在一个实施方式中,使用的光具有200至400nm的波长。在另一个实施方式中,使用的光具有380至450nm的波长。在另一个实施方式中,使用的光具有400至700nm的波长。在另一个实施方式中,使用的光具有450至495nm的波长。在另一个实施方式中,使用的光具有495至570nm的波长。在另一个实施方式中,使用的光具有570至590nm的波长。在另一个实施方式中,使用的光具有590至620nm的波长。在另一个实施方式中,使用的光具有620至750nm的波长。

[0153] 在一些实施方式中,光照在1至300J cm<sup>-2</sup>的辐射曝量下进行。在一个实施方式中,光的辐射曝量为约28J cm<sup>-2</sup>。在另一个实施方式中,光的辐射曝量为约30J cm<sup>-2</sup>。在另一个实施方式中,光的辐射曝量为约35J cm<sup>-2</sup>。在另一个实施方式中,光的辐射曝量为约36J cm<sup>-2</sup>。在另一个实施方式中,光的辐射曝量为约50J cm<sup>-2</sup>。在另一个实施方式中,光的辐射曝量

为约 $100\text{ J cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,光的辐射曝量为约 $150\text{ J cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,光的辐射曝量为约 $200\text{ J cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,光的辐射曝量为约 $250\text{ J cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,光的辐射曝量为约 $300\text{ J cm}^{-2}$ 。

[0154] 在一些实施方式中,照射光的表面功率密度为 $0.001$ 至 $0.25\text{ W cm}^{-2}$ 。在一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.001\text{ W cm}^{-2}$ 。在一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.002\text{ W cm}^{-2}$ 。在一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.003\text{ W cm}^{-2}$ 。在一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.004\text{ W cm}^{-2}$ 。在一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.005\text{ W cm}^{-2}$ 。在一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.006\text{ W cm}^{-2}$ 。在一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.007\text{ W cm}^{-2}$ 。在一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.008\text{ W cm}^{-2}$ 。在一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.009\text{ W cm}^{-2}$ 。在一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.0096\text{ W cm}^{-2}$ 。

[0155] 在一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.01\text{ W cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.02\text{ W cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.0278\text{ W cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.03\text{ W cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.04\text{ W cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.05\text{ W cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.06\text{ W cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.07\text{ W cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.08\text{ W cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.09\text{ W cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.10\text{ W cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.15\text{ W cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.20\text{ W cm}^{-2}$ 。在另一个实施方式中,照射光的表面功率密度为约 $0.25\text{ W cm}^{-2}$ 。

[0156] 首先使用来自土壤的细菌证明这种光动力效应(图1),并随后用购自ATCC(美国模式典型菌种保藏中心(American Type Culture Collection))的标准细菌物种进行定量。在一些实施方式中,针对口腔细菌,光毒性虎杖提取物的效力超过了氯己定的传统抗生素活性。对于新斯科舍省(Nova Scotia)和新不伦瑞克省(New Brunswick)的各个收获地点,各个季节和栽培方法(室内对比室外),这些光活性提取物都提供了显著的光动力疗法(PDT)和光动力灭活效果。

[0157] 出乎意料的是,含有相对较少重量百分比的这些化合物的提取物比分离的纯蒽醌和以类似浓度的混合物活性大得多。在一些实施方式中,对于小于10%的重量百分比观察到活性增加。作为载体的提取物以先前未观察到的方式提高了虎杖组分的光活性。迄今为止,还没有虎杖提取物的光动力学活性的报道,也没有其相对于构成提取物的分离组分的光活性增加的报道。

#### [0158] 本发明的制剂

[0159] 本发明还涉及包含根据本发明的虎杖提取物的组合物或制剂。通常,本发明的组合物包含有效量的有效提供微生物如细菌、病毒、真菌的光动力灭活(PDI)的根据本发明的虎杖提取物;和一种或多种赋形剂。

[0160] 为了本发明的目的,术语“赋形剂”和“载体”在本发明的整个描述中可以互换使用,并且术语在本文中定义为“用于配制安全且有效的药物组合物的实践中的成分”。

[0161] 应该理解的是,赋形剂可以主要用于递送安全、稳定和功能性药物,不仅作用于

递送的整个载体的一部分,而且还用作实现活性成分的吸收者有效吸收的手段。赋形剂可以简单而直接地起到惰性填料的作用,或如本文所用的赋形剂可以是pH稳定系统或包衣的一部分,以确保将成分安全地递送至合适的生理位置用于治疗。还应该认识到的是,可以利用本发明的虎杖提取物具有改进的细胞效力,药代动力学性质以及改进的口服生物利用度这一事实。

[0162] 本教导还提供了包含本文描述的虎杖提取物和一种或多种药用载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物。这种载体的实例对于本领域技术人员是公知的,并可以根据可接受的制药方法与步骤制备,如例如描述于Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA (1985) 中的那些,其全部公开内容出于所有目的通过引证结合于本文中。如本文所用的“药用”是指从毒理学角度而言可接受用于药物应用并且不会与活性成分不利地相互作用的物质。因此,药用载体是那些与制剂中的其他成分相容并且是生物学可接受的载体。补充活性成分也可以引入药物组合物中。

[0163] 液体载体可以用于制备溶液,悬浮液,乳液,糖浆,酏剂以及用于吸入递送。本教导的虎杖提取物可以溶解或悬浮于药用液体载体如水、有机溶剂或这两者的混合物或药用油或脂肪中。液体载体可以包含其他合适的药物添加剂如增溶剂,乳化剂,缓冲剂,防腐剂,甜味剂,调味剂,悬浮剂,增稠剂,着色剂,粘度调节剂,稳定剂和渗透调节剂。用于口服和肠胃外给药的液体载体的实例包括但不限于水(特别是包含如本文描述的添加剂,例如纤维素衍生物如羧甲基纤维素钠溶液),醇(包括一元醇和多元醇,如二醇)及其衍生物,和油(例如,分馏椰子油和花生油)。对于胃肠外给药,载体可以是油性酯如油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯。无菌液体载体用于无菌液体形式的组合物中而用于肠胃外给药。用于加压组合物的液体载体可以是卤代烃或其他药用推进剂(propellant)。

[0164] 优选地,药物组合物是单位剂型,例如片剂,胶囊剂,粉剂,溶液剂,混悬液剂,乳剂,颗粒剂或栓剂。在这种形式中,药物组合物可以再分成含有适量化合物的单位剂量。单位剂型可以是包装的组合物,例如,包装的粉末、小瓶、安瓿、预装注射器或含有液体的小药囊。可替换地,单位剂型本身可以是胶囊或片剂,或其可以是适当数量的包装形式的任何这种组合物。这种单位剂型可以含有约1mg/kg的虎杖提取物至约500mg/kg的化合物,并可以以单剂量或以两剂量或更多剂量给药。这种剂量可以以任何适用于将虎杖提取物引导至受试者中或表面上的微生物或癌细胞的位置的方式进行给药,包括口服,经由植入物,肠胃外(包括静脉内,腹膜内和皮下注射),直肠,阴道和透皮。

[0165] 当给药用于治疗或抑制具体疾病状态或病症时,应该理解的是有效剂量可以根据所使用的具体化合物,给药模式和所治疗病症的严重程度以及各种与被治疗个体有关的生理因素而变化。在治疗应用中,本教导的虎杖提取物可以以足以治愈或至少部分改善疾病及其并发症的症状的量提供于已经患有疾病的患者。用于治疗特定个体的剂量通常必须由主治医师主观确定。所涉及的变量包括患者的具体病症及其状态以及患者的体型,年龄和响应模式。

[0166] 为了增加本教导的虎杖提取物的有效性,可能期望的是将虎杖提取物与对治疗目标疾病有效的其他药剂组合。例如,有效治疗目标疾病的其它活性化合物(即,其它活性成分或药剂)可以与本教导的虎杖提取物一起给药。其他药剂可以与本文中公开的虎杖提取

物同时或在不同的时间给药。

[0167] 本教导的虎杖提取物可以用于治疗或抑制哺乳动物例如人类受试者中的病理状况或病症。因此,本教导提供了通过向哺乳动物提供本教导的虎杖提取物或包含与药用载体组合或联合的本教导的虎杖提取物的药物组合物而治疗或抑制病理学状况或病症的方法。本教导的虎杖提取物可以单独给药或与其他治疗有效的化合物或疗法组合给药而用于治疗或抑制病理状况或病症。

[0168] 本发明组合物和制剂的非限制性实例包括以任何相对量,0至100%的虎杖提取物。在一些实施方式中,相对量表示为重量/体积,即w/v。例如,1%浓度的提取物应该理解为每1mL组合物或制剂有10mg提取物,即1%=10mg/mL。

[0169] 在各个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为0.01%至20%。在一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为0.005%至0.1%。在其他实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为0.01%至1%。在其他实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为0.1%至1%。在一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约0.1%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约0.2%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约0.3%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约0.4%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约0.5%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约0.6%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约0.7%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约0.8%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约0.9%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约1%。在一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约5%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约10%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约15%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约20%。

[0170] 在各个其他实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为20%至100%。在一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约25%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约30%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约35%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约40%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约45%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约50%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约55%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约60%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约65%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约70%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约75%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约80%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约85%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约90%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约95%。在另一个实施方式中,虎杖提取物的相对百分比为约100%。

[0171] 根据本发明的组合物的非限制性实例包含约0.001mg至约1000mg的一种或多种根据本发明的虎杖提取物和一种或多种赋形剂;约0.01mg至约100mg的一种或多种根据本发明的虎杖提取物和一种或多种赋形剂;和约0.1mg至约10mg的一种或多种根据本发明的虎杖提取物;和一种或多种赋形剂。

[0172] 在一些实施方式中,本发明的虎杖提取物可以配制成包含以按重量计0.005%至

10%引入糊剂中的本发明的虎杖提取物和至少一种赋形剂的糊剂。

[0173] 在一些实施方式中,本发明的虎杖提取物可以配制成由表3中列出的材料构成的糊剂。在这些制剂中,本发明的虎杖提取物以按重量计0.01%至10%引入糊剂中。

[0174] 表3:本发明的虎杖提取物的糊剂制剂的示例性制剂

成分	%组成
提取物	0.01 至 10.00
二氧化硅	10.0 至 40.0
山梨糖醇	0.0 至 5.0
甘油	0.0 至 5.0
木糖醇	0.0 至 1.5
椰油醇硫酸钠	0.0 至 2.5
调味剂	0.0 至 1.5
黄原胶	0.0 至 1.5
角叉菜胶	0.0 至 1.5
水	余量至 100%

[0177] 在优选的实施方式中,本发明的虎杖提取物可以配制成由表4中列出的材料组成的糊剂。在这些制剂中,本发明的虎杖提取物以按重量计0.01%至10%引入糊剂中。

[0178] 表4:本发明的虎杖提取物的糊剂制剂的优选示例性制剂

[0179]

成分	%组成
提取物	0.01至10.00
二氧化硅	25.00
山梨糖醇	1.00
甘油	1.00
木糖醇	0.50
椰油醇硫酸钠	1.00
调味剂	0.25
黄原胶	0.50
角叉菜胶	0.50
水	余量至100%

[0180] 在一些实施方式中,本发明的虎杖提取物可以配制成由表5中列出的材料组成的糊剂。在这些制剂中,本发明的虎杖提取物以按重量计0.01%至10%引入至糊剂中。

[0181] 表5:本发明的虎杖提取物的糊剂制剂的示例性制剂

	成分	%组成
[0182]	提取物	0.01%至 10%
	磨料	20%至 45%
	去污剂	1%至 2%
	粘合剂	0.5%至 4%
	润湿剂	10%至 30%
[0183]	调味剂、增甜剂和着色剂	1%至 5%
	防腐剂	0.05%至 0.50%
	水	余量至 100%

[0184] 磨料包括但不限于磷酸二钙,偏磷酸钠,碳酸钙,二氧化硅,水合氧气化铝,硅酸锆,焦磷酸钙和云母。

[0185] 去污剂包括但不限于月桂基硫酸钠,N-月桂酰肌氨酸钠,椰油醇硫酸钠和癸基葡糖苷。

[0186] 粘合剂包括但不限于纤维素,羧甲基纤维素钠,角叉菜胶,黄原胶,藻酸盐,聚乙烯基甲基醚/马来酸(PVM/MA)共聚物,阿拉伯树胶和硅酸镁铝。

[0187] 保湿剂包括但不限于甘油,山梨糖醇和丙二醇。

[0188] 调味剂、甜味剂和着色剂包括但不限于薄荷,留兰香,肉桂,冬青,薄荷醇,木糖醇和糖精钠。

[0189] 防腐剂包括但不限于醇,苯甲酸盐,甲醛,二氯酚,苯甲酸钠,对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸乙酯。

[0190] 在一些实施方式中,本发明的虎杖提取物可以配制成包含以按重量计0.01%至10%引入凝胶中的本发明的虎杖提取物和至少一种赋形剂的凝胶。

[0191] 在一些实施方式中,本发明的虎杖提取物可以配制成由表6中列出的材料构成的凝胶。在这些制剂中,本发明的虎杖提取物以按重量计0.01%至10%引入到糊剂中。

[0192] 表6:本发明的虎杖提取物的凝胶制剂的示例性制剂

	成分	% 组成
[0193]	提取物	0.01 至 10.00
	山梨糖醇	5.0 至 40.0

[0194]	甘油	1.0 至 20.0
	木糖醇	0.0 至 2.5
	椰油醇硫酸钠	0.0 至 5.0
	调味剂	0.0 至 1.5
	黄原胶	0.0 至 2.5
	角叉菜胶	0.0 至 2.5
	水	余量至 100%

[0195] 在优选的实施方式中,本发明的虎杖提取物可以配制成由表7中列出的材料构成的凝胶。在这些制剂中,本发明的虎杖提取物以按重量计0.01%至10%引入凝胶中。

[0196] 表7:本发明的虎杖提取物的凝胶制剂的优选示例性制剂

[0197]

成分	%组成
提取物	0.01至10.00
山梨糖醇	25.00
甘油	10.00
木糖醇	0.5
椰油醇硫酸钠	1.0
调味剂	0.25
黄原胶	1.0
角叉菜胶	1.0
水	余量至100%

[0198] 在一些实施方式中,本发明的虎杖提取物可以配制成包含以按重量计0.01%至10%引入泡沫中的本发明的虎杖提取物和至少一种赋形剂的泡沫。

[0199] 在一些实施方式中,本发明的虎杖提取物可以配制成由表8中列出的材料构成的泡沫。在这些制剂中,本发明的虎杖提取物以按重量计0.01%至10%引入泡沫中。

[0200] 表8:本发明的虎杖提取物的泡沫制剂的示例性制剂

成分	%组成
提取物	0.01 至 10.00

[0201]

[0202]	甘油	2.0 至 15.0
	山梨糖醇	2.0 至 15.0
	木糖醇	0.0 至 2.5
	调味剂	0.0 至 1.5
	椰油醇硫酸钠	0.0 至 2.5
	癸基葡糖苷	0.25 至 2.5
	水	余量至 100%

[0203] 在优选的实施方式中,本发明的虎杖提取物可以配制成由表9中列出的材料构成的泡沫。在这些制剂中,本发明的虎杖提取物以按重量计0.01%至10%引入泡沫中。

[0204] 表9:本发明的虎杖提取物的泡沫制剂的优选示例性制剂

[0205]

成分	%组成
提取物	0.01至10.00
甘油	5.0
山梨糖醇	5.0
木糖醇	0.5
调味剂	0.25
椰油醇硫酸钠	1.0
癸基葡糖苷	1.0
水	余量至100%

[0206] 实施例

[0207] 通过参考以下实验实施例进一步详细描述本发明。这些实施例仅提供用于举例说明的目的,除非另有说明,并非旨在是限制性的。因此,本发明决不应该解释为仅限于以下实施例,而应该解释为包含由于本文提供的教导而变得显而易见的任何和所有变体。

[0208] 材料和方法

[0209] 二甲基亚砜(DMSO,99.7%)购自Fisher Scientific。通过用无菌去离子水稀释商购丙二醇(99.5%,Sigma-Aldrich)制备5%丙二醇(PG)水溶液作为用于体内测试的载体。甲苯胺蓝0(TB)购自Sigma-Aldrich并用无菌去离子水稀释。Listerine Zero(Johnson& Johnson)购自当地杂货店,而Oro-Clense(Germiphene Corporation,DIN 02209055)获得自牙科诊所。葡萄糖酸氯己定(CHX)是商购的(Sigma-Aldrich)并用无菌水稀释。

[0210] 虎杖提取物的制备

[0211] 将多余的土壤和根毛从虎杖植物根部去除,随后使用往复锯和剪枝剪将其切成小块。清洗根碎片以去除多余的土壤,并用Earthwise削片机(型号GS70014)切碎或用商购的Vita-Mixer Maxi-4000(Vitamix Corporation,型号479044)粉碎成粉末。在提取之前,将处理的根干燥至少1天。

[0212] 使用具有A-B梯度(90%→0%A;A=0.2%甲酸水溶液,B=MeOH)的Hypersil GOLD C18反相柱在Agilent/Hewlett-Packard 1100系列仪器(ChemStation Rev.A.10.02软件)上进行HPLC分析。报告的停留时间校正至±0.1min内。柱温度记录为35℃,流速1mL/min,使用20μL以5mg/mL制备的样品的注射。使用UV/Vis DAD记录254nm,306nm,320nm,435nm和450nm的吸光度值。图15中显示的曲线记录于254nm。

[0213] 虎杖提取物制剂1:

[0214] 在2012年4月从Halifax,NS收获虎杖植物,并将其移植于普罗米克斯(promix)土壤(ASB Greenwood)中,并在环境条件下保存于人工气候室(phytotron)中,直到在2013年2月加工。将根粉末(0.5g)用200mL的乙醇索氏提取(S Soxhlet extract)提取直至溶剂变为无色。将乙醇提取物减压浓缩,而获得132mg粗提取物。

[0215] 本领域技术人员将会知道和理解,用于虎杖提取物制剂1中的乙醇可以用合适的有机溶剂如甲醇,异丙醇,正丙醇,正丁醇,四氢呋喃,1,4-二氧六环,二氯甲烷,二氯乙烷,乙酸乙酯等代替。

[0216] 虎杖提取物制剂2:

[0217] 虎杖根在2013年5月收获自在Wolfville,NS生长的43株植物。将根移植于人工气候室中,其中22个样本在天然土壤中繁殖,而21个样本在普罗米克斯土壤中繁殖。在收获所有43个根时,从2014年1月到2014年5月收集植物样本。将该材料切碎并合并,并将1.5kg在室温下用7.5L乙醇提取。在第11周时,将40mL等分移出并真空浓缩,而获得497mg粗提取物。

[0218] 本领域技术人员应该知道和理解,用于虎杖提取物制剂1中的乙醇可以用合适的有机溶剂如甲醇,异丙醇,正丙醇,正丁醇,四氢呋喃,1,4-二噁烷,二氯甲烷,二氯乙烷,乙酸乙酯等代替。

[0219] 在其他实施方式中,来自含有构成虎杖的光敏成分的其他植物的提取物也能够引发PDI和PDT作用。例如,在下列植物科和属中也发现了虎杖提取物中含有的光活性化合物大黄素。在一些实施方式中,猕猴桃科(Actinidiaceae)(猕猴桃属(Actinidia)),苋科(Amaranthaceae)(牛膝属(Achyranthes)),菊科(Asteraceae)(蒿属(Artemisia),莴苣属(Lactuca),蜂斗菜属(Petasites)),紫葳科(Bignoniaceae)(梓属(Catalpa)),金丝桃科(Clusiaceae)(金丝桃属(Hypericum)),藤黄科(Clusiaceae)(银丝茶属(Ploiarium)),金丝桃科(Clusiaceae)(圣诞莓属(Psorospermum)),柏科(Cupressaceae)(桧属(Juniperus)),豆科(Fabaceae)(肉桂(Cassia)),豆科(菜豆(Phaseolus)),豆科(豌豆属(Pisum)),百合科(Liliaceae)(芦荟(Aloe)),紫金牛科(Myrsinaceae)(铁仔属(Myrsine)),车前科(Plantaginaceae)(车前属(Plantago)),禾本科(Poaceae)(冰草属(Agropyron)),蓼科(Polygonaceae)(大黄属(Rheum)),蓼科(酸模属(Rumex)),鼠李科(Rosaceae)(鼠李属(Rhamnus)),鼠李科(翼核果属(Ventilago)),蔷薇科(Rosaceae)(草莓属(Fragaria)),蔷薇科(樱桃属(Prunus)),虎耳草属(Saxifragaceae)(岩白菜属(Bergenia)),苦木科(Simaroubaceae)(鸦胆子属(Bruceae)),苦木科(Simaroubaceae)(美洲苦木属(Picramnia))和葡萄科(Vitaceae)(葡萄属(Vitis))都将用于相同的目的,并以与本公开的虎杖相同的方式分离。

[0220] 细菌培养制备

[0221] 胰蛋白酶大豆琼脂(TSA)用于体外琼脂扩散试验。通过将7.5g胰蛋白酶大豆肉汤

(TSB)与3.75g琼脂在250mL去离子(DI)水中混合,而在500mL锥形瓶中制备培养基。用棉塞和箔覆盖烧瓶顶部,将悬浮液在121℃下高压灭菌1小时。将液体琼脂充分混合的等分试样(20mL)用无菌血清移液管(25mL)转移至靠近本生灯(Bunsen burner)的100×15mm培养皿中并使其固化。平均琼脂深度为4mm。将板标记,用石蜡膜密封,并在使用前于4℃下保存1至2天。

[0222] 胰蛋白胍大豆酵母提取物杆菌肽琼脂(TSY20B),用于变形链球菌回收的选择性培养基,用于评价临床样品(体内小鼠口腔PDI)(Schaeken,MJ J Dent Res 1986,65,906-908)。通过在250mL蒸馏水中混合6.75g TSB,4.5g琼脂,2.5g酵母提取物和50g蔗糖,在微波中加热至沸腾,用棉塞和箔覆盖瓶顶,然后在121℃高压灭菌1小时,在500mL锥形瓶中制备培养基。在熔融琼脂略微冷却后,加入11.2μL杆菌肽(50mg mL<sup>-1</sup>),并将热琼脂倒入100×15mm培养皿中。标记琼脂板并用石蜡膜密封并在使用前于4℃下储存1至2天。

#### [0223] 细菌制剂

[0224] 使用无菌技术,通过使用无菌环将一半的冻干小丸转移到含有2mL脑心浸液培养基(BHI,0xoid)的培养管中而增殖一小瓶变形链球菌(*S.mutans* Clarke,ATCC 25175,标号NCTC 10449),并通过旋转轻轻混合。将培养管较松地封盖并置于37℃培养箱中24小时。第二天,制备10个系列稀释液(10<sup>-1</sup>至10<sup>-8</sup>),然后使用无菌环将每个稀释液的0.1mL等分铺展于新鲜的BHI琼脂板(3.8%BHI)上,然后使盖倾斜进行干燥,然后倒置于37℃的培养箱中过夜。验证菌落生长的纯度,并通过离心(5000rpm,5分钟)将细菌培养管传代培养,小心倒出上清液至废弃物中,并用5mL新鲜培养基代替。通过将500μL变形链球菌培养物的等分转移至含有500μL无菌70%甘油水溶液的无菌1.5mL微量离心管中而制成变形链球菌的冷冻原液。通过短暂涡旋而混合管并随后将其储存于-80℃下。

[0225] 通过将50μL冷冻的变形链球菌转移到含有500μL胰蛋白胍大豆肉汤(TSB,Fluka 22092)的无菌微量离心管中而制备初级生长菌落板,并通过涡旋充分混合溶液。使用四区画线方法将50μL的等分试样施加至TSA板(在琼脂中的3%TSB),使盖倾斜进行干燥并培养过夜。第二天早晨验证初级生长培养物的纯度,然后将1至2个菌落转移到含有500μLTSB的无菌微量离心管中,并通过上下吸液和涡旋充分混合。通过将50μL该混合物转移至温热的TSA板,四区画线,使其如前干燥并在37℃下储存而制备次级生长菌落板。次日早晨再次验证次级生长培养物的纯度,并随后用于琼脂扩散分析。这些实验使用了通常少于一周龄的次级生长板的变形链球菌菌落。次级生长板每7至12天更换一次。

[0226] 为了使所有实验的起始细菌浓度标准化,构建了代表近似细菌浓度的McFarland硫酸钡浊度标准的标准曲线。按照公开的方案(Isenberg H.Clinical Microbiology Procedures Handbook 2007update,2nd edition,American Society Microbiology,2004)制备McFarland硫酸钡标准物0.5,1,2,3,4和5。这些标准分别代表约1.5,3,6,9,12,15×10<sup>8</sup>细菌mL<sup>-1</sup>。记录1cm光程石英比色杯中625nm下的6种硫酸钡标准品的吸光度值(Biochrom Libra S12UV/Vis分光光度计,Biochrom Ltd.),制成标准曲线,将点拟合成直线。趋势线方程用于确定所有的实验细菌接种物。

#### [0227] 琼脂扩散测试方法

[0228] 通过将菌落从室温次级生长板转移到含有5mL无菌蒸馏水的无菌15mL锥形管中而制成变形链球菌接种物,并通过涡旋充分混合内容物。读取625nm处的吸光度并根据

McFarland硫酸钡标准曲线计算近似浓度。然后调节浓度以匹配McFarland标准0.5 (约 $1.5 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>)。将300 $\mu$ L等分的接种物用无菌棉签涂抹器 (MedPro, Code.018-426) 均匀铺展于每个TSA板上而使细菌菌苔均匀生长。将盖倾斜干燥约30min, 并将样品递送至钻孔的孔中或纸盘上。

[0229] 钻孔琼脂扩散 (BHAD)

[0230] 使用5/3/4"无菌巴氏吸管的末端在TSA接种板中制成钻孔的孔洞 (直径5.5mm, 深度4mm)。通常, 钻孔有5个孔洞, 中心的一个孔洞用作对照, 其余四个处于中心的对照孔洞周围的对称正方形。各孔洞接收20 $\mu$ L的样品。

[0231] 纸盘琼脂扩散 (PDAD)

[0232] 纸盘由Whatman滤纸1 (GE Healthcare Life Sciences, Code.1001 090) 用冲孔机制成, 得到直径为6mm的圆盘。纸盘用乙醇灭菌, 然后在使用前使其干燥。使用无菌镊子, 将纸盘以与BHAD类似的模式轻轻放置于接种的TSA上。一旦适当排布好纸盘, 将10 $\mu$ L样品施加于每个盘上。

[0233] 用于体内研究的提取物的琼脂扩散测试

[0234] 根据此前描述的BHAD或PDAD方法将样品递送至一式两份制备的TSA板 (暗处和光照的板), 每个具有0.5McFarland钡标准接种物 ( $1.5 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>)。样品包含: 3mg mL<sup>-1</sup>氯己定, 去离子水, 5%PG, 3mg mL<sup>-1</sup>在5%丙二醇中的本公开的虎杖提取物, 和11mg mL<sup>-1</sup>在5%丙二醇中的本公开的虎杖提取物。使具有样品的板在室温下培养30分钟, 随后用幻灯片投影仪 (Bell&Howell, 型号310LA) 在距离投影仪底部16.2cm的距离处照射15分钟, 产生100J cm<sup>-2</sup>的光剂量。在此辐照期间, 将暗处的板保持避光相等的一段时间。在光照或黑暗处理后, 将板在37 $^{\circ}$ C培养过夜并在第二天早上分析。

[0235] 基于琼脂扩散浓度的测试

[0236] 使用0.1, 1, 10, 100mg mL<sup>-1</sup>在DMSO中的提取物进行本公开的虎杖提取物的浓度基分析测试。包括5mg/mL氯己定和仅DMSO的对照。根据BHAD和PDAD方法, 用1.0McFarland标准 ( $3.0 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) 制备两份TSA板 (暗处和光照的板)。将光照板用16个冷白灯泡 (Osram Sylvania Inc., Code.F8T5-CW) 在光反应器 (Luzchem Research Ltd., 型号LZC-4V) 中照射1小时而产生35J cm<sup>-2</sup>的光剂量。在此辐照期间, 将暗处的板保持避光一段相等的时间。在光照或黑暗处理后, 将板在37 $^{\circ}$ C下培养过夜并在第二天早上分析。

[0237] 琼脂扩散对照试验

[0238] 市售Listerine, Oro-Clense和1%TB与DMSO中的10mg mL<sup>-1</sup>和100mg mL<sup>-1</sup>虎杖提取物进行基于浓度的试验研究中描述的琼脂扩散分析。递送至光板的总光剂量为36J cm<sup>-2</sup>。

[0239] 浮游培养物上的微量肉汤稀释法

[0240] 根据微孔稀释法, 对在96孔微量滴定板上生长的悬浮培养物测定最小抑制浓度 (MIC) 和杀菌浓度 (MBC) (Sahin, F. et. al. J Ethnopharmacol 2003, 87, 61-65. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard, 6th Edition. Wayne, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2004)。通过将100 $\mu$ L稀释的悬浮液 (测定中的最终浓度为 $5 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup>) 和100 $\mu$ L在高达5%丙二醇水溶液中稀释的提取物组合在测定中产生0.01至50mg mL<sup>-1</sup>的最终提取物浓度, 而由次级生长板制备接种悬浮液。平行等同地制备两个微量滴定板, 其中一个在37

℃下预培养30min后在光反应器中接受一个小时用灯泡的 $35\text{J cm}^{-2}$ 的光处理。此后,将光处理的和暗处的板在 $37\text{℃}$ 下培养16小时,而随后使用TSA琼脂板根据Miles和Misra滴液计数技术对每个孔的 $\text{CFU mL}^{-1}$ 进行定量(Miles,A.A,et.al.J Hyg (Lond) 1938,38,732-749)。

#### [0241] 体外人牙齿研究

[0242] 根据由文献(Cho,Y.S.et.al.Biotechnol Bioprocess Eng 2010,15,359-364)改编的方案评价由虎杖提取物和光对人牙齿上生物膜形成的抑制。简言之,将人的牙齿在烛罐( $5\% \text{CO}_2$ )中在 $37\text{℃}$ 下在接种变形链球菌的BHI肉汤(在24孔微量滴定板中)中保持4天。第2-4天每天3次,每次3分钟,取出牙齿并置于盐水(对照)或虎杖提取物( $5\text{mg mL}^{-1}$ )中。在此短暂培养期后,将一半样品用 $100\text{J cm}^{-2}$ 的光照射,而另一半保持于黑暗中,然后将光和暗处的样品都返回到接种的BHI肉汤溶液中。在第5天,制备样品进行成像,并在第6天,通过扫描电子显微镜(SEM)检查牙齿表面上的生物膜形成(Somayaji,K.et.al.Iran Endod J 2010,5,53-58)。

[0243] 用 $0.5\text{M}$ 磷酸钾缓冲液( $\text{pH } 7.2, 5\text{℃}$ )温和洗涤开始SEM分析的样品制备。然后将牙齿在 $2\%$ 的戊二醛中在 $5\text{℃}$ 下固定20小时,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤15分钟,并在 $5\text{℃}$ 下在 $1\%$  (w/v) 四氧化钨中后固定12小时。然后用PBS洗涤样品并用渐增等级的丙酮(30,60,80和 $100\%$ ) (每等级浸泡10分钟)脱水。在储存于 $100\%$ 乙醇中后,将样品转移至液态 $\text{CO}_2$ 中,并在临界点干燥器中进一步干燥,然后使用Polaron SC7670溅射涂覆机(100s,18-20uA)安置和涂覆金钼的层。使用JOEL JSM-5900LV SEM以高达 $3500\text{X}$ 放大率检查牙齿表面的生物膜形成的证据。

#### [0244] 实施例1:虎杖提取物的抗生素活性

[0245] 使用胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)扩散测试(表10;图7)探测虎杖提取物的暗和光介导的抗生素活性。对 $300\mu\text{L}$ 金黄色葡萄球菌或变形链球菌接种物( $3 \times 10^8 \text{CFU mL}^{-1}$ )测试提取物在DMSO中 $0.01\%$ 至 $10\%$ 的的渐增浓度。在30分钟的培养期后,将一块板用光照射1小时而产生 $35\text{J cm}^{-2}$ 的总光剂量,同时将暗处的板避光。在另外的16小时培养期后测量抑制区,并指示细菌对这些提取物强度和条件的敏感程度。在最低浓度 $0.01\%$ 至 $0.1\%$ 下,虎杖提取物在黑暗中对金黄色葡萄球菌或变形链球菌没有显示出明显的抗生素活性。然而,光活化的虎杖提取物对两种测试的细菌物种分别对两种浓度产生8和12mm的抑制区。 $1\%$ 的虎杖提取物强度对两种细菌均产生9mm的黑色抑制区,而 $10\%$ 分别对金黄色葡萄球菌和变形链球菌产生16和15mm的黑色抑制区。 $1\%$ 至 $10\%$ 虎杖提取物溶液的光活化对于两种类型细菌分别产生了15和18mm的抑制区。值得注意的是,由最高浓度的虎杖提取物产生的抑制区与以40倍市售强度的广谱抗生素氯己定产生的抑制区相同。当针对市售氯己定产品Oro-Clense测试时,光活化的 $1\%$ 虎杖提取物同样有效,并且 $10\%$ 的虎杖提取物比氯己定显著更具活性(表11;图8)。相比之下,Listerine Zero在该试验中没有抗微生物作用。这些结果证明了光响应性虎杖提取物作为广谱抗生素的多功能性。重要的是,微生物的光动力灭活立即且无差别地作用,消除了挑战传统抗生素的抗性威胁。

[0246] 表10:随着虎杖提取物浓度增加在琼脂扩散测试中测定的抗生素敏感性抑制区;作为参考,氯己定的这些值(暗处和光照)对于两种细菌都是18mm。

[0247]

虎杖提取物 (mg·mL <sup>-1</sup> )	变形链球菌(mm)		金黄色葡萄球菌(mm)	
	黑暗	光照	黑暗	光照
0.1	0	8	0	8
1.0	0	12	0	12
10	9	15	9	15

[0248] 表11.对于1% (10mg mL<sup>-1</sup>) 虎杖提取物,1%甲苯胺蓝 (TB) 和两种市售产品在琼脂扩散测试中测得的抗生素敏感性抑制区。

[0249]

样品	变形链球菌(mm)		金黄色葡萄球菌(mm)	
	黑暗	光照	黑暗	光照
虎杖提取物 1%	10	16	9	15
TB 1%	15	15	15	16
Listerine Zero	0	0	0	0
Oro-Clense	15	15	14	14

[0250] 虎杖提取物对于金黄色葡萄球菌和变形链球菌的悬浮培养物也有效提供对微生物的光动力灭活(分别为图3a和3b)。在10 $\mu$ g/mL下,某些虎杖提取物对金黄色葡萄球菌没有基线抗微生物活性,而在相同浓度下,光活化产生了超过5log<sub>10</sub>的杀灭。在100 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>下,提取物表现为传统的抗生素,而光进一步放大了效果,破坏了所有细菌的大于99.9%。这一趋势也对变形链球菌有效。

[0251] 当用光活化时,虎杖提取物会抑制人牙齿表面上变形链球菌生物膜的形成(图4)。通过在四天的时间内将牙齿维持于接种有变形链球菌的脑心浸液(BHI)肉汤中,使生物膜形成于单个牙齿样品上。图4a上显示了未处理牙齿表面上的所获得的生物膜。用虎杖提取物处理三天(每天三次,三分钟),生物膜的形态学变化是明显的(图4b)。然而,在每次3分钟处理后使用光照(100J cm<sup>-2</sup>)活化虎杖提取物时,未形成生物膜。如图4c中所示,虎杖提取物作为强效光敏剂用于人牙齿上的微生物体外光动力灭活。

[0252] 实施例2:虎杖提取物相对于单组分分组的抗生素活性

[0253] 值得注意的是,虎杖提取物的光敏能力引起微生物的光动力学失活效应比提取物的任何一种可鉴定的组分大得多。蒽醌类或其糖基化衍生物可能是提取物的光敏效应的原因。当通过分馏分离时,大黄素产生最大的光动力效果,其次是大黄素甲醚。它们的糖苷,蒽醌B和A分别是无活性的。蒽醌类的市售样品以大黄素>大黄素甲醚>大黄酸的顺序产生微生物的光动力灭活。在一些虎杖提取物中,大黄素和大黄素甲醚的比例分别为0.51%-0.65%和0.24%-0.27%。在递送至变形链球菌(或金黄色葡萄球菌)涂覆的TSA板的虎杖提取物(40 $\mu$ g)的琼脂扩散测试中,微生物抑制区的光动力灭活在其最大直径处大到35-37mm,并平均为24-28mm,且当提取物预先暴露于光处理时未减小(图9;表12)。

[0254] 表12.虎杖提取物与在提取物中发现的其各自比例的两种组成组分(大黄素和大黄素甲醚)的光活化抗微生物活性的比较。

[0255]

样品	变形链球菌(mm)	金黄色葡萄球菌(mm)
	光	光
提取物	26 (36) <sup>a</sup>	26 (36) <sup>a</sup>
大黄素 0.001% <sup>b</sup>	7.0	8.5
大黄素甲醚 0.001% <sup>b</sup>	无活性	8.5
以相对百分比合并的标准 <sup>b,c</sup>	8.5	8.5

[0256] <sup>a)</sup> 在最大距离处测量的抑制区域; <sup>b)</sup> 提取物中发现的百分比组成; <sup>c)</sup> 提取物中发现的以各自百分比组成混合在一起的所使用的标准物(大黄素, 大黄素甲醚, 大黄酸, 虎杖苷, 白藜芦醇, 葱醌苷B)。

[0257] 相比之下, 大黄素和大黄素甲醚标准品在其来自一些提取物的相应重量百分比下测试, 大黄素为0.20-0.26 $\mu\text{g}$ 且大黄素甲醚为0.10-0.11 $\mu\text{g}$ , 产生了对金黄色葡萄球菌8至9mm微生物抑制区的光动力灭活。大黄素对变形链球菌产生了7mm微生物抑制区的光动力灭活, 而大黄素甲醚却无活性。当大黄素、大黄素甲醚和大黄酸标准物以其在提取物中的相对比例混合并以相同方式测试时, 合并的微生物的光动力灭活效应导致仅约8至9mm的抑制区。在这个实施例中, 虎杖提取物比作为商业标准的组成成分的混合物有效大于四倍。此外, 混合的标准物的微生物的光动力灭活效应反映了最具活性的组分一起的光动力灭活作用, 表明虎杖提取物中的整体微生物光动力灭活作用并非仅是单种光敏剂能力的线性组合。

[0258] 芪类、白藜芦醇和虎杖苷不能放大商业测试的葱醌类的光敏能力。与大黄素组合的白藜芦醇并未改变大黄素的光活性。以其在一些虎杖提取物中天然存在的浓度(250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大黄素20 $\mu\text{L} = 5\mu\text{g}$ ; 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的白藜芦醇20 $\mu\text{L} = 6\mu\text{g}$ )一样的浓度和更高的浓度(2mg/mL  $\times$  20 $\mu\text{L} = 40\mu\text{g}$ )测得的大黄素抑制区(有或无白藜芦醇)为10mm。此外, 白藜芦醇在黑暗中是无活性的而在实验条件下具有光活化作用(图14)。

[0259] 实施例3: 体内小鼠口腔PDI

[0260] 采用雄性CD-1小鼠模型确定使用虎杖提取物和光的微生物的光动力灭活是否可以有效地减少口腔中的细菌负荷。处理后立即测量采用30 $\text{Jcm}^{-2}$ 的光照5分钟的光敏化对变形链球菌活力的影响(图5)。小鼠接受以下处理之一: (i) 载体, 黑暗; (ii) 载体, 光; (iii) 3mg  $\text{mL}^{-1}$ 提取物, 黑暗; (iv) 3mg  $\text{mL}^{-1}$ 提取物, 光; (v) 11mg  $\text{mL}^{-1}$ 提取物, 黑暗; 或 (vi) 11mg  $\text{mL}^{-1}$ 提取物, 光。组(i)和(ii)是对照组, 而这两组之间没有显著差异(牙龈 $p = 0.16$ , 而舌 $p = 0.25$ )。在没有光的存在下, 在虎杖提取物处理时细菌活力降低, 但是这些降低在最高提取物浓度下仅为约2 $\log_{10}$ 。当将虎杖提取物与光联合使用时, 以3mg  $\text{mL}^{-1}$ 达到另一1-2 $\log_{10}$ 的杀灭, 而所有变形链球菌的全部破坏发生于11mg  $\text{mL}^{-1}$  ( $p < 0.001$ )下。采用11mg $\text{mL}^{-1}$ 提取物的黑暗和光处理的差异为约5 $\log_{10}$  ( $p < 0.001$ )。这些趋势适用于两种治疗领域。重要的是, 没有溃疡或炎症的宏观证据(图10)。在组织学评价时, 即使采用最高浓度的虎杖提取物和光也没有炎症浸润的证据(图11)。

## [0261] 体内小鼠口腔研究

[0262] 在该研究中使用了30只约10周龄且体重为25-30g的雄性CD-1小鼠(Charles River Laboratories International Ltd., St-Constant, Canada)。按照加拿大动物护理委员会(Canadian Council of Animal Care)制定的规定饲喂小鼠。根据以下方案在PDI处理之前将小鼠接种一周。在第1天,它们接受1%蔗糖(Sigma-Aldrich)水代替正常水。在第2至7天,它们接受含有 $1 \times 10^6$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ 变形链球菌接种的1%蔗糖水溶液。在第8天处理后,所有小鼠放入带有新鲜切片和干净水的灭菌笼中。在PDI处理当天,小鼠进一步接种10 $\mu\text{L}$ 含有 $2 \times 10^9$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ 变形链球菌的水,施加于舌的前牙区和上颌切牙上方的牙龈区。上述地点是本研究的处理区域。

[0263] 在该研究中使用两种不同浓度的虎杖提取物作为光敏剂:在作为载体的5%丙二醇水溶液中的3和11mg  $\text{mL}^{-1}$ 溶液。照射源是一种内部制造的装置,由3个广谱白色发光二极管(LED)组成,具有 $0.1 \text{ W cm}^{-2}$ 的组合输出功率。在施加期间将灯放置于距小鼠的口部开口2cm处,在此距离处产生 $30 \text{ J cm}^{-2}$ 的光剂量。

[0264] 30只小鼠随机放入以下6个类别之一中,每组5只小鼠:载体黑暗,载体光照,3mg  $\text{mL}^{-1}$ 提取物黑暗,3mg  $\text{mL}^{-1}$ 提取物光照,11mg  $\text{mL}^{-1}$ 提取物黑暗,11mg  $\text{mL}^{-1}$ 提取物光照。小鼠随机每次处理一次。使用0.1mL IM(肌肉内)注射氯胺酮和甲苯噻嗪(含每种 $50 \text{ mg kg}^{-1}$ 的混合物)将其麻醉。一旦样本完全麻醉,将其以仰卧位定位于专用底座上。使用弹性带打开嘴(将带围绕两组门齿放置)以暴露舌头和上切牙周围的上牙龈区域,从而进入口腔。首先,将含有 $2 \times 10^9$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ 变形链球菌的10 $\mu\text{L}$ 水递送至上部牙龈区域,然后递送10 $\mu\text{L}$ 样品(载体,3mg  $\text{mL}^{-1}$ 载体中的提取物,或11mg  $\text{mL}^{-1}$ 载体中的提取物)。在舌的前背部区域重复该过程。这些处理区域同时用 $30 \text{ J cm}^{-2}$ 的LED光照射5分钟或在黑暗中保持5分钟。使用无菌牙髓纸尖(Dia Dent, 尺寸40)从每个处理区域采集细菌拭子。将两个纸尖施加于每个指定区域60秒之后放入装有0.5mL无菌Ringers-Peptone的螺旋盖小瓶中进行进一步分析。然后将样本从松紧带上松开并置于干净的笼子中以从麻醉中恢复。细菌样品在3小时内进行处理。

[0265] 处理3天后,将样本麻醉并以与治疗当天类似的方式擦拭细菌,然后通过颈椎脱臼法处死。立即从样本中取出舌和牙龈(包括上颌区域的切牙),并将其固定于0.5mL的Bouin氏溶液(Sigma-Aldrich)中进行组织学分析。

[0266] 使用Miles和Misra滴液计数技术(Miles, A.A. et al. J Hyg (Lond) 1938, 38, 732-749)对细菌集落形成单位(CFU)的数量进行定量。将TSY20B(变形链球菌特异性琼脂)板标记成对应于待分析样品的 $10^0$ 至 $10^{-7}$ 的稀释度的八个区段。未稀释的 $1 \times$ 样品用无菌水系列稀释( $7 \times 10 \times$ 系列稀释液)。对于每个样品组稀释液,将20 $\mu\text{L}$ 滴的未稀释样品或 $10 \times$ 稀释样品(共8个)按浓度递增( $10^{-7}$ 至 $10^0$ )的顺序施加于TSY20B板的八个标记区段中的每个。板保持直立晾干之后倒转并在 $37^\circ\text{C}$ 下培养18-24小时。随后观察每个区段的生长情况。计数显示出2至50个菌落的区段,并使用方程式1计算每mL原始样品的平均CFU。

[0267] 方程1

$$[0268] \quad \text{CFU mL}^{-1} = \frac{(\text{菌落数})}{(\text{体积}) \times (\text{稀释度})}$$

[0269] 使用学生t检验进行细菌计数的统计分析。各个处理组之间的差异在p值 $< 0.05$ 时

被认为是显著性的。

#### [0270] 组织学评价

[0271] 舌头和牙龈组织样本(包括上颌骨区域的门牙)在4℃下在固定剂(Bouin's溶液)中冷藏2天。通过小心除去溶液,用新鲜的0.5mL Bouin's溶液代替,并使小瓶在室温下放置24小时,而制备牙龈样品,包括门牙用于脱钙。将溶液除去,并将样品在缓慢流动的水中洗涤(3×10分钟)。然后将样品小心转移至含有1mL 10%EDTA水溶液(pH 7.36)的无菌24孔微孔板中。每2天更换10%EDTA溶液15天的时间,并将样品置于70%乙醇中至少24小时。在Bouin's溶液中2天后,将舌组织用70%乙醇洗涤一次,并保持于70%乙醇中至少24小时。将样品脱水至100%乙醇,在甲苯中清洗并用石蜡包埋,用苏木精-伊红(H&E)染色进行组织学评价。

#### [0272] 组织样品的脱水和染色

[0273] 将样品如下脱水:组织样品在85%乙醇中悬浮2小时,然后除去溶剂。然后组织样品在95%乙醇中悬浮1小时,然后除去溶剂。然后将组织样品在100%乙醇中悬浮0.5小时,然后除去溶剂。然后将组织样品悬浮于甲苯中1小时,除去溶剂,并将组织样品重悬于甲苯中。1小时后,除去溶剂,将组织样品在真空下在60℃下悬浮于热液体石蜡中20分钟,然后除去石蜡。石蜡悬浮和去除重复两次。最后,将样品包埋于石蜡中并使其在室温下硬化。将石蜡包埋的组织安装于木块上并使用薄片切片机(American Optical Company 820)以6μm厚度切片并转移至标记的聚-L-赖氨酸涂覆的载玻片。为了H&E染色,首先用2次二甲苯更换将石蜡溶解。两次酒精更换除去二甲苯,并用水彻底冲洗载玻片以重新水合细胞和组织元件。将载玻片浸于苏木精染色剂中,在自来水中冲洗,并在70%乙醇中脱色。施加曙红的醇溶液,并将载玻片在几次酒精更换中冲洗以除去所有微量的水。使用两次二甲苯更换而清除组织,并随后施用聚苯乙烯封装剂(Permount<sup>®</sup>)并用玻璃盖玻片覆盖。在显微镜分析之前,使载玻片干燥至少24小时。

#### [0274] 实施例4:抗癌光动力疗法

##### [0275] HL-60细胞培养

[0276] 在补充有20%FBS(PAA Laboratories,A15-701)的RPMI 1640(Mediatech Media MT-10-040-CV)中在37℃,5%CO<sub>2</sub>下培养HL-60人早幼粒细胞白血病细胞(ATCC CCL-240)并根据标准无菌操作程序每周传代3至4次。培养物开始于在25cm<sup>2</sup>的组织培养瓶中200,000个细胞mL<sup>-1</sup>,并当生长达到800,000个细胞mL<sup>-1</sup>时传代培养以避免与长时间高细胞密度相关的衰老。根据需要通过在250mL Millipore真空过滤器(stericup)(0.22μm)中合并RPMI 1640(160mL)和FBS(40mL,预先等分并热灭活)和过滤而以200mL部分制备完全培养基。

##### [0277] HL-60细胞活力测试

[0278] 在96孔微量滴定板(Corning Costar,Acton,MA)中一式三份地进行实验,其中沿外围的外部孔含有200μL pH 7.4磷酸盐缓冲盐水(PBS),具有2.68mM氯化钾,1.47mM磷酸二氢钾,0.137M氯化钠和8.10mM磷酸氢二钠,以使样品孔中的蒸发最小化。将在对数期生长的HL-60细胞(约8×10<sup>5</sup>个细胞)以50μL等分转移至装有温培养基(25μL)的内部孔中,并置于37℃,5%CO<sub>2</sub>水套培养箱(Thermo Electron Corp.,Forma SeriesII,3110型,HEPA Class 100)中1小时以平衡。将钆化合物用PBS连续稀释并预热之后将25μL等份的适当稀释物加入到细胞中并在37℃,5%CO<sub>2</sub>下培养1或16小时的药物-光照间隔。未处理的微孔板保持于黑

暗中的培养箱中,而PDT处理的微空板使用190W BenQ MS510高射投影仪用光(400-700nm, 27.8mW cm<sup>-2</sup>)照射。照射时间为1小时而产生约~100Jcm<sup>-2</sup>的光剂量。将暗处和PDT处理的微板以预热的温度再培养48小时,将10μL等份的Alamar Blue试剂(Life Technologies DAL 1025)加入到所有样品孔中并使其在37℃,5%CO<sub>2</sub>下培养15至16小时。细胞活力基于Alamar Blue氧气化还原指示剂被活细胞代谢转化为荧光染料的能力进行测定。用Cytofluor 4000 荧光酶标仪(microplate reader)定量荧光,激发滤光片设定于530±25nm,而发射滤光片设定于620±40nm。根据方程2,使用Graph Pad Prism 6.0由剂量响应曲线的S形拟合计算细胞毒性和光细胞毒性的EC<sub>50</sub>值,其中y<sub>i</sub>和y<sub>f</sub>是初始和最终荧光信号强度。对于生长于对数期和相同传代数的细胞,EC<sub>50</sub>值在亚微摩尔状态下可重现至±25%内;低于10μM为±10%;而高于10μM为±5%。

[0279] 方程2

$$[0280] \quad y = y_i + \frac{y_i - y_f}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x) \times (\text{Hill slope})}}$$

[0281] 本发明的组合物通过光生ROS和其他反应性物质( )介导的非特异性瞬时作用机制杀死癌细胞。本领域技术人员将认识到,对于HL-60细胞描述的条件可以适用于其他类型的癌细胞系。本领域技术人员也会知道如何选择获取其他癌细胞系的分析测试数据所需的合适培养基和通用技术。

[0282] 实施例5:虎杖提取物相对于其制剂的抗生素活性

[0283] 配制的提取物是有效的,一些制剂比未配制的提取物更有效。如)所示。

[0284] 图9:3,与未配制的虎杖提取物(11mm)相比,在琼脂扩散分析测试中,配制的虎杖提取物(表13)产生了更大的抑制区(13.5mm)。因此,提取物的光触发抗菌活性可以用专门配方进一步放大。

[0285] 表13.虎杖提取物制剂的实例

[0286]

配方代码	泡沫	日期	2016年8月9日		
目的	10011959-F2				
试验结果	样本生成				
	这个配方形成了稳固的泡沫				
			批量大小(g)		
			100		
成分	供应商	供应商代码	%	重量	
水	L.V Lomas	GY006FGARCAT	76.65	76.65	
甘油	ADM	177010	10.00	10.00	
山梨糖醇	Xylitol Canada		8.00	8.00	
木糖醇	David Michael & Co	18111	1.00	1.00	
天然香料	Quadra	Eversoft ULS-30S	0.35	0.35	
月桂酰谷氨酸钠			3.00	3.00	
<b>虎杖提取物 (生物活性剂)</b>			<b>1.00</b>	<b>1.00</b>	
总计 wt%			100.00	100.00	

[0287] 表14中描述了虎杖制剂的另一个示例性实施方式。

[0288] 表14. 虎杖提取物制剂的实例

[0289]

配方代码	泡沫				
目的	10011959-3				
试验结果	样本生成				
					批量大小(g)
					100
成分	供应商	供应商代码	%	重量(g)	重量(g)
水			79.55	397.75	79.55
甘油	L.V Lomas	GYC006FGARCAT	10.00	50.00	10.00
山梨糖醇	ADM	177010	8.00	40.00	8.00
木糖醇	Xylitol Canada		1.00	5.00	1.00
天然香料	David Michael & Co	18111	0.35	1.75	0.35
椰油醇硫酸钠	Colonial Chemical		1.00	5.00	1.00
生物活性剂			0.10	0.50	0.10
总计 wt%			100.00	500.0	100.00

[0290] 在其它示例性制剂中,成分的范围可以如表15中所述。表15. 示例性泡沫配方的成分范围。

[0291]

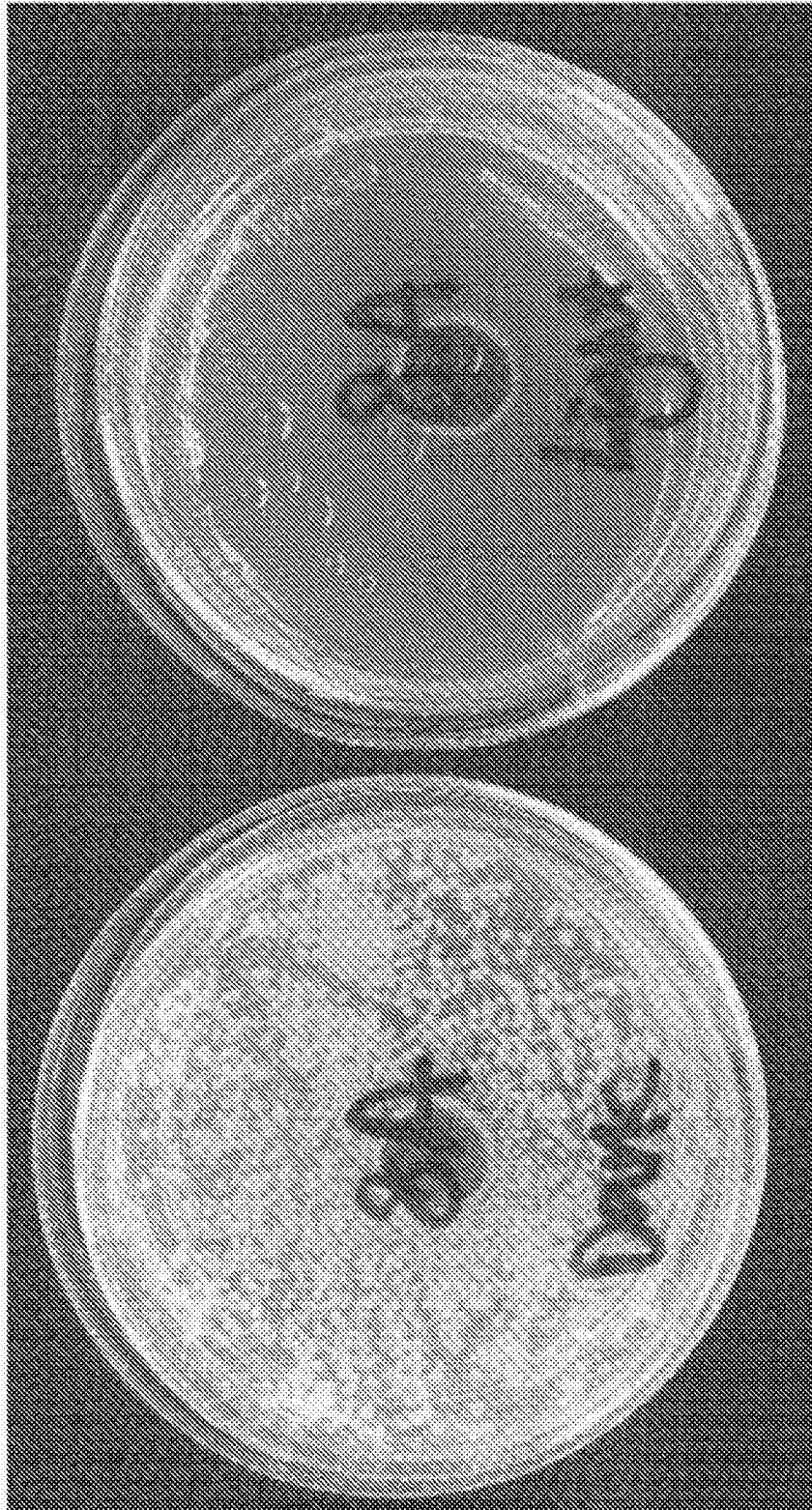
成分	可接受范围 (%)
水	余量至100%
甘油	9.0至11.0
山梨糖醇	7.0至9.0
木糖醇	0至2.0
天然香料	0至1.0
月桂酰谷氨酸钠	2.7至3.3
生物活性剂	0.1至1.5

[0292] 实施例6:虎杖提取物相对于纯大黄素的毒性

[0293] 在补充有10%FBS (PAA Laboratories, A15-701) 的伊斯柯夫改良杜尔贝科培养基 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (IMDM) 中培养附生的CCD-1064SK正常皮肤成纤维细胞 (ATCC CRL-2076), 在37°C, 5%CO<sub>2</sub>下培养, 并按照标准无菌操作程序每周传代2至3次。CCD-1064SK细胞在75cm<sup>2</sup>组织培养瓶中以200,000个细胞mL<sup>-1</sup>开始, 而在通过移除旧培养基并用杜尔贝科磷酸盐缓冲盐水 (DPBS 1X, Mediatech, 21-031-CV) 冲洗细胞单层一次而在生长达到550,000个细胞mL<sup>-1</sup>时进行传代培养, 随后用胰蛋白酶-EDTA溶液 (0.25%w/v胰蛋白酶/0.53mM EDTA, ATCC30-2101) 解离细胞单层。将完全生长培养基添加到细胞悬浮液中以使细胞的合适的等分试样转移到新的细胞容器中。根据需要通过在250mL微孔真空过滤器 (0.22µm) 中组合IMDM (225mL) 和FBS (25mL, 预等分并热灭活) 并过滤而以250mL的部分制备完全生长培养基。

[0294] 相对于黑暗中的大黄素, 虎杖提取物对正常皮肤成纤维细胞的毒性低3倍 (图12)。这种降低的暗处毒性是提取物相对纯大黄素作为光活性抗微生物剂的显著优势。

[0295] 本文引用的每个专利、专利申请和出版物的公开内容以其全部内容通过引证结合于本文中。虽然本发明已经参考具体实施方式进行了公开, 但显而易见的是, 本领域的其他技术人员可以设计出本发明的其他实施方式和变型, 而不脱离本发明的真实精神和范围。所附权利要求旨在解释为包括所有这些实施方式和等同变型。



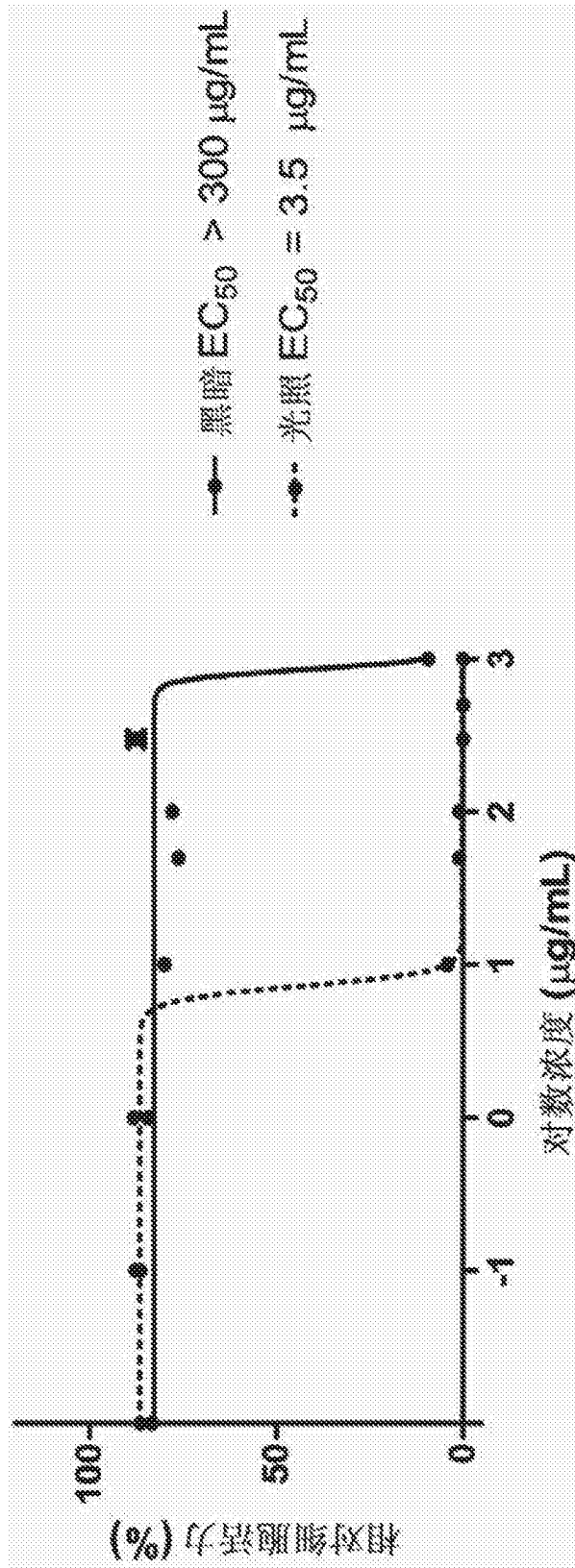


图2

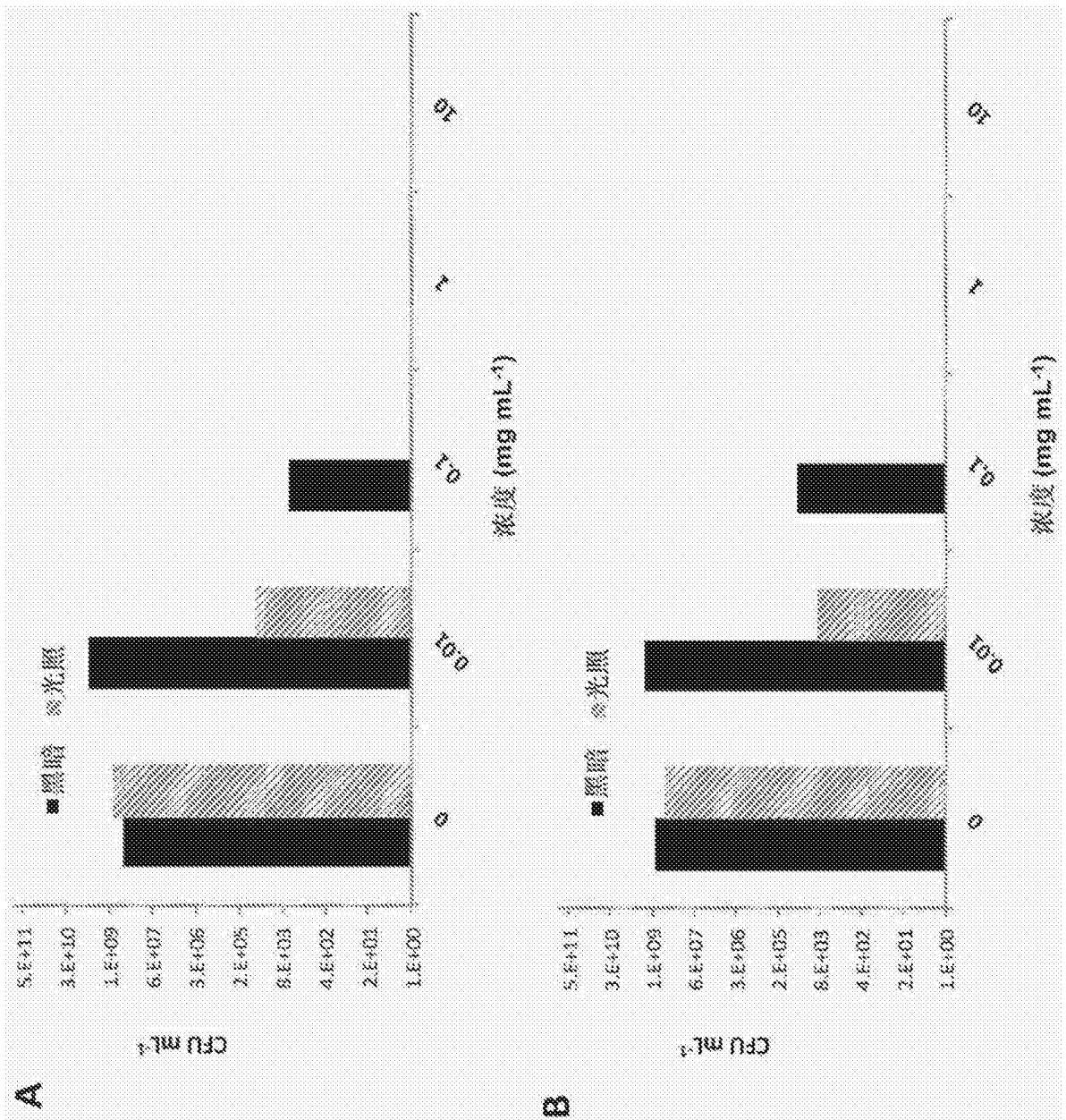


图3

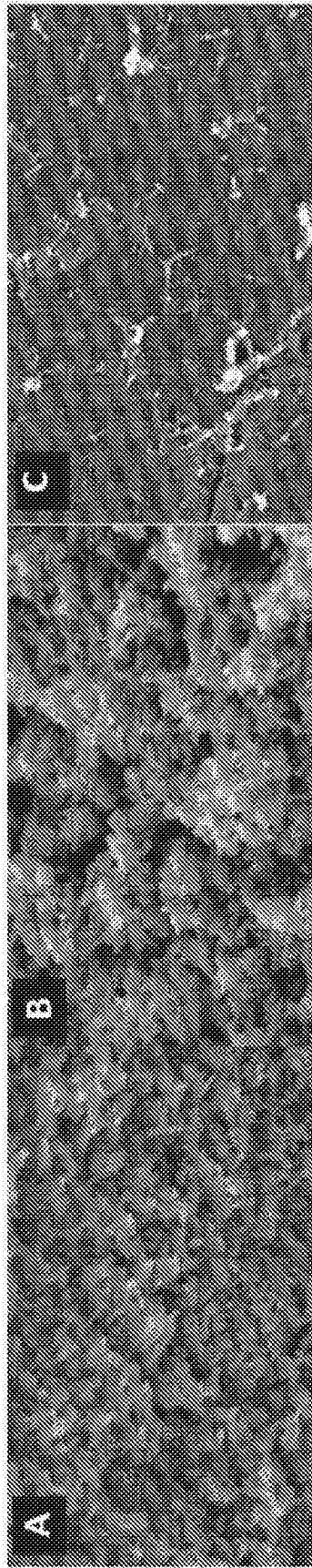


图4

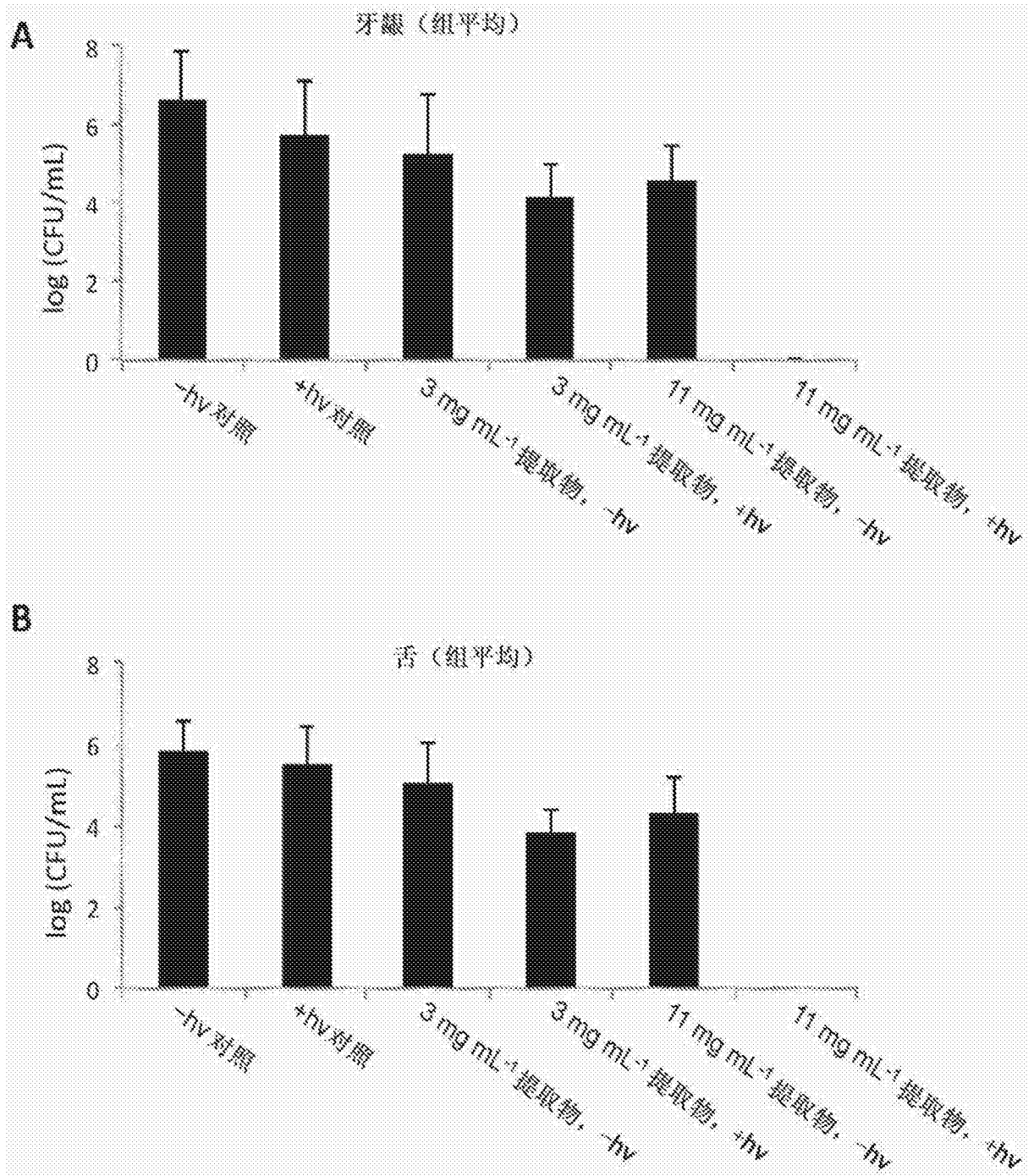


图5

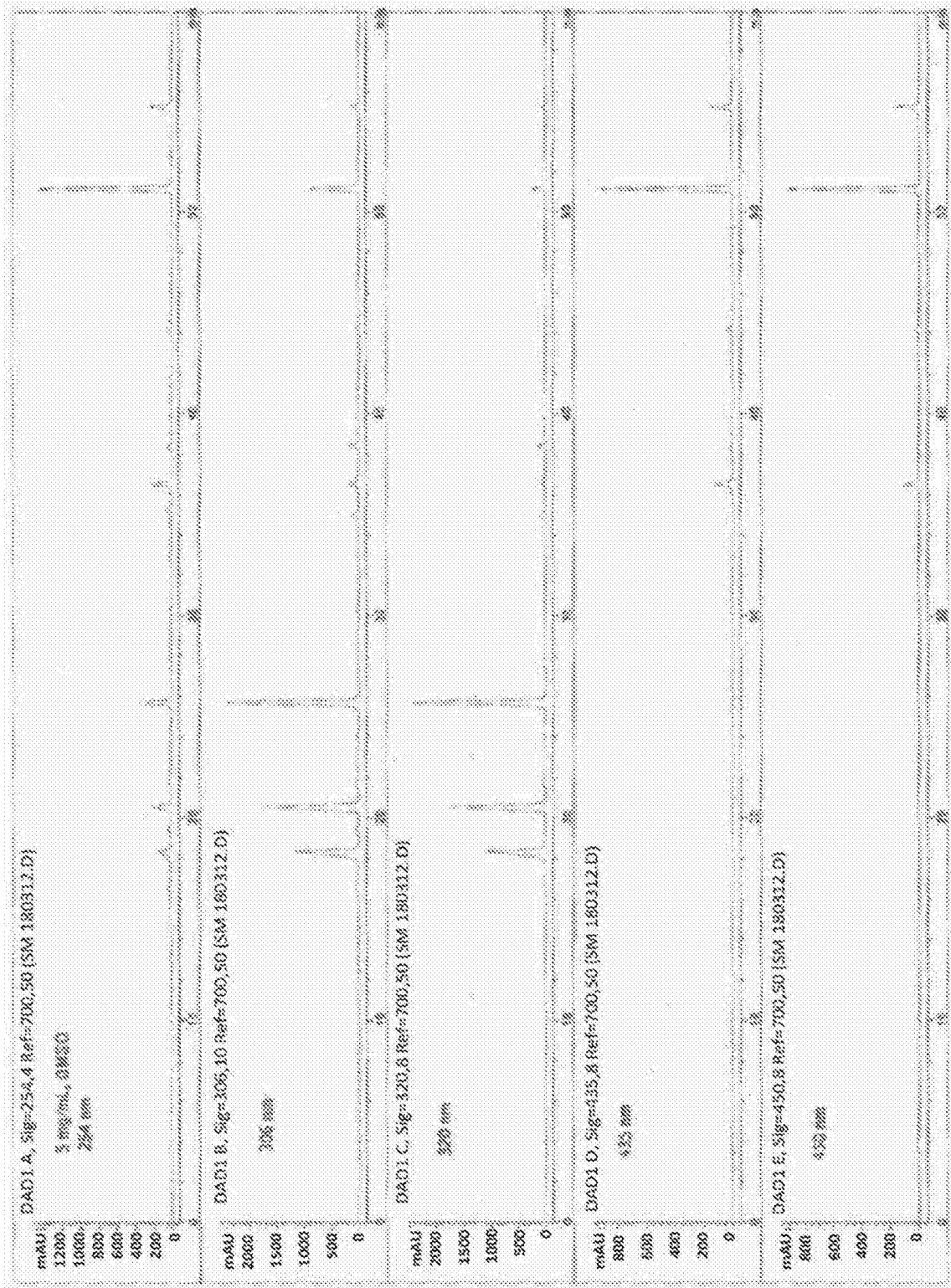


图6

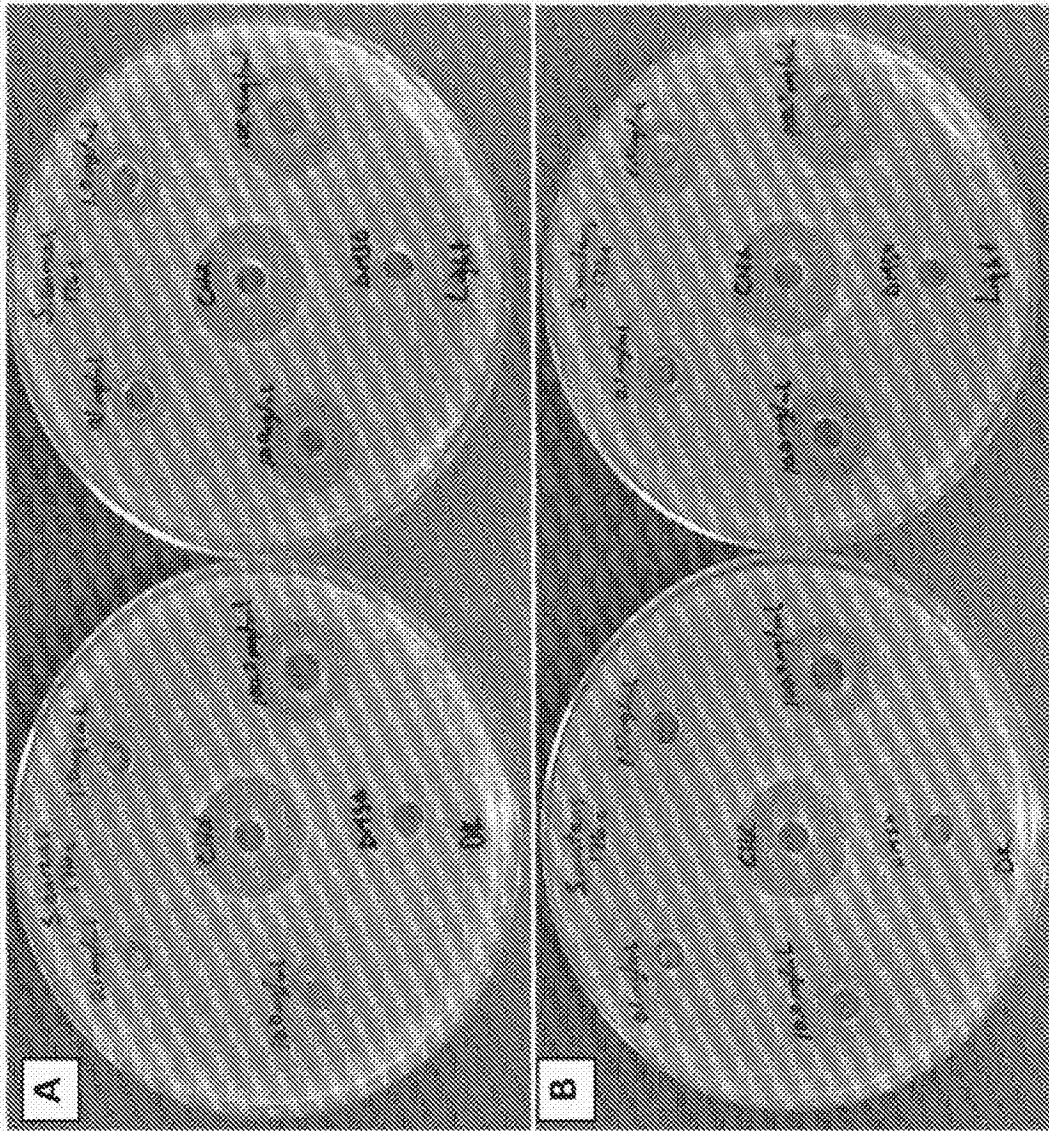


图7

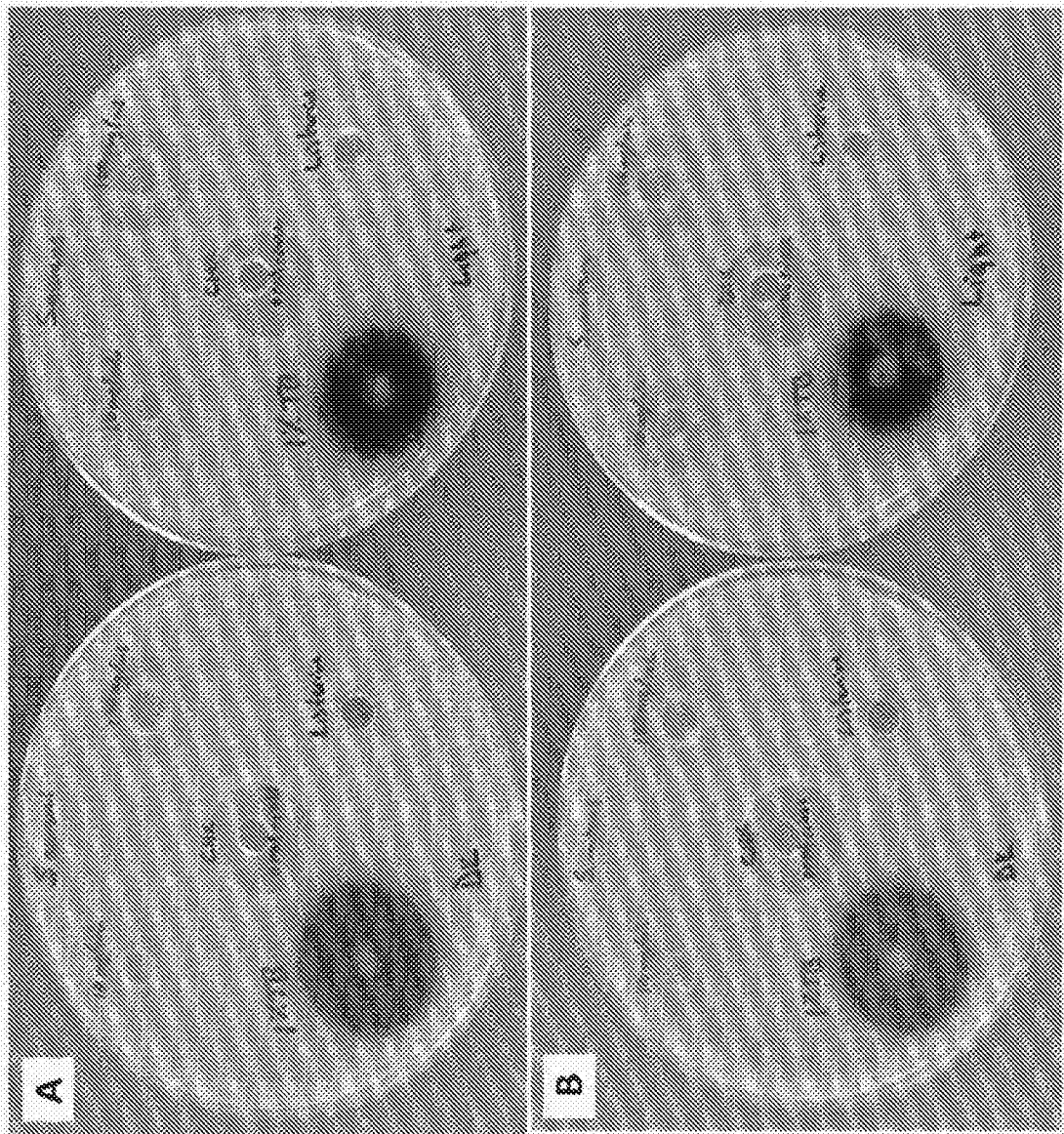


图8

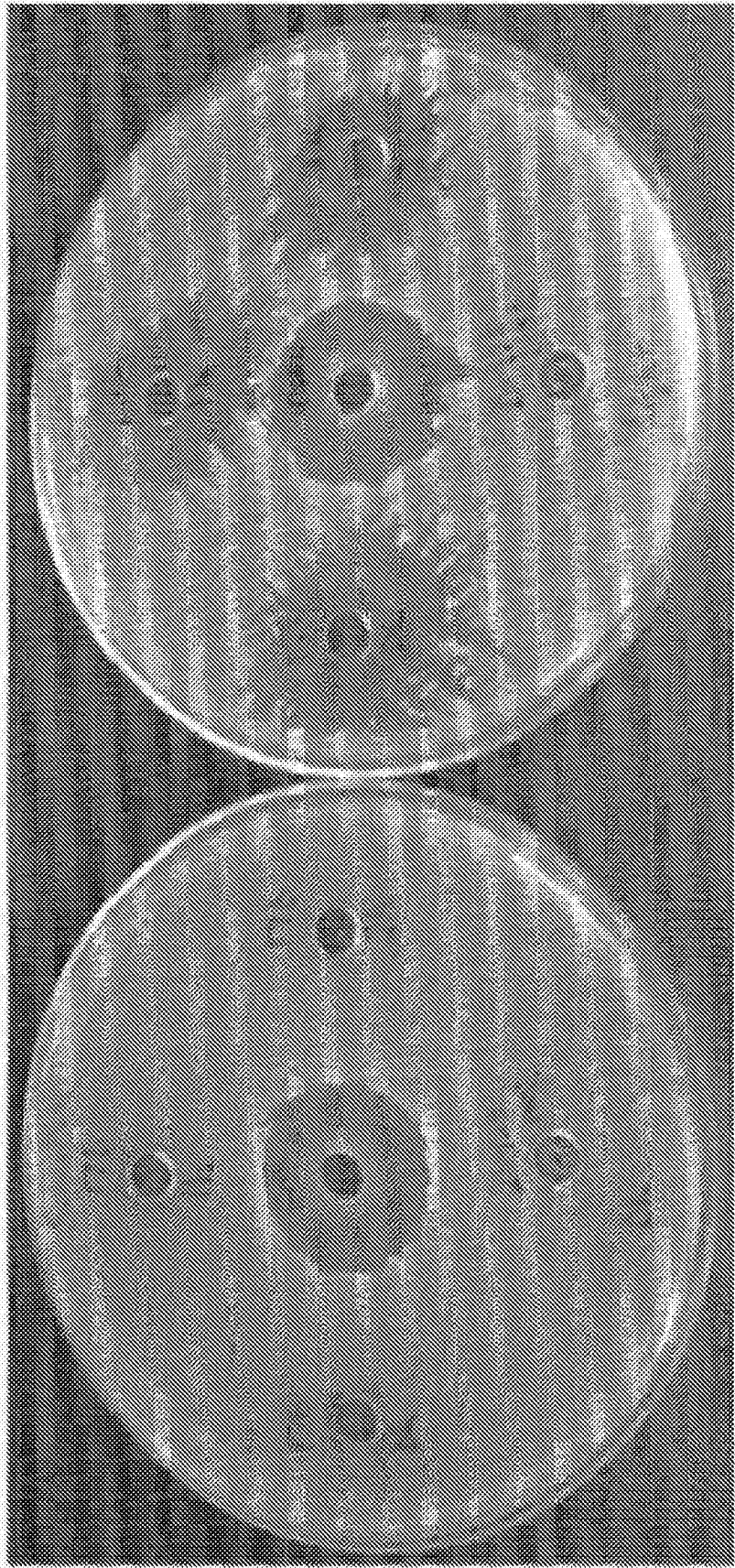


图9

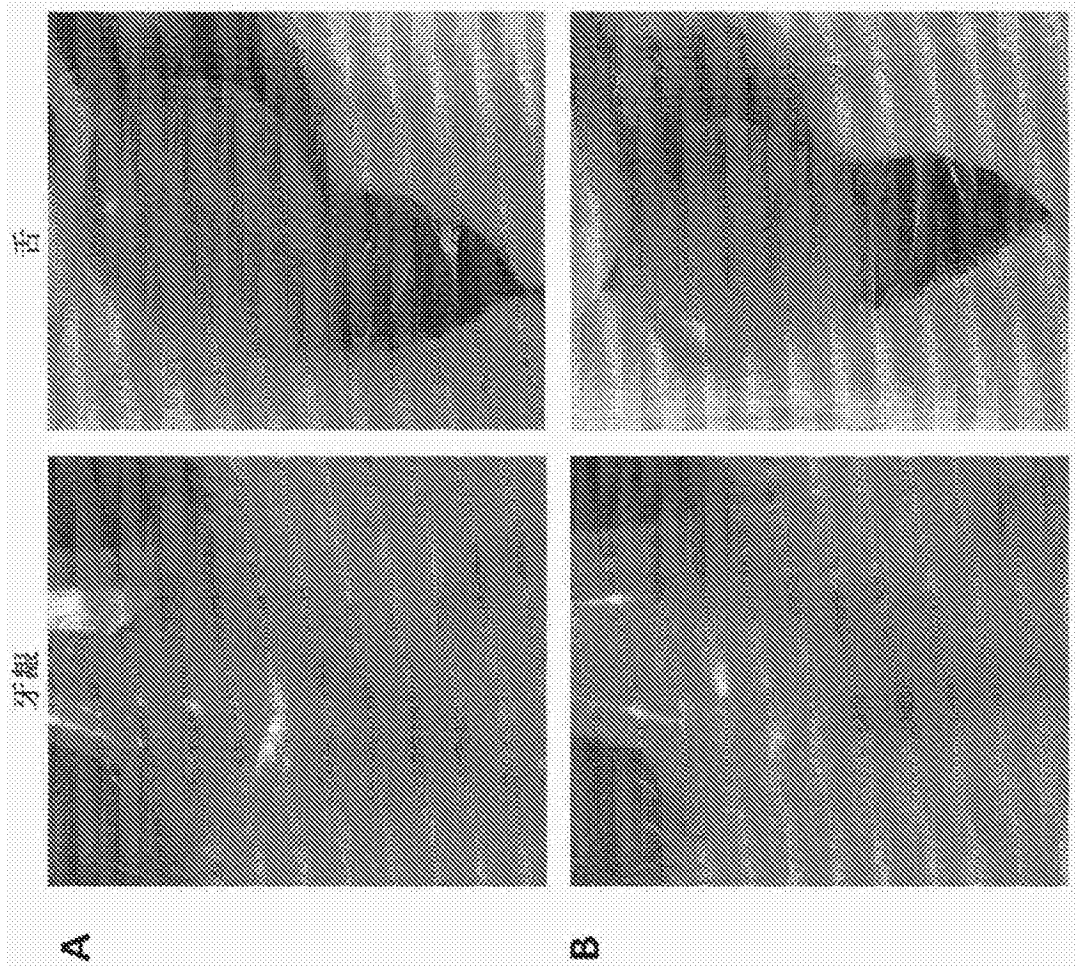


图10

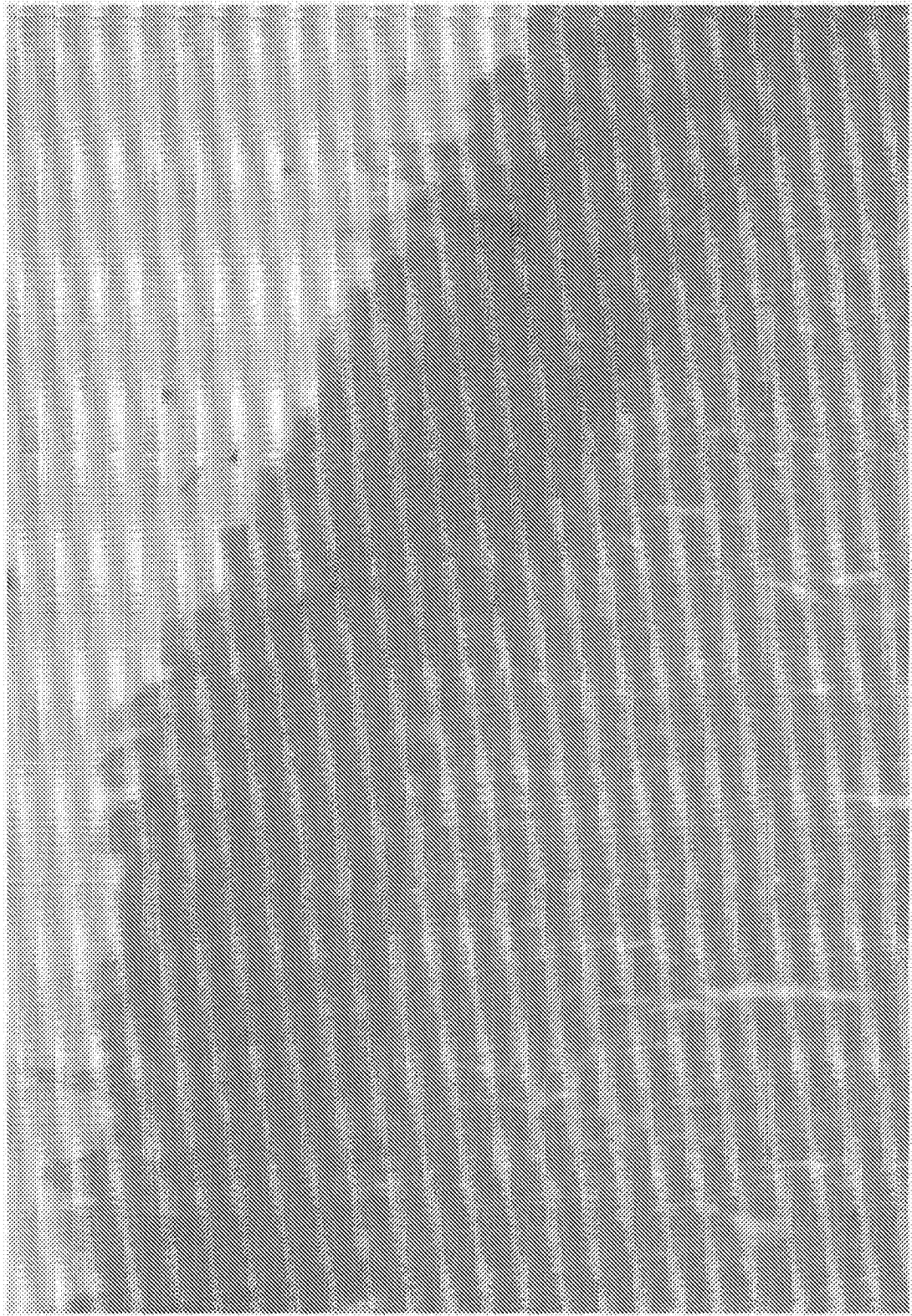


图11

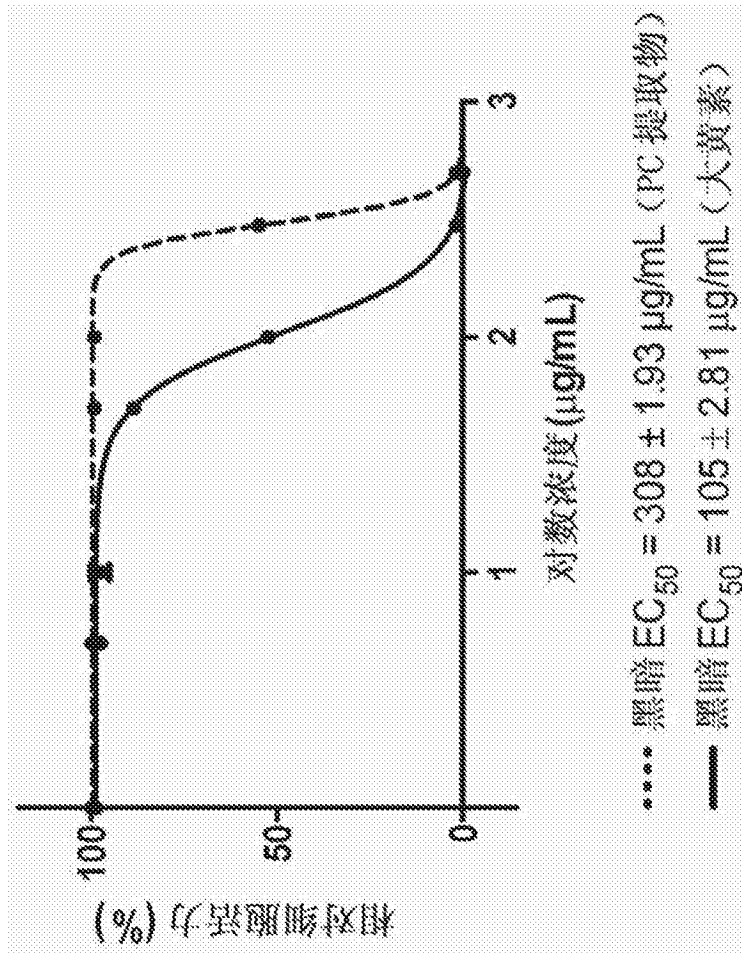


图12

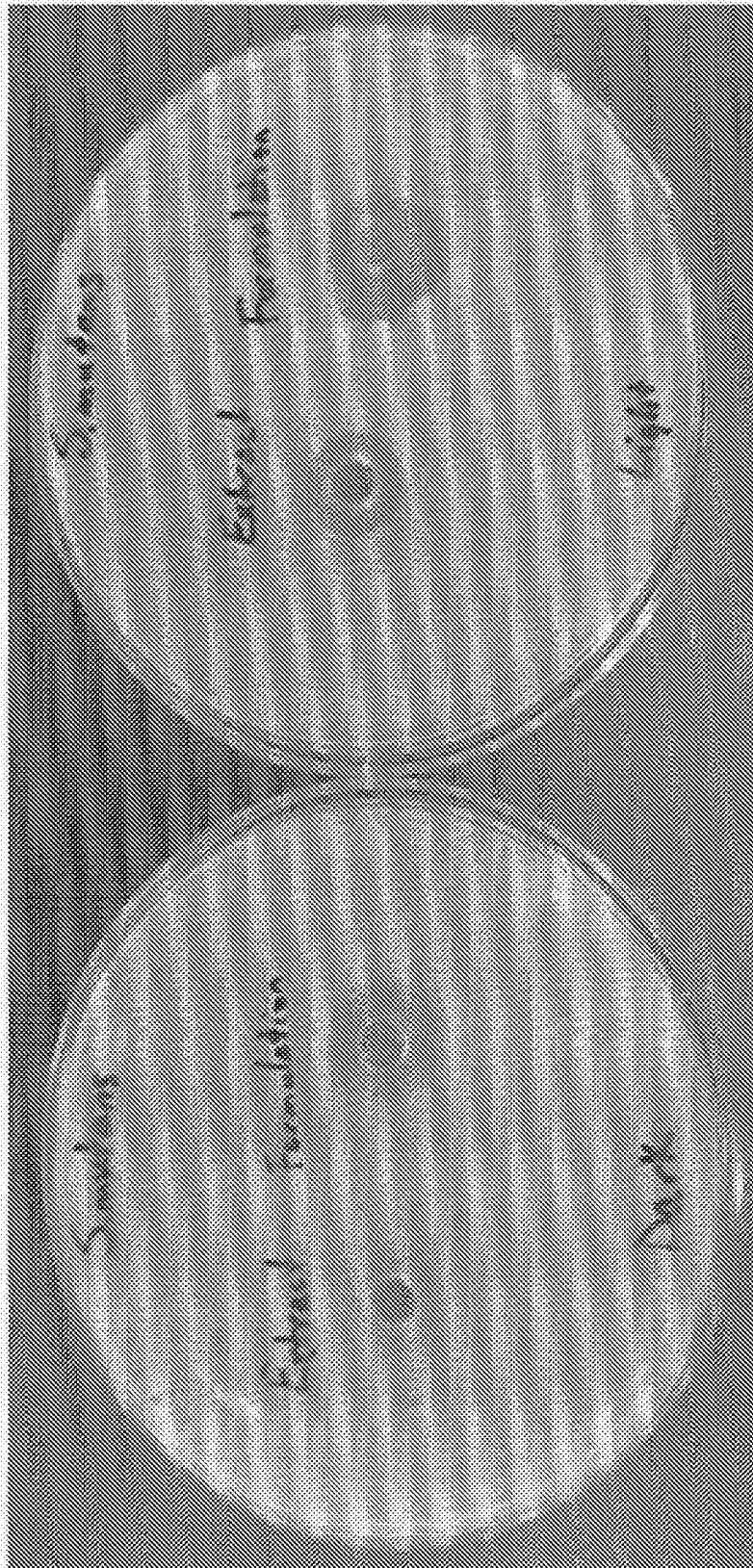


图13

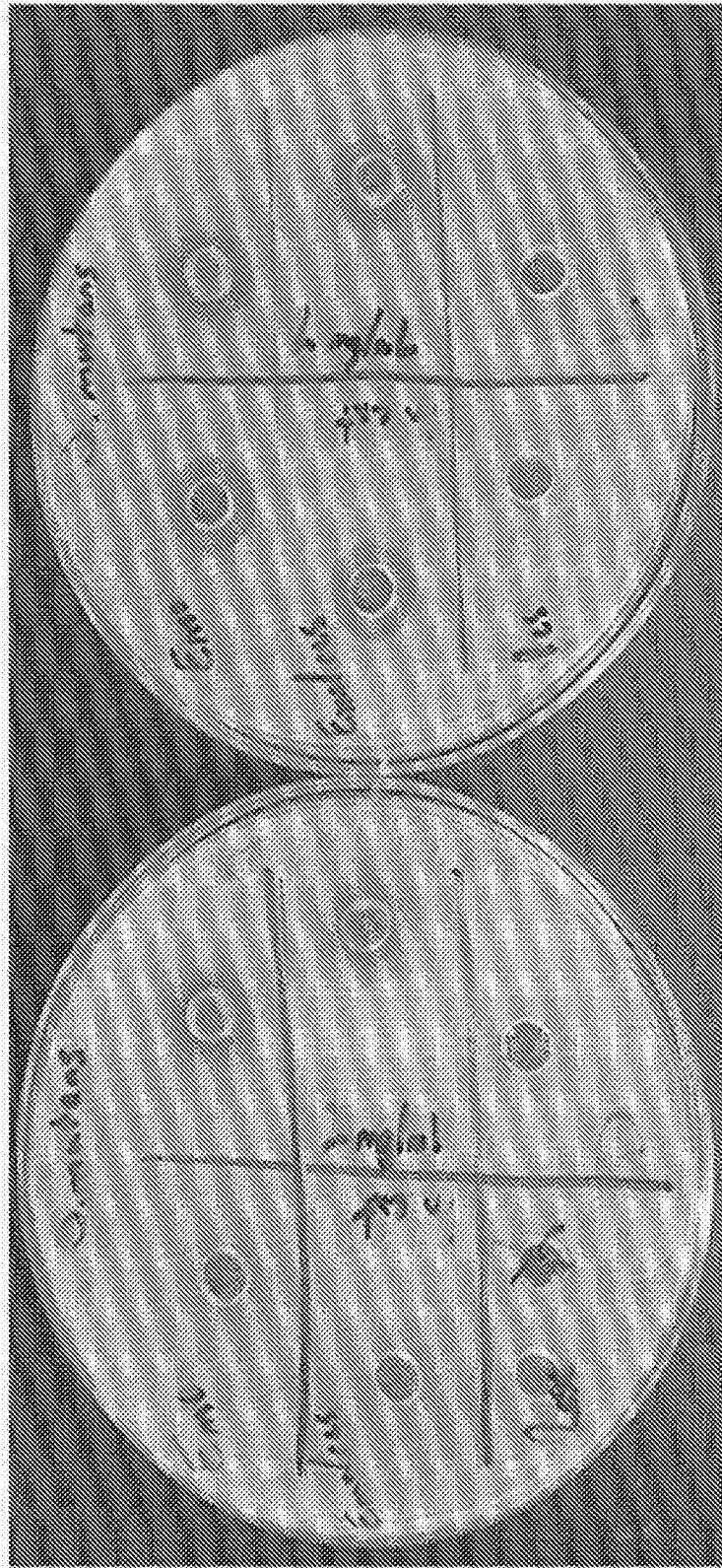


图14

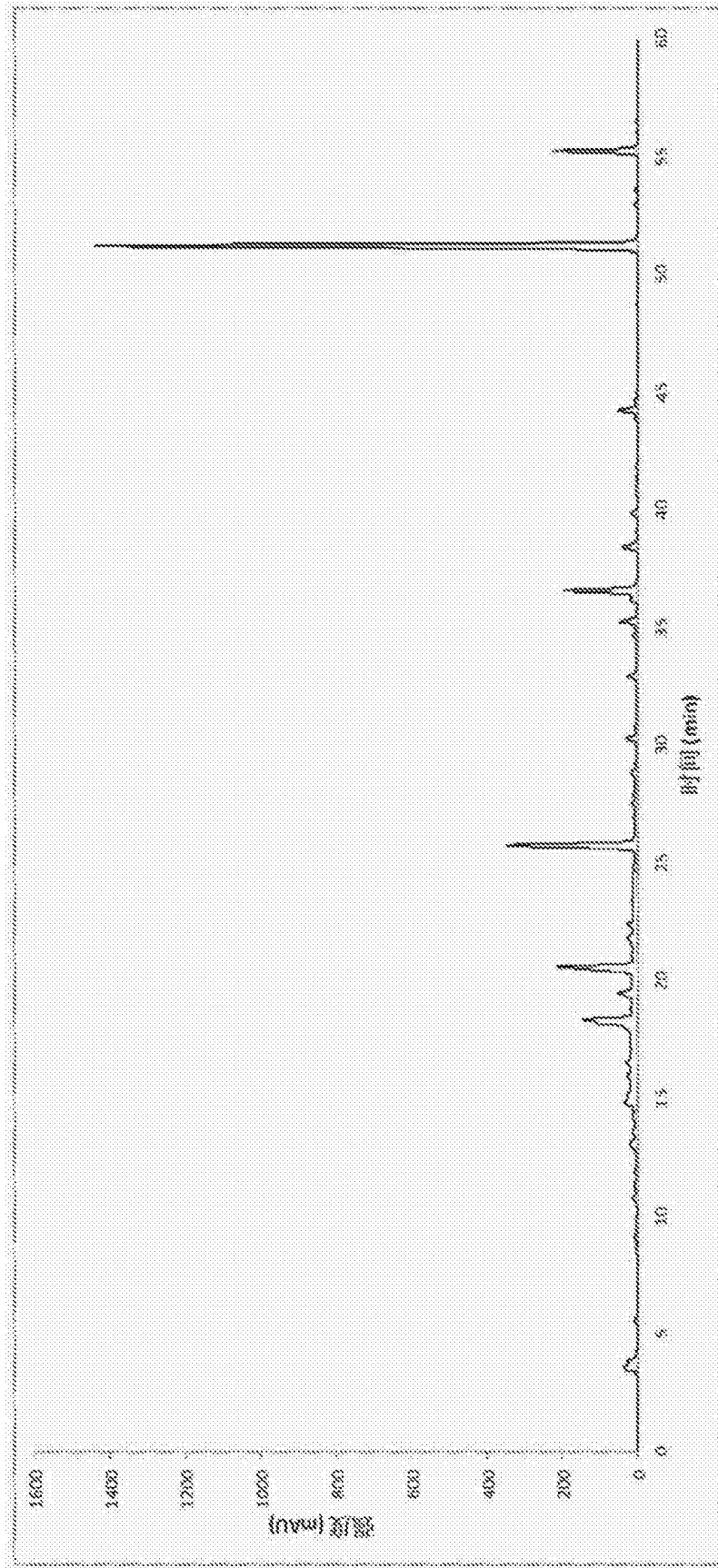


图15