[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[6]
A01N 1/02
A61K 31/41 A61K 31/50
A61K 31/70 A61K 31/335
A61K 31/495 C12N 5/00

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 97194759.7

[43]公开日 1999年6月9日

[11]公开号 CN 1219103A

[22]申请日 97.3.24 [21]申请号 97194759.7
[30]优先权
[32]96.3.29 [33]US [31]08/626,167
[86]国际申请 PCT/US97/04700 97.3.24
[87]国际公布 WO97/36479 英 97.10.9
[85]进入国家阶段日期 98.11.19
[71]申请人 克莱约生命公司
地址 美国佐治亚州
[72]发明人 K·G·M·布罗克班 S·戈尔茨坦
C·阿多马 J·K·舍尔顿
P·E·道森

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 孟八一 杨九昌

权利要求书2页 说明书40页 附图页数0页

[54]发明名称 抗生素混合物及其应用方法

[57]摘要

一种用于组织消毒的抗生素混合物,包含抗真菌剂两性霉素B和氟康唑和多种抗细菌剂。这些药剂以基本上抑制真菌和细菌生长,而同时基本上保持组织的生存力的有效量存在。一种将组织消毒的方法,包含将组织与本发明的抗生素混合物在基本上能抑制酵母和细菌生长,而又同时保持组织生存力的有效温度和持续时间下相接触。

ISSN1008-4274

权　利　要　求　书

1. 一种去除组织污染的抗生素混合物，它包含:

抗真菌剂两性霉素 B 和氟康唑;

以及多种抗细菌剂;

这些药剂以基本上能抑制酵母和细菌生长，而同时又基本上保持组织生存力的有效之量存在。

2. 权利要求 1 的抗生素混合物，其中抗细菌剂包括万古霉素和亚胺培南。

3. 权利要求 2 的抗生素混合物，其中抗细菌剂还包括萘替米星。

4. 权利要求 1 的抗生素混合物，其中两性霉素 B 浓度为约 0.3μg/ml 至约 2.0μg/ml，而氟康唑浓度为约 50μg/ml 至约 100μg/ml。

5. 权利要求 4 的抗生素混合物，其中抗细菌剂包括万古霉素和亚胺培南。

6. 权利要求 5 的抗生素混合物，其中万古霉素浓度为约 50μg/ml，而亚胺培南浓度为约 10-100μg/ml。

7. 权利要求 6 的抗生素混合物，其中两性霉素 B 浓度为 0.3μg/ml，氟康唑浓度为 100μg/ml，万古霉素浓度为 50μg/ml，而亚胺培南浓度为 96μg/ml。

8. 权利要求 5 的抗生素混合物，其中抗细菌剂还包括萘替米星。

9. 权利要求 8 的抗生素混合物，其中万古霉素浓度约为 50μg/ml，亚胺培南浓度为约 10－100μg/ml，而萘替米星浓度为约 20-50μg/ml。

10. 权利要求 9 的抗生素混合物，其中两性霉素 B 浓度为 1.0μg/ml，氟康唑浓度为 100μg/ml，万古霉素浓度为 50μg/ml，亚胺培南浓度为 96μg/ml，而萘替米星浓度为 50μg/ml。

11. 一种去除组织污染的方法，包含

将该组织与权利要求 1－10 任一项的抗生素混合物在基本上能抑制酵母和细菌生长，而又同时保持组织生存力的有效温度和持续时间条件下相接触。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述组织是心脏瓣膜、血管、心包或肌骨组织。

13. 权利要求 12 的方法，其中温度是 35-39℃，持续时间是 24-48 小时。

说　明　书

抗生素混合物及其应用方法

发明领域

本发明涉及用于移植的组织如心脏瓣膜等的去污，且同时保持组织的生存力的方法。本发明还涉及用于此方法的抗生素混合物(cocktail)。

发明背景

心脏瓣膜同种移植物的临床效能与移植中的瓣小叶成纤维细胞的生存力相互关联。参见，O'Brien等，《心外科杂志》[J. Card. Surg.]，2，(增刊)，153-167(1987)和 Stark，《胸心血管外科杂志》[J. Thoracic Cardiovasc. Surg.]，97，1-9(1989)。因此，贯穿整个处理程序，包括获取、转输、去污、冷冻、贮存、解冻和移植中，必须保持最高的生存力标准。

对于去污步骤而言，用于组织的微生物去污的抗生素混合物是已知的。具有地说，已知有几种含有多种抗细菌剂和一种抗真菌剂的抗生素混合物(两性霉素 B，或者偶尔是，nystatin)。参见，例如 Watts 等，《胸外科年鉴》[Ann. Thorac. Surg.]，21，230-36(1976)；Strichett 等，《病理学》[Pathology]，15，457-62(1983)；Armiger 等，《病理学》[Pathology]，15，67-73(1983)；Kirklin 和 Barratt-Boyes，《心外科》[Cardiac Surgery]，421-22(1986)；Heacox 等，于《心脏瓣膜同种移植物 1962-1987》[Cardiac Valve Allografts 1962-1987]，37-42 (Yankah 等编，1988)；Angell 等，《胸心血管外科杂志》[J. Thorac. Cardiovasc. Surg.]，98，48-56(1989)；Lange 和 Hopkins，于《使用同种移植心脏瓣膜的心脏重建》[Cardiac Reconstruction With Allografts Heart Valves]，37-63(Hopkins 编 1989)；USP 4,890,457；USP 4,695,536；和 PCT 申请 WO 92/12632。

两性霉素 B 被认为是可用的最有效的抗真菌剂。然而，业已发现，两性霉素 B 对患者的同种移植寿命负有责任的细胞有毒性，且因此，已从一些心脏瓣膜去污溶液中除去。参见，Hu 等，《心血管研究》[Cardiovasc. Res.]，23，960-64(1989)；Lange 和 Hopkins，于《使

用同种移植心脏瓣膜的心脏重建》[Cardiac Reconstruction With Allograft Heart Valves], 37-63(Hopkins 编 1989); Mcnally 和 Brockbank, 《医学工程与技术杂志》[J. Med. Engineer. & Tech.], 16, 34-38(1992)。结果，目前酵母菌污染导致大量心脏瓣膜被排斥。参见，Mcnally 和 Brockbank, 《医学工程与技术杂志》[J. Med. Engineer. & Tech.], 16, 34-38(1992)。

发明概述

本发明提供用于组织去污的抗生素混合物。该混合物包含：1）抗真菌剂两性霉素 B 和氟康唑；和 2）多种抗细菌剂。这些药剂是以基本上抑制酵母和细菌生长，而同时基本上保持组织生存力的有效量存在于混合物中。

本发明还提供一种去除组织污染的方法，它包含将所述组织与本发明抗生素混合物接触。该接触所用温度和持续时间要基本上能有效抑制酵母和细菌生长，而同时又基本保持组织的生存力。

由于使用本发明的抗生素混合物，结果许多先前因为酵母或细菌污染而被排斥的组织现可以用于移植。鉴于可用于移植的组织十分稀少，因此这是一项明显的成就。

发明详述

使用“有效量”一词是指每一种药剂以充分的浓度存在，这样混合物基本上能抑制酵母和细菌生长，但又基本上不降低被污染的组织的生存力。这些量可以通过描述于下文的本领域已知的标准微生物测试和生存力试验的剂量响应测试来确定。优选各药剂以能杀灭由组织分离的酵母和细菌之量存在于混合物中。

“基本上抑制”是指用混合物去污的组织上的酵母和细菌生长达到完全抑制的至少 90%，优选至少 95%，最优选 99%。“完全抑制酵母和细菌生长”是指在组织用混合物处理之后，酵母和细菌生长不能用标准的微生物化验检测出来。

生存力可以用多种方式确定。然而，优选将组织与放射性标记的氨基酸一起培育，并且氨基酸进入蛋白质的结合作用通过计数每单位组织的每分钟衰变(DPM)来监测。因此，“基本上保持生存力”定义为，用混合物处理的组织的结合相当于未用混合物处理组织之结合的每单位组织每分钟衰变值的至少约 85%.

用于本发明混合物的抗真菌剂是两性霉素 B 和氟康唑。组合使用这二种抗真菌剂基本上抑制酵母的生长，而同时基本上保持用这些药剂处理的组织的生存力。鉴于有报道说两性霉素 B 对组织的毒性(参见上述背景部分)，此结果是出人意外的。

两性霉素B和氟康唑的适合的浓度可以通过描述于下文的本领域已知的标准微生物测试和生存力试验的剂量响应测试来确定。单独的两性霉素 B 或氟康唑在基本上保持组织生存力的剂量下基本上不抑制酵母的生长，但这二种抗真菌剂的组合却抑制酵母的生长。的确，两性霉素 B 和氟康唑的组合具有协同抗酵母活性的发现是出人意外的（见实施例 14 和 15）。

用于心脏瓣膜消毒的抗生素混合物中的两性霉素B的优选浓度是约 0.3μg/ml 至约 2.0μg/ml。用于心脏瓣膜消毒的抗生素混合物中的氟康唑的优选浓度是约 50μg/ml 至约 100μg/ml。

对实际可用于本发明的抗细菌剂作出选择，使得抗细菌剂的组合将可以有效地抗广谱细菌，包括格兰氏阴性、格兰低阳性、需氧和厌氧细菌。此外，选择抗细菌剂，使得这些药剂的组合有效地抗常见于污染被处理组织的细菌。许多这样的细菌是已知的(例如，葡萄球菌科、链球菌科和丙酸杆菌科)和其它可以通过标准微生物试验鉴定的细菌(参见，例如下文实施例 19)。因此，属于二或多个种类的广谱的抗细菌药剂是优选的。最后，抗细菌剂的组合必须基本上不降低被处理的组织的生存力。

优选的多种抗细菌剂选自下列种类：头孢菌素类、糖肽类、氨基糖苷类、林可酰胺类、β-内酰胺类和利福霉素类。更优选的抗细菌剂的组合包含万古霉素和亚胺培南，且最优选的是万古霉素、亚胺培南和萘替米星。对于心脏瓣膜的去污而言，优选的是 50μg/ml 万古霉素，约 10-100μg/ml 亚胺培南和约 20-50μg/ml 萘替米星的组合。

亚胺培南是β-内酰胺抗生素。它对大多数需氧格兰氏阳性和格兰氏阴性细菌和大多数厌氧格兰低阳性和格兰氏阴性细菌有活性。

万古霉素是三环状糖肽。它对许多格兰氏阳性菌包括葡萄球菌科、链球菌科、肠球菌科、梭菌属和棒杆菌属有活性。它对格兰氏阴性菌无活性。

萘替米星是氨基糖苷类，且对大多数需氧格兰氏阴性菌和一些需

氧格兰氏阳性菌有效。萘替米星对大多数链球菌和大多数厌氧细菌无活性。

对抗菌剂的浓度作选择，使之至少 4 至 8 倍于通过标准微生物敏感性测定确定的对靶体细菌的最小抑制浓度。这些参数的范围内，使用如下文所描述的那些标准微生物试验和生存力试验对组织进行剂量响应测试，依据此结果，可以对抗细菌剂的浓度进行调节。

由上文可见，优选的本发明抗生素混合物含有两性霉素 B、氟康唑、万古霉素、亚胺培南和萘替米星。对于心脏瓣膜消毒而言，含有约 0.3-1.0μg/ml 两性霉素 B、约 50-100μg/ml 氟康唑、约 50μg/ml 万古霉素、约 10-100μg/ml 亚胺培南和约 20-50μg/ml 萘替米星的抗生素混合物是优选的。最优选的是下列混合物：

1.0μg/ml 两性霉素 B，
100μg/ml 氟康唑，
50μg/ml 万古霉素，
96μg/ml 亚胺培南，和
50μg/ml 萘替米星。

本发明还提供将组织消毒的方法，所述的方法包含将组织与本发明抗生素混合物接触。用此方式，可以将各种组织去污，包括心脏瓣膜、心包、脉管和肌与骨胳连接组织。如本文中所使用的，术语“肌与骨胳连接组织”包括诸如腱、韧带和半月板等组织，但不包括骨等组织。

将该组织与抗生素混合物在能基本上抑制酵母和细菌生长，而同时保持组织生存力的温度下接触，并持续一段时间。这些时间和温度可以按本领域已知的方法经验地确定。我们发现，心脏瓣膜可以通过将它们与本发明的抗生素混合物一起在 35-39℃的温度下温育 24-48 小时而有效地去污。

实施例

实施例 1

此实施例描述四种抗生素混合物在心脏瓣膜组织上的试验。

A. 心脏瓣膜获取和准备

当从负责与捐献者家庭联系的器官获取机构得到同意的信息之时，将发现不适合用于同种移植移植术的心脏瓣膜收集来作为实验之

用。如 USP 4,890,457 中所述，解剖心脏瓣膜。

B. 消毒

将心脏瓣膜小叶切成二半，每一半均在 4ml 的 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO)中温育，上述培养基用 25mM 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲，并含有 10%的胎牛血清(下文称作“溶液 B”)和下述类型和浓度的抗生素。所述抗生素包括具有下列配方的被称作混合物 B 和混合物 C 的二种抗菌剂组合物:

混合物 B:

62μg/ml 利福平

57μg/ml 萘替米星

114μg/ml 万古霉素

136μg/ml 头孢氨噻

136μg/ml 林可霉素

混合物 C:

12μg/ml 亚胺培南

50μg/ml 万古霉素

此外，试验了二种其它的混合物。除了它们还含有 100μg/ml 氟康唑之外这些混合物与混合物 B 和 C 相同。

制备利福平的母液时，将 600mg 消毒利福平溶解于 10ml 消毒水中。利福平由 Merrell Dow(商品名: RIFADIN)获得。

100mg/ml 萘替米星硫酸盐的溶液由 Schering-Plough 获得(商品名: NETROMYCIN)用作该抗菌母液。

万古霉素的母液通过将 500mg 消毒万古霉素盐酸盐溶解于 10ml 消毒水中而制得。万古霉素盐酸盐由 Eli Lilly & Co.获得(商品名: VANCOCIN HCl)。

头孢氨噻母液通过将 2.0 克消毒头孢氨噻钠溶解于 3ml 消毒水中而制得。头孢氨噻钠由 Hoechst-Roussel 获得(商品名: CLAFORAN)。

300mg/ml 林可霉素盐酸盐的溶液由 Upjohn 获得(商品名: LINCOCIN)，用作所述的抗生素的母液。

亚胺培南的母液通过将 20ml 消毒盐水加入到由 Merck & Co.获得的 250mg 瓶装亚胺培南(商品名: PRIMAXIN)而制备。

最后，2mg/ml 氟康唑的溶液由 Pfizer Roerig 获得(商品名:

DIFLUCAN)，用作其母液。

将适合量的每一种母液加入至溶液 B 中，给出用在混合物 B 和 C 和混合物 B 和 C 加氟康唑中的终浓度。

实验 1：成对的半个小叶用混合物 B 或混合物 B 加氟康唑处理。类似地，将成对的半个小叶用混合物 C 或混合物 C 加氟康唑处理。所有的瓣膜小叶半在 37℃下于抗生素混合物中温育 48 小时，之后冷冻保存。

实验 2：再次使用成对的半个小叶。一半用作新鲜对照，一半即刻用 ^{3}H-甘氨酸标记，确定小叶成纤维细胞的生存力(参见下文)。每一小叶另一半于混合物 B 或混合物加氟康唑中温育。类似地，另一对的一半用作新鲜对照，且另一半于混合物 C 或混合物 C 加氟康唑中温育。抗生处理的小叶在 37℃下在抗生素混合物中温育 48 小时，之后冷冻保存。

B. 冷冻保存

在用抗生素混合物处理完毕后，将各瓣膜小叶半块包装，冷冻保存和如 USP 4,890,457 中描述的贮存，对冰冻程序作些改进，使单个的瓣膜小叶半块可以以约-1℃/分钟的冷却速率在~1.6 ml 冷冰保存溶液中保存。使用 1.8ml Nalge 冷冻管来盛放此小叶组织。组织从+4℃至-80℃的冰冻程序大约需要 80-90 分钟。

C. 贮存

瓣膜小叶半块在解冻前，液氮冰箱中贮存至少二天，但不超过三周。

D. 解冻

通过将要解冻的瓣膜组织从液氮冰箱中取出，将瓣膜小叶半块解冻。尽可能快地将组织转移到 37℃的水浴中。当所有的冰溶化后(约 2 分钟)，将冷冻管转移到通风橱中，并向每一正在解冻的冷冻管中，将 4ml 室温的加 5%葡萄糖的泌乳林格注射液(D5LR)配入 5-ml 带有 snap 盖的试管(Falcon)。冰冻管的外部用 70%异丙醇淋洗，并在开盖前抹去所余物。使用消毒镊子，将小叶组织转移到含有 D5LR 的试管中。让此组织在 D5LR 中停留 5 分钟。

E. 生存力测试

组织生存力如下通过 ^{3}H-甘氨酸结合入蛋白质的测定来评价。将

解冻的瓣膜小叶半块放置于 snap 盖试管(Falcon)中，试管中含有添加 15μg/ml 抗坏血酸的于 1ml DMEM 中的 16μCi 的含氚甘氨酸(DuPont New England Nuclear)。在 37℃下由 5%二氧化碳组成气氛中的空气中温育 48 小时后确定放射性甘氨酸结合。之后用磷酸缓冲盐水洗涤四次，用乙醇和乙醚脱水，空气干燥并称重。之后将组织样品用 200μl 水再水合，并通过加 500μl 的 1M NaOH 溶解。在 60℃温育 1 小时后，将样品声处理二次，每次 20 秒。均化液在 12,000 x g 下离心，并 100μl 等份的上清液放置于玻璃纤维滤纸盘(Whatman No. 1822024; Whatman Chemical Separation Inc., Clifton, N.J.)。将滤纸盘干燥，并将蛋白质通过加入冰冷的 10%三氯乙酸持续 30 分钟来沉淀。接着用乙醇淋洗五次，用乙醚淋洗二次，并干燥。之后将滤纸盘放置于 10ml 闪烁液中(Cytoxcint ES, ICN Biomedicals, Inc., Irvine, CA)。通过使用 LS1701(Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA)闪烁计数确定氚结合。

在实验 1 中，生存力也通过用 ^{3}H-次黄嘌呤标记一些小叶半块用于放射自显影术来评价。为了做到这点，制备出含有 5mg/100ml 庆大霉素(Sigma)和 15mg/100ml 抗坏血酸(Sigma)的无血清培养基(DMEM)中含有 15μCi/ml 的 ^{3}H-次黄嘌呤(DuPont/NEN)的溶液。每一小叶半块放置于 5ml 消毒的 snap 盖试管中。使用微量移液管，将 0.75ml 的 ^{3}H-次黄嘌呤溶液加入于试管中的组织中。将试管于 37℃下在 5%CO_2 中温育 48 小时。之后，滗去氚化的培养基，并将此组织用 3-4ml PBS(GIBCO)洗涤二次。加入另一份 3-4ml PBS，并在去除液体前将试管在室温下温育 30 分钟。之后，向每一试管中加入 3-4ml PBS，并将试管于 4℃下温育 18-72 小时。滗去 PBS，并将组织转移到 7ml 玻璃闪烁管中。向闪烁管中加入 10%中性缓冲福尔马林(Fisher)，盖好，并贮存在室温下，直到样品如下进行放射自显影术分析。

将组织于 0.1M 磷酸钠缓冲液，pH7.4 中的 15%蔗糖中浸泡 2 小时至过夜。将溶液先置于在室温下，之后置于低于 4℃下。将组织解剖，镶嵌在带有 OCT 的塑料模中，之后于液氮下冷冰。冷冻切片在恒冷切片机中切成 6 微米，并安放在铬明矾涂覆的载玻片上解冻(载玻片在 37℃下用含有 3.0g 白化明胶 275 和 0.3g 硫酸铬钾的 1000ml 蒸馏水溶液中浸蘸二次)。载玻片在 37℃下干燥过夜至 48 小时，并将 OCT

从这些部分中去除。之后将切片在从 95%、75%降到 50%的乙醇中水合。将载玻片留在 50%的乙醇中 10 分钟，之后用蒸馏水淋洗 30 秒。将切片在乙醇至二甲苯中脱水去脂肪。将载片在稀释至二倍蒸馏水中的同样乙醇溶液中水合。载片放置在 37℃烘箱中至干燥(1 小时至过夜)。将液体 Emulsion Kodak NTB2 在 40℃水浴中溶解 30 分钟，之后用蒸馏水 1:1 稀释。将载片缓慢地单个浸蘸于此稀释乳液中 2 次(6 秒)，并让之静置 1 小时或直到干燥。将盒密封好，并贮存在冷室(4℃)中的干燥器中，直到载片显影。

为使载片显影，使它们仍就密封好，回到约 14℃(在室温下约 11 分钟)。这样可避免在载片上凝聚，而凝聚会减少信号。所有的步骤在 14℃的温度下进行。将载片放置在玻璃载片架上，并即刻在 D-19 显影液(Kodak Catalog # 146 4593)中显影 2.5 分钟。之后将载片在蒸馏水中淋洗 30 秒，在这之后，将它们用 Kodak 定影液(Polymax T fixer, Catalog # 829-5321)定影 5 分钟。将载片在 14℃下于流动的自来水下淋洗，将水温缓慢升至室温，21℃，持续 10 分钟。最后，将载片用 Harris Hematoxylin (Sigma Cat # HHS-32)和 Eosin Y 醇溶液(Sigma, Cat. # HT 110-1-32)对染。

结果示于下列表格中。^{3}H-甘氨酸结合入蛋白质用每 mg 干组织每分钟衰变(DPM)来表示。放射自显影结果用计数的活细胞占每次计数的细胞总数的百分率来表示。

实验 1

	混合物C		混合物C加氟康唑	
鲜膜	DPM/mg	放射自显影	DPM/mg	放射自显影
B1126	2088	78%	3232	79%
B1127	5996	71%	6322	62.5%

	混合物B		混合物B加氟康唑	
鲜膜	DPM/mg	放射自显影	DPM/mg	放射自显影
B1128	1430	18%	1526	11%
B1129	2754	28%	2816	27%

实验 2 (DPM/mg)

瓣膜	小叶	新鲜组织	混合物B	混合物B 加氟康唑	混合物B 的平均%
B1134	1	1847	1589 (86%)*		
	2	2112	1882 (89%)		
	3	1826		2244 (123%)*	129%
B1135	1	1830	2114 (116%)		
	2	1536		810 (53%)	45%
	3	2255		1091 (48%)	
B1137	1	2179	2674 (123%)		
	2	2776	4375 (158%)		
	3	1724		2811 (163%)	80%
B1138	1	1934	3320 (172%)		
	2	1449		3412 (235%)	85%
	3	1499		2250 (150%)	
B1139	1	9765	7596 (78%)		
	2	5084	5276 (104%)		
	3	10519		3786 (36%)	59%
B1140	1	2154	3804 (177%)		
	2	5530		5483 (99%)	106%
	3	4105		2597 (63%)	

瓣膜	小叶	新鲜组织	混合物C	混合物C 加氟康唑	混合物C 的平均%
B1141	1	2410	4955 (206%)		
	2	2287		4714 (206%)	95%
	3	3762		4661 (124%)	
B1144	1	2736	4355 (159%)		
	2	5550		5128 (92%)	112%
	3	4752		4611 (97%)	
B1147	1	1526	2116 (139%)		
	2	1819		3959 (217%)	148%
	3	1582		2287 (145%)	
B1148	1	4448	9922 (223%)		
	2	3144	8075 (257%)		
	3	3708		8290 (224%)	92%
B1150	1	2484	5085 (205%)		
	2	2796	4999 (179%)		
	3	3139		7109 (226%)	141%
B1151	1	3938	3868 (98%)		
	2	5279	7160 (136%)		
	3	4155		6055 (146%)	110%

*与新鲜组织相比的百分数

实验 1：结果表明，用含有氟康唑的混合物 C 处理，使瓣膜组织的生存力至少与用不加氟康唑的混合物 C 处理后瓣膜组织的生存力一样。这点可见于闪烁计数结果和放射自显影。含有氟康唑的混合物 B 也实际上等同于不加氟康唑的混合物 B。然而，用混合物 B，该组织开始时生存力稍低。

实验 2：平均而言，含有氟康唑的混合物 B 给出的结果是不含氟康唑的混合物 B 获得的结果的 84%。平均而言，含有氟康唑的混合物 C 给出的结果是不加氟康唑的混合物 C 的 116%。当任一种抗生处理与新鲜的组织瓣膜相比时，它们均高于新鲜组织。

由实验 1 和 2 的结果，可以得出这样的结论，向混合物 B 或 C 中加入 100μg/ml 氟康唑对该组织无害。

实施例 2

如实施例 1 中所述，制备并试验含有下列浓度的下列抗生素的混合物。

亚培胺南	12μg/ml
万古霉素	50μg/ml
氟康唑	100μg/ml
利福平	0、10、30 或 100μg/ml。

使用成对的瓣膜小叶半块。每一小叶的一半作为对照。将它温育在不含利福平的抗生素混合物中。另一半用含有利福平的抗生素混合物之一处理。对 ^{3}H-甘氨酸结合入蛋白质的评价的结果以 DPM/mg 和相对于对照的百分率示于下列表格中。

		加入的利福平浓度						
瓣膜	小叶	对照1	10μg/ml	%	30μg/ml	%	100μg/ml	%
B1154	1 2 3	2139 2194 5176	2053	96	2065	94	1673	32
B1156	1 2 3	4371 9792 8748	4816	110	9238	94	3583	41
B1157	1 2 3	6924 4775 3590	6304	91	4685	98	2575	72
B1159	1 2 3	4786 6316 5705	3566	75	5774	91	2891	51
B1161	1 2 3	4091 5310 3876	3002	73	2034	38	1170	30
B1162	1 2 3	3232 2620 2349	3690	114	1693	65	547	23
平均				93 %		80 %		42%

实施例 3

如实施例 1 中所述，制备并试验抗生素混合物。使用成对的瓣膜小叶半块。每一小叶的一半作为对照并用下列抗生素混合物处理:

亚培胺南　　12μg/ml

万古霉素　　50μg/ml

氟康唑　　100μg/ml.

另一半用下列试验抗生素混合物处理:

亚培胺南　　12、24 或 48μg/ml

万古霉素　　50μg/ml

氟康唑　　100μg/ml

利福平　　10μg/ml.

对 ^{3}H-甘氨酸结合入蛋白质的评价的结果以 DPM/mg 和相对于对

照的百分率示于下列表格中。标记为 12、24 和 48μg 的栏指在每 ml 试验(非对照)混合物中所用的亚胺培南的量。

鳞膜	对照	12μg	% 对照	24μg	% 对照	48μg	% 对照
B1163	3347 4927 2546	4516	135%	3200	65%	3602	141%
B1164	3557 3486 5031	3601	101%	2169	62%	4780	95%
B1165	3461 4014 3768	3789	109%	2260	56%	2944	78%
B1166	3569 3215 4012	1553	44%	6539	203%	6568	164%
B1168	2891 2193 2084	1565	54%	1617	74%	1316	63%
B1169	5202 3343 5030	3903	75%	2775	83%	4208	84%
平均			86%		90%		104%

实施例 4

如实施例 1 中所述，制备并试验含有下列浓度的下列抗生素的抗生素混合物。

亚培胺南　　12、24、48 或 96μg/ml

万古霉素　　50μg/ml

氟康唑　　100μg/ml。

使用成对的瓣膜小叶半块。每一小叶的一半作为对照，并用含有 12μg/ml 亚胺培南的抗生素混合物处理。另一半用含有 24、48 或 96μg/ml 亚胺培南的试验抗生素混合物处理。对 ^{3}H-甘氨酸结合入蛋白质的评价的结果以 DPM/mg 和相对于对照的百分率表示列于下表中。标记为 24、48 和 96μg 的栏指在每 ml 试验(抗生)混合物中所用的亚胺培南的量。

瓣膜	对照	24μg	% 对照	48μg	% 对照	96μg	% 对照
B1178	1700 3267 2944	4458	262%	1944	60%	1907	65%
B1180	7227 11035 9493	9336	129%	11321	103%	12004	126%
B1181	3806 7091 3651	4802	126%	4942	70%	3322	91%
B1182	6375 6050 9135	6372	100%	8826	146%	6524	71%
B1184	6621 6219 7324	8093	122%	9415	151%	9272	127%
B1185	8312 6444 6422	5054	95%	6755	105%	5851	91%
平均			139%		106%		90%

实施例 5

如实施例 1 中所述，制备并试验含有下列浓度的下列抗生素的混

合物。

亚培胺南　　12、24、48 或 96μg/ml

万古霉素　　50μg/ml

氟康唑　　100μg/ml

利福平　　10μg/ml。

两性霉素 B　0、0.3、1.0 或 3.0μg/ml。

两性霉素 B 的稀释液如下制备。将含有 50mg 两性霉素(E.R. Squibb & Sons, Inc. Princeton, NJ; 商品名: FUNGIZONE)的瓶子用 10ml 消毒水再构建。取出一毫升这样的溶液，并再用 9ml 溶液 B 稀释，给出 500μg/ml 的浓度。由此母液用溶液 B 制成进一步的稀释液。

使用成对的瓣膜小叶半块。每一小叶的一半作为对照并用含有不加任何两性霉素 B 的抗生素混合物处理。另一半用含有两性霉素 B 的抗生素混合物处理。对 ^{3}H-甘氨酸结合入蛋白质的评价的结果以 DPM/mg 和相对于对照的百分率示于下列表格中。表格中，浓度是指使用于试验抗生素混合物中的两性霉素 B 的浓度。

瓣膜	对照	3μg/ml	% 对照	1μg/ml	% 对照	0.3μg/ml	% 对照
B1170	6026 4401 7638	5799	96%	3397	77%	5281	69%
B1171	2428 1666 873	470	19%	619	37%	1692	194%
B1173	6729 8068 7206	5390	80%	4619	57%	8148	113%
B1174	5894 4841 4040	4694	80%	4616	95%	6724	166%
B1175	12453 6666 6482	7584	61%	6130	92%	6704	103%
B1177	6281 3682 2159	6182	98%	3294	89%	4074	189%
平均			72%		74%		139%

在抗生素混合物中 0.3μg/ml 两性霉素 B 的浓度产生具有平均生存力大于对照物的组织。使用 1 和 3μg/ml 两性霉素 B，组织生存力分别降低到对照物的 74%和 72%。

实施例 6

如实施例 1 和 5 中所述，制备并试验含有下列浓度的下列抗生素的混合物，只是瓣膜小叶半块只在抗生素混合物中温育 24 小时，而不是 48 小时。

亚培胺南　　48μg/ml
万古霉素　　50μg/ml
氟康唑　　100μg/ml
利福平　　0、10、30 或 60μg/ml。
两性霉素 B　0.3μg/ml。

使用成对的瓣膜小叶半块。每一小叶的一半作为对照，并用不加任何利福平的抗生素混合物处理。另一半用含有利福平的试验抗生素混合物之一处理。对 ^{3}H-甘氨酸结合入蛋白质的评价的结果以 DPM/mg 和相对于对照的百分率示于下列表格中。表格中，浓度是指使用于试验抗生素混合物中的利福平的浓度。

瓣膜	对照	10μg/ml	%对照	30μg/ml	%对照	60μg/ml	%对照
B1199	4098 2311 2846	2552	62%	1348	58%	2099	74%
B1200	1974 1216 2286	3512	178%	2279	187%	630	28%
B1202	2238 2365 3470	2704	121%	2310	98%	1805	52%
B1203	3540 4239 4035	3001	85%	4241	100%	2643	66%
B1204	3709 3368			2640	64%	2025	56%
B1207	5970 7433 6174	4773	80%	3980	54%	3829	62%
B1209	6029 2752 3875	3597	60%	5750	209%	1487	38%
B1210	11545 11317 7415	5436	47%	7136	63%	6281	85%
B1211	5637 6182 7903	3180	56%	3336	54%	677	9%
B1213	5724 8390 4721	4597	80%	4418	53%	3879	82%
平均			85%		94%		55%

实施例 7

进行实验，比较被新鲜组织结合的 ^{3}H-甘氨酸与被各种方式处理的组织结合的 ^{3}H-甘氨酸。所有的程序与实施例 1 和 5 中描述的那些相同，除非在下文中另有说明。

每八个瓣膜中取出三片小叶，并将每片小叶切成二半。将六片小叶半块处理如下:

小叶 1A　新鲜对照，无抗生素处理，无冷冻保存。

小叶 1B　与溶液 B 一起在 37℃下温育 24 小时并冷冻保存。

小叶 2A　新鲜对照，无抗生素处理，无冷冻保存。

小叶 2B　与抗生素混合物一起在 37℃下温育 24 小时并冷冻保存。

小叶 3A　与溶液 B 一起在 37℃下温育 24 小时并冷冻保存。

小叶 3B　与抗生素混合物一起在 37℃下温育 24 小时并冷冻保存。

所有的新鲜对照瓣膜小叶半块均即刻用 ^{3}H-甘氨酸标记，并进行闪烁计数处理。解冰后，将溶液 B 处理和抗生素处理的瓣膜小叶半块也用 ^{3}H-甘氨酸标记，并进行闪烁计数处理。

抗生素混合物由下列组成:

亚胺培南　48μg/ml

万古霉素　50μg/ml

氟康唑　100μg/ml

两性霉素　0.3μg/ml.

结果示于下文表格中。数字是 DPM/mg。

瓣膜	小叶	新鲜组织	溶液B	抗生素
B1222	1	5097	7110	
	2	4155		9311
	3		6610	6439
B1223	1	4684	9400	
	2	5582		8131
	3		8364	6841

B1226	1	3670	8153	
	2	3987		11425
	3		7817	7757
B1229	1	6107	8177	
	2	8470		9683
	3		7945	6297
B1230	1	6067	7412	
	2	4098		6935
	3		4258	5523
B1232	1	3022	5474	
	2	2534		7574
	3		6138	4051
B1233	1	2451	4436	
	2	3701		10861
	3		6364	5402
B1234	1	5666	2870	
	2	5006		3476
	3		4185	3233
平均		4643	6545	7059
STD DEV		1544	1852	2450
SEM		386	463	612

新鲜对照组与在冷冻保存前在 37℃温育的二个组间存在明显的统计学差异。在溶液 B 处理和抗生素处理的组之间无统计学差异。统计分析使用 Student-Newman-Keuls 方法进行。

实施例 8

如实施例 1 和 5 中所述，制备并试验含有下列浓度的下列抗生素的抗生素混合物。

亚培胺南　　48、72 或 96μg/ml

万古霉素　　50μg/ml

氟康唑　　100μg/ml

两性霉素 B　0.3μg/ml。

每一瓣膜取三片小叶，并将小叶切成二半。每一小叶的一半与含有特定浓度的亚胺培南的抗生素混合物一起温育 24 小时，并将另一半与相同的抗生素混合物一起温育 48 小时，如下所示：

小叶 1A - 48μg/ml 亚胺培南，24 小时

1B - 48μg/ml 亚胺培南，48 小时

2A - 72μg/ml 亚胺培南，24 小时

2B - 72μg/ml 亚胺培南，48 小时

3A - 96μg/ml 亚胺培南，24 小时

3B - 96μg/ml 亚胺培南，48 小时

对 ^{3}H-甘氨酸结合入蛋白质的评价的结果以 DPM/mg 表示列下表格中。表格中，浓度是指试验抗生素混合物中所用的亚胺培南的浓度。

瓣膜	48 μg/ml		72 μg/ml		96 μg/ml	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
B1245	7053	5875	9219	9933	4977	6236
B1246	5526	5758	7670	6128	5375	5805
B1247	3252	6582	6713	5808	7105	8708
B1256	2643	3459	2796	2876	2677	2602
B1257	3188	4685	5661	5724	5982	1792
B1258	6322	4947	6503	7195	7025	12875
B1259	9798	7731	14088	14544	7409	12861
B1260	3700	3584	3214	5586	5053	4185
B1266	3671	4887	4022	5273	4016	4551
B1267	7535	5655	9086	8917	9233	5647
平均	5269	5316	6897	7198	5885	6526
SEM	748	411	1069	1026	595	1219

这些数据通过 Student T-试验统计分析显示，任何处理组之间均无统计学差异。

实施例 9

如实施例 1 和 5 中所述，制备并试验含有下列浓度的下列抗生素的抗生素混合物，只是瓣膜小叶半块只在抗生素混合物中温育 24 小时。

亚培胺南　　96μg/ml

万古霉素　　50μg/ml

氟康唑　　100μg/ml

和下列之一：

0.3μg/ml　　两性霉素 B　　对照

0.6μg/ml　　两性霉素 B　　I

1.0μg/ml　　两性霉素 B　　II

0.6μg/ml 两性霉素 B 加上

50μg/ml 萘替米星　　III

对 ^{3}H-甘氨酸结合入蛋白质的评价的结果示于下文表格中(单位: DPM/mg)。要说明的是，瓣膜 B1307、B1310 和 B1311 具有不正确的加在混合物中的萘替米星浓度。因此，这些数据未包括。

瓣膜	对照	I	II	III
B1307	4438	7264		
	6370		5770	
B1310	1773	2522		
	2107		4091	
B1311	2712	1617		
	1560		1495	
B1313	3940	3790		
	4644		3058	
	2841			1598
B1315	3678	3588		
	4727		4941	
	3570			4476
B1316	7255	9624		
	8867		10954	
	5510			7924
B1317	4039	4261		
	7180		5096	
	2703			3240
B1318	5461	7025		
	7704		9013	
	7838			7346
B1319	3178	3435		
	2983		2963	
	3190			2847
B1320	9820	8535		
	5527		5256	
	7530			7866
B1321	4528	2870		
	5439		4486	
	3872			3763
B1322	3815	3544		
	3511		2269	
	4205			3249

B1324	6268	7065		
	4692		4438	
	7847			6492
B1325	4839	5273		
	4516		4462	
	5922			6478

统计分析	平均	Std. Dev	SEM
对照	4887	1997	320
0.6 Amp B	5030	2451	655
1.0 Amp B	4878	2502	669
.6 Amp B + 萘替米基	5025	2255	680

使用 Kruskal-Wallis one way anova on ranks 法分析，各组之间无统计学差异(P=0.994)。因此，试验的抗生素组合物为组织提供相等的生存力。

实施例 10

如实施例 1 和 5 中所述，制备并试验抗生素混合物，只是瓣膜小叶半块只在抗生素混合物中温育 24 小时。使用成对的瓣膜小叶半块。每一小叶的一半作为对照，并用下列抗生素混合物处理:

亚培胺南　96μg/ml
万古霉素　50μg/ml
氟康唑　100μg/ml
两性霉素 B　0.6μg/ml。

另一半用下列试验抗生素混合物之一处理:

亚培胺南　96μg/ml
万古霉素　50μg/ml
氟康唑　100μg/ml
两性霉素 B　0.6μg/ml
萘替米星　20、30 或 50μg/ml。

对 ^{3}H-甘氨酸结合入蛋白质的评价的结果以 DPM/mg 和相对于对照的百分率表示列入下表中。标记为 20、30 或 50μg/ml 的栏指用于试验(非对照)抗生素混合物中的萘替米星的浓度。

瓣膜	对照	20μg/ml	% 对照	30μg/ml	% 对照	50μg/ml	% 对照
B1326	6762 5259 3701	4218	62%	4944	94%	4309	116%
B1327	4433 7519 6210	4506	102%	9040	120%	6714	108%
B1328	6504 6862 4225	4648	71%	7312	107%	3514	83%
B1329	4233 6058 5331	4193	99%	6569	108%	5188	97%
B1331	3646 3682 2988	3530	97%	5611	152%	4516	151%
B1332	3910 6968 7404	5831	149%	6736	97%	6046	82%
B1333	1327 1160 472	1929	145%	2660	229%	433	91%
B1334	7628 9000 8553	4994	65%	10401	116%	11484	134%
B1337	6624 6290 6766	5048	76%	6440	102%	6349	94%
B1338	2843 9114 4908	3233	114%	8342	92%	4218	86%
B1340	值太小						
平均	5514	4213	98%	6805	122%	5815	104%

实施例 11

如实施例 1 和 5 中所述，制备并试验抗生素混合物，只是瓣膜小叶半块只在抗生素混合物中温育 24 小时。使用成对的瓣膜小叶半块。每一小叶的一半作为对照，并用下列抗生素混合物处理：

亚培胺南　　96μg/ml

万古霉素　　50μg/ml
氟康唑　　100μg/ml
萘替米星　　50μg/ml.
另一半用下列抗生素混合物之一处理:
亚培胺南　　96μg/ml
万古霉素　　50μg/ml
氟康唑　　100μg/ml
萘替米星　　50μg/ml
两性霉素 B　0.3、0.6、1.0、2.0 或 3.0μg/ml。

对 ^{3}H-甘氨酸结合入蛋白质的评价的结果以 DPM/mg 表示列入下表中。^{3}H-次黄嘌呤放射自显影的结果以相对于细胞总数的活细胞百分率示于第二个表格中。标记为 0.3、0.6、1.0、2.0 或 3.0μg/ml 的栏指用于试验(非对照)抗生素混合物中的两性霉素 B 的浓度。

鲜膜	对照	0.3μg/ml	0.6μg/ml	1.0μg/ml	2.0μg/ml	3.0μg/ml
B1341	3658	4388	4643	4937	4248	2569
B1342	6198	4655			2795	3218
B1343	4293	3368	4450	4777	2744	2937
B1347	4302	4938	4238	5217	3744	3443
B1348	4488	5632	5979	5136	5804	3653
B1349	8769	8540	7646	4377	8094	6033
B1351	5806	5413	7156	5833	3498	5743
B1352	7242	5254	3777	4888	3921	5177
B1353	3740	4147	3291	3657	2964	3212
B1355	1813	1064	1565	2083	1923	2028
B1358	4974	6902	4854	5284	6209	7139
B1360	3388	3319	2796	2448	2945	2867
B1361	10903	7264	6773	7783	6793	9171
B1363	7340	4628	7321	7463	3620	5134
MEAN	5494	4965	4960	4914	4236	4452
SEM	645	493	526	452	480	543
对照的平均%		90%	90%	89%	77%	81%

鲜膜	对照	0.3μg/ml	0.6μg/ml	1.0μg/ml	2.0μg/ml	3.0μg/ml
B1350	76.5%	75.7%	67.5%	69%	70.5%	76.5%
B1354	82%	61.5%	82.8%	76.3%	68.3%	75.3%
B1356	81%	86%	84%	64%	68%	55.5%
B1359	91%	58%	66%	59%	71%	70%
MEAN	82.6%	70.3%	75.1%	67.1%	69.5%	69.3%
对照的平均%		85%	91%	81%	84%	84%

实施例 12

进行实验，确定使用混合物 C、混合物 D 或混合物 B 加混合物 C 处理的瓣膜小叶的生存力。混合物 B 和 C 的配方参见实施例 1。混合物 D 具有下列配方：

亚胺培南	96μg/ml
万古霉素	50μg/ml
氟康唑	100μg/ml
两性霉素	0.3μg/ml。

除非另有说明，按实施例 1 和 5 中所述配制混合物并进行试验。

使用十一只人瓣膜。每一瓣膜取一小叶用混合物 D 温育 24 小时(方法 G)。另一小叶于混合物 C 中温育 24 小时(方法 D)或于混合物 C 中温育 24 小时，接着于混合物 B 中温育 24 小时(方法 E)。解冻后，将每一小叶切成二半。一半用 ^{3}H-甘氨酸标记，并将另一半用 ^{3}H-次黄嘌呤标记。^{3}H-甘氨酸结合入蛋白质的结果示于下文表格中(DPM/mg 单位)。

瓣膜	方法	方法 D/E	方法G
B1272	D	2008	1576
B1274	D	1484	3858
B1276	D	2527	2110
B1277	D	3578	8432
平均		**2399**	**3994**
SD		**894**	**3115**
B1273	E	742	2012
B1275	E	4449	6267
B1278	E	2317	2383
B1279	E	388	410
B1280	E	842	1047
B1281	E	589	2122
B1282	E	470	1326
平均		**1400**	**2224**
SD		**1496**	**1911**

因此，用含有抗真菌剂氟康唑和两性霉素 B 的混合物 D 处理(方法 G)产生的瓣膜小叶的生存力与用不含抗真菌剂的混合物 B 和 C 处理(方法 D 和 E)差不多或更好。

实施例 13

进行一项实验，比较用下列方式处理的心脏瓣膜组织的生存力：

方法 F：用混合物 C 温育 24 小时心肌缺血时间较长的组织(潜在的较低细胞生存力)，任选接着用混合物 B 温育 24 小时(实施例 1 中给出的配方)。是否用混合物 B 处理，要由以混合物 C 处理之前所作微生物培养结果来决定，如 Mcnally 和 Brockbank，《医学工程与技术杂志》[J. Med. Engineer. & Tecknol.]16, 34-38(1992)和 PCT 申请 WO 92/12631 中所述。

方法 H：用下列被称作混合物 E 的抗生素混合物温育 24 小时：

亚胺培南	94-100μg/ml
万古霉素	50μg/ml
萘替米星	50μg/ml
氟康唑	100μg/ml
两性霉素	1.0μg/ml。

如实施例 1 和 5 中所述，制备并试验混合物 B、C 和 E，除非另有指明。

解剖时从每一瓣膜取出一片小叶，并切成二半。一半即刻用 ^{3}H-甘氨酸标记，另一半即刻用 ^{3}H-次黄嘌呤标记。这些均是新鲜对照物。

余下的瓣膜切成二半，每一半留下一个完整的小叶。半个瓣膜之一用方法 F 处理(混合物 C，任选接着用混合物 B 处理)。另半个瓣膜用方法 H 处理(混合物 E)。冰冻的半个瓣膜解冻，并切成二半。一半用 ^{3}H-甘氨酸标记，另一半用 ^{3}H-次黄嘌呤呤标记。

结果示于下文表格中(DPM/mg 单位用于表示 ^{3}H-甘氨酸结合入蛋白的结果，活细胞百分比是与 ^{3}H-次黄嘌呤放射自显影的总细胞数相比)。

用非参数 Mann-Whitney 排序累加试验，对各处理组进行比较。

当使用 ^{3}H-甘氨酸来标记组织时，各处理间无明显差异(P=0.665)。同样，当使用 ^{3}H-次黄嘌呤来标记组织时，二组处理之间无明显差异(P=0.684)。使用 Kruskal-Wallis one way anova on ranks 分析法，当使用 ^{3}H-甘氨酸时，三组中任二者间均无明显差别。

鼾膜	甘氨酸新鲜组织	次黄嘌呤新鲜组织	甘氨酸法F	次黄嘌呤法F	甘氨酸法H	次黄嘌呤法H
B1385	10557	70%	2137	43%	4802	52.6%
B1386	4120	75.8%	2719	32%	6742	61%
B1387	2493	72.3%	2385	41.5%	3645	41.4%
B1388	3366	41.2%	3547	31.2%	946	10.3%
B1389	6569	60.6%	2066	30.6%	1111	18.4%
B1390	2474	48.2%	3253	26.8%	5848	22.8%
B1391	2451	86.5%	1420	26.3%	2942	52%
B1392a	1236	52.2%	658	12.3%	381	5.8%
B1392b	ND*	ND	3196	39.8%	5937	38.8%
B1393	5774	78.2%	2798	31.4%	4286	44.2%
B1394	3544	63.2%	5840	42.4%	6798	49.6%
B1395	4676	84.4%	18298	55.3%	13986	37.2%
B1396	4792	60.9%	2778	27.4%	2119	32.2%
B1397	4524	85.6%	3639	39.8%	3825	30.8%
B1399	4209	75.9%	1698	10.9%	1819	22.9%
B1400	3179	56%	1533	29.8%	9316	16.4%
B1401	3181	33.3%	2402	30.2%	2317	13.2%
B1402	1962	88.4%	1716	18.5%	2889	39.4%
B1403	1167	36.4%	1730	54.7%	1289	51.0%
B1406	2504	43.6%	9662	43.6%	2978	21.8%
B1407	3160	82.9%	3816	28.3%	2884	28.2%
B1408	11194	79.4%	11264	40.0%	7406	70.9%
B1409	896	81.6%	4665	46.4%	1822**	59.6%
B1410	2044	68.6%	7453	51.3%	3804	44.4%
B1412	4248	21.8%	2038	29.0%	1652	50.0%
平均	4062	64.5%	4085	34.5%	4155	36.6%
SD	2535	19.1%	3991	11.6%	3104	17.3%
SEM	529	3.9%	815	2.3%	634	3.5%

* ND=无数据

** 非常厚重的噬菌斑

实施例 14

使用于这些研究中的白色假丝酵母(*Candida albicans*)是 ATCC 菌种 14053(美国典型培养物保藏中心)。多种这些菌种在培养前与培养后进行鉴定。

试验有机体在 Sabouraud 琼脂板上培养，划线分离，并在 35℃温育 24 小时。使用消毒棉球移出单个的菌落，并放置于 5.0ml 消毒盐水中。将混合物涡旋，并制成稀释液，并与标准的浊度图进行比较，直到浊度相当于 0.5 浊度标准液(0.5 MacFarland 浊度标准悬浮液)。如下制成系列稀释液：(1) 0.5ml 的 0.5 MacFarland 浊度标准液加入到 4.5ml 消毒的正常盐水中(试管 A；预期种群数 10^5cfu/ml)；(2) 0.1ml 的试管 A 悬浮液加入到 9.9ml 消毒的正常盐水中(试管 B；预期种群数 10^3cfu/ml)；和(3) 0.1ml 的试管 B 悬浮液加入到 9.9ml 消毒的正常盐水中(试管 C；预期种群数 10cfu/ml)。每一系列稀释液在进行下一步转移前涡旋 30 秒。

用溶液 B 制得具有下列表格中给出的浓度的氟康唑和两性霉素 B 的溶液。

混合物	氟康唑	两性霉素 B
对照	0	0
I	100μg/ml	0
II	100μg/ml	0.3μg/ml
III	0	0.6μg/ml

试管 B 和 C 用这些混合物杀菌处理。将每一种上述抗生素混合物(24.0ml)放置入消毒的 115ml 塑料杯中，并加入 1.0ml 来源于试管 B 或 C 的酵母种群。将这些杯轻轻地混合，盖好，并放置在培养箱中于 35℃下温育 24 小时。在前述温育之后，从每一试管中取出 1.0ml 的酵母-上述抗生素混合物的混合物，并处理，获得存活着的酵母有机体。将所剩的混合物放回培养箱中，并再温育 24 小时。在此温育期之后，将杯取出，轻轻地涡旋，并取出 1.0ml，重复这些步骤。

如下进行酵母的计数；每一样品重复试验。将一毫升(1.0ml)酵

母悬浮液加入到含有 99ml 消毒正常盐水的消毒的一次性装置的顶部配件上。将内容物轻轻混合并过滤。使用消毒的一次性镊子无菌地去除滤纸垫，并放置在 Sabouraud 琼脂板上。并将此板在 35℃下温育 24 小时，之后计数菌落。

结果示于下列表格中。在时间为零时，试管 B 中每 ml 溶液中含有 734 个菌落形成单位(CFU)的白色假丝酵母，在时间为零时，试管 C 含有 13cfu/ml。

试管B	24小时	48小时
I	31 菌落	45 菌落
II	0 菌落	0
III	0 菌落	0

试管 C	24小时	48小时
I	0 菌落	1 菌落
II	0 菌落	0 菌落
III	0 菌落	0 菌落

试管 B 的结果显示，100μg/ml 氟康唑有效地将白色假丝酵母生物负载在 24 小时内由 734 个菌落降低到 31 个菌落。在 48 小时时，菌落计数(45)表示产生耐药性或者说处于固定状态。0.6μg/ml 的两性霉素 B 和 100μg/ml 氟康唑和 0.3μg/ml 两性霉素 B 的组合是杀真菌的。

实施例 15

如实施例 1 和 5 所描述，制备出下列抗生素混合物，并对十种酵母分离菌进行试验:

混合物	内容
I	亚胺培南 - 50μg/ml 万古霉素 - 50μg/ml 氟康唑 - 100μg/ml 两性霉素 B 0.3μg/ml

II	亚胺培南 - 50μg/ml
	万古霉素 - 50μg/ml
	氟康唑 - 100μg/ml
	两性霉素 B 0.6μg/ml
III	亚胺培南 - 50μg/ml
	万古霉素 - 50μg/ml
	氟康唑 - 100μg/ml
	两性霉素 B 1.0μg/ml
IV	亚胺培南 - 50μg/ml
	万古霉素 - 50μg/ml
	两性霉素 B 0.3μg/ml
V	亚胺培南 - 50μg/ml
	万古霉素 - 50μg/ml
	两性霉素 B 0.6μg/ml
VI	亚胺培南 - 50μg/ml
	万古霉素 - 50μg/ml
	两性霉素 B 1.0μg/ml

选择出所用的十种酵母分离菌，是因为它们均被认为具有临床意义的人酵母分离菌。试验的十种酵母分离菌是:

1. 深红酵母（Rhodotorula rubra*）
2. 葡萄牙假丝酵母(Candida lusitaniae*)
3. 啤酒糖酵母(Saccharomyces cervisae*)
4. 罗仑氏隐球酵母(Cryptococcus laurentii*)
5. 季边蒙氏假丝酵母(Candida guilliermondii*)
6. 光滑球拟酵母(Torulopsis glabrata*)
7. 热带假丝酵母(Candida tropicalis*)
8. 白色假丝酵母(Candida albicans@)
9. 白吉利氏丝孢酵母(Trichosporon beigeli*)
10. 近平滑假丝酵母(Candida parasilosis*)

* 由美国病理学家学院提供

@白色假丝酵母分离菌由捐献组织获得，其中此酵母分离菌在抗菌混合物温育中存活。使用用于确定白色假丝酵母的病菌试管试验

(Germ Tube Test)来证实所做的鉴定。病菌试管试验涉及用商业化制备的牛血清溶液(REMEL)制成分离菌的悬浮液。将此混合物在35℃下温育2-4小时，并进行显微镜检测。阳性病菌试管的确认是有酵母芽细胞上生芽掉下的假菌丝形成(萌发)。

将抗生素混合物用来将前述实施例中描述的十种单个的预先确定的生物负载酵母悬浮液进行杀菌处理。将Sabouraud琼脂板在计数前于35℃温育5天，并在第7天再检查一次有无任何其它酵母菌落生长。由于抗真菌剂存在，酵母分离菌可能会受损，在恢复之后它可能会生长。选择5-7天温育/计数期是为任一存活着的酵母分离菌提供最佳的恢复。

结果示于下文表格中。混合物III对所有酵母分离菌表现出最大的杀真菌活性。

24小时的酵母分离菌结果　　(CFU/ml)

酵母分离菌	最初生物负载	阳性对照	混合物 I	混合物 II	混合物 III	混合物 IV	混合物 V	混合物 VI
深红酵母	1.2×10^4	6.2×10^4	460	106	10	469	140	10
葡萄牙假丝酵母	4.3×10^4	1.7×10^5	440	70	59	801	736	233
啤酒糖酵母	1.8×10^4	9.4×10^4	530	151	11	155	15	12
罗仑氏隐球酵母	NG	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
季边蒙氏假丝酵母	5.8×10^4	2.1×10^5	401	9	10	300	70	0
光滑球拟酵母	3.7×10^4	2.0×10^6	20	0	0	10	0	0
热带假丝酵母	3.1×10^4	4.7×10^6	860	337	40	610	301	110
白色假丝酵母	2.0×10^4	3.9×10^6	263	22	10	120	10	10
白吉利氏丝孢酵母	1.1×10^4	4.1×10^4	0	0	0	810	167	154
近平滑假丝酵母	2.8×10^4	8.7×10^4	20	13	0	510	380	170

48小时时酵母分离菌结果　　(CFU/ml)

酵母分离菌	最初生物负载	阳性对照	混合物 I	混合物 II	混合物 III	混合物 IV	混合物 V	混合物 VI
深红酵母	1.2×10^4	8.6×10^5	706	2150	388	4108	2100	660
葡萄牙假丝酵母	4.3×10^4	1.1×10^9	1180	1076	245	1978	1190	1011
啤酒糖酵母	1.8×10^4	1.2×10^5	150	40	16	5010	87	0
罗仑氏隐球酵母	NG	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
季边蒙氏假丝酵母	5.8×10^4	1.3×10^8	860	466	11	1987	454	71
光滑球拟酵母	3.7×10^4	2.0×10^7	20	0	0	560	0	0
热带假丝酵母	3.1×10^4	1.7×10^9	2130	1208	528	1817	869	105
白色假丝酵母	2.0×10^4	1.2×10^7	370	26	13	3640	2019	49
白吉利氏丝孢酵母	1.1×10^4	2.3×10^5	0	0	0	9466	2019	610
近平滑假丝酵母	2.8×10^4	3.6×10^7	56	33	15	1006	380	177

24和48小时后的混合物I（0.3μg两性霉素B）之比较

酵母分离菌	混合物 I-24小时	混合物 I-48小时	纯结果
深红酵母	460 cfu/ml	706 cfu/ml	0
葡萄牙假丝酵母	440 cfu/ml	1180 cfu/ml	-1
啤酒糖酵母	530 cfu/ml	150 cfu/ml	+1
罗仑氏隐球酵母	NG	NG	NA
季边蒙氏假丝酵母	401 cfu/ml	860 cfu/ml	0
光滑球拟酵母	20 cfu/ml	20 cfu/ml	0
热带假丝酵母	860 cfu/ml	2130 cfu/ml	-1
白色假丝酵母	263 cfu/ml	370 cfu/ml	0
白吉利氏丝孢酵母	0 cfu/ml	0 cfu/ml	0
近平滑假丝酵母	20 cfu/ml	56 cfu/ml	0

比较 24 小时后的混合物 I 与 48 小时后的混合物 I，可看出酵母的常见耐药现象。

24小时后的混合物I和IV
（0.3μg两性霉素B加和不加氟康唑）之比较

酵母分离菌	混合物 I	混合物 IV	纯结果
深红酵母	460 cfu/ml	469 cfu/ml	0
葡萄牙假丝酵母	440 cfu/ml	801 cfu/ml	-1
啤酒糖酵母	530 cfu/ml	155 cfu/ml	+1
罗仑氏隐球酵母	NG	NG	NA
季边蒙氏假丝酵母	401 cfu/ml	300 cfu/ml	0
光滑球拟酵母	20 cfu/ml	10 cfu/ml	0
热带假丝酵母	860 cfu/ml	610 cfu/ml	0
白色假丝酵母	263 cfu/ml	120 cfu/ml	0
白吉利氏丝孢酵母	0 cfu/ml	810 cfu/ml	-1
近平滑假丝酵母	20 cfu/ml	510 cfu/ml	-1

在 24 小时后，不加氟康唑的混合物 IV 没有加氟康唑的混合物 I 有效。数据表明，二种抗真菌剂一起使用时给出协同效果。同样参见前述实施例。

24小时后的混合物II和V
（0.6μg两性霉素B加和不加氟康唑）之比较

酵母分离菌	混合物 II	混合物 V	纯结果
深红酵母	106 cfu/ml	140 cfu/ml	0
葡萄牙假丝酵母	70 cfu/ml	736 cfu/ml	-1
啤酒糖酵母	151 cfu/ml	15 cfu/ml	+1
罗仑氏隐球酵母	NG	NG	NA
季边蒙氏假丝酵母	9 cfu/ml	70 cfu/ml	0
光滑球拟酵母	0 cfu/ml	0 cfu/ml	0
热带假丝酵母	337 cfu/ml	301 cfu/ml	0
白色假丝酵母	22 cfu/ml	10 cfu/ml	0
白吉利氏丝孢酵母	0 cfu/ml	167 cfu/ml	-1
近平滑假丝酵母	13 cfu/ml	380 cfu/ml	-1

在 24 小时后，不加氟康唑的混合物 V 没有加氟康唑的混合物 II 有效。数据表明，二种抗真菌剂一起使用时给出协同效果。同样参见

前述实施例。

24小时后的混合物III和VI
（1.0μg两性霉素B加和不加氟康唑）之比较

酵母分离菌	混合物 III	混合物 VI	纯结果
深红酵母	10 cfu/ml	10 cfu/ml	0
葡萄牙假丝酵母	59 cfu/ml	233 cfu/ml	-1
啤酒糖酵母	11 cfu/ml	12 cfu/ml	0
罗仑氏隐球酵母	NG	NG	NA
季边蒙氏假丝酵母	11 cfu/ml	0 cfu/ml	0
光滑球拟酵母	0 cfu/ml	0 cfu/ml	0
热带假丝酵母	40 cfu/ml	110 cfu/ml	0
白色假丝酵母	10 cfu/ml	10 cfu/ml	0
白吉利氏丝孢酵母	0 cfu/ml	154 cfu/ml	-1
近平滑假丝酵母	0 cfu/ml	170 cfu/ml	-1

在24小时后，不加氟康唑的混合物VI没有加氟康唑的混合物III有效。数据表明，二种抗真菌剂一起使用时给出协同效果。同样参见前述实施例。

实施例 16

使用下列抗生素混合物重复实施例 15:

混合物 I

成分含量

亚胺培南 - 50μg/ml
万古霉素 - 50μg/ml
氟康唑 - 100μg/ml
两性霉素 B 0.3μg/ml

VII	亚胺培南 - 50μg/ml
	万古霉素 - 50μg/ml
	萘替米星 - 50μg/ml
	氟康唑 - 50μg/ml
	两性霉素 B 1.0μg/ml
VIII	亚胺培南 - 50μg/ml
	万古霉素 - 50μg/ml
	萘替米星 - 50μg/ml
	氟康唑 - 100μg/ml
	两性霉素 B 1.0μg/ml

使用不同的酵母分离菌。选择这些有机体是因为它们已从心血管捐献组织中采集到。它们是:

11. 白色假丝酵母(Candida albicans)
12. 白色假丝酵母(Candida albicans)
13. 白色假丝酵母(Candida albicans)
14. 白色假丝酵母(Candida albicans)
15. 白色假丝酵母(Candida albicans)
16. 酵母,非白色假丝酵母(yeast,not Candida albicans)
17. 酵母,非白色假丝酵母(yeast,not Candida albicans)
18. 白色假丝酵母(Candida albicans)
19. 酵母,非白色假丝酵母(yeast,not Candida albicans)
20. 酵母,非白色假丝酵母(yeast,not Candida albicans)。

使用病菌试管试验来进行鉴定。在抗生素混合物中温育 24 小时后的结果示于下列表格中(单位 CFU/ml)。

从捐献者组织中采集到的十种酵母分离菌	最初酵母生物负载	24小时对照	混合物 I	混合物 VII	混合物 VIII
白色假丝酵母	$1.6x10^3$	$2.6x10^4$	700 cfu	0 cfu	0 cfu
白色假丝酵母	$1.2x10^3$	$6.3x10^4$	886 cfu	10 cfu	0 cfu
白色假丝酵母	$1.8x10^4$	$6.8x10^4$	501 cfu	0 cfu	0 cfu
白色假丝酵母	$3.9x10^3$	$1.6x10^4$	921 cfu	0 cfu	0 cfu
白色假丝酵母	$1.3x10^3$	$8.1x10^3$	586 cfu	0 cfu	0 cfu
非白色假丝酵母	$4.8x10^3$	$2.7x10^4$	70 cfu	0 cfu	0 cfu
非白色假丝酵母	$7.0x10^3$	$4.6x10^4$	47 cfu	0 cfu	0 cfu
白色假丝酵母	$1.6x10^3$	$7.3x10^3$	320 cfu	40 cfu	0 cfu
非白色假丝酵母	$9.8x10^2$	$2.3x10^3$	689 cfu	0 cfu	0 cfu
非白色假丝酵母	$5.9x10^3$	$3.3x10^4$	$1.1x10^3$	0 cfu	0 cfu

加50μg/ml萘替米星(混合物VII和VIII)对氟康唑和两性霉性B的杀真菌活性无不利影响。将两性霉素B的浓度由0.3μg/ml(混合物I)增加到1.0μg/ml(混合物VII和VIII)，显示出更强的杀真菌活性。在存在1.0μg/ml两性霉素B(混合物VII对混合物VIII)时将氟康唑的浓度由100μg/ml降到50μg/ml，对杀真菌活性无大的影响。

实施例17

如美国专利4,890,457中所述，解剖来自223个捐献者的心脏瓣膜。解剖的瓣膜用下文所列方法之一去污。

解剖时，准备由大约一克组织组成的样本两组。一组样本由前述

方法 D、E 或 F 处理(如实施例 12 和 13 所述)。所剩的样本组用单个抗生素混合物——本发明混合物 E 处理。

方法	抗生素混合物	时间/温度
D	C 12 μg/ml 亚胺培南 50 μg/ml 万古霉素	22-26小时/37°C
E	C 12 μg/ml 亚胺培南 50 μg/ml 万古霉素 + B 62 μg/ml 利福平 57 μg/ml 萘替米星 114 μg/ml 万古霉素 136 μg/ml 头孢氨噻 136 μg/ml 林可霉素	22-26小时/37°C 22/26小时/37°C
F	C 12 μg/ml 亚胺培南 50 μg/ml 万古霉素 + 任选 B 62 μg/ml 利福平 57 μg/ml 萘替米星 114 μg/ml 万古霉素 136 μg/ml 头孢氨噻 136 μg/ml 林可霉素	22-26小时/37°C 22-26小时/37°C
H	E 94-100 μg/ml 亚胺培南 50 μg/ml 万古霉素 57 μg/ml 萘替米星 100 μg/ml 氟康唑 1.0 μg/ml 两性霉素 B	22-26小时/37°C

如下进行微生物分析。对于每一解剖的心脏，在解剖时制备三组组织样本以代表用抗生素处理前的产物(处理前)和随后进行抗生处理(处理后)。取出的样本是外部心肌组织片、二尖瓣或三尖瓣瓣膜片、接近主动脉的和肺瓣膜的肌组织片，以及接纳心脏的几毫克溶液。

在解剖后，将处理前一组的样本进行微生物实验分析是否有微生物存在。所剩的二组样本之一用方法 D、E 或 F 与心脏瓣膜一同处理。另一组用方法 Z 处理。

在每一处理期结束时，将样本无菌收集，并送去进行微生物实验分析。每一组样本分别化检。

通过将样本倒入消毒塑料袋中来均化组织样本，并放置入 stomacher 中 30-60 秒。均化的组织样本在下列培养基中培养：血琼脂板；巧克力琼脂板；血琼脂板(厌氧的)；富巯基乙酸肉汤；加庆大霉素的 Sabouraud 琼脂；和加血的 Sabouraud 心脏浸制琼脂。

二种血琼脂和巧克力琼脂板在 5-10%CO_2 的空气中在 35℃下温育 4 天，并在第 2 天和第 4 天观察。将巯基乙酸肉汤试管在 35℃下温育 14 天，并在头 7 天每天观察，之后定期观察。Sabouraud 琼脂板在 30℃下温育，并将这些板在各头周观察 2 次，之后在第 14 天再观察。

目测观察培养物的生长。制备所有的阳性培养物和任一种阴性巯基乙酸肉汤的格兰氏菌种，确定“阴性”目测观察。利用可接受的现行微生物试验来确定阳性培养物。

微生物分析结果示于下文：

方法D对比方法H

134 心脏捐献者	方法D	132个无生长; 2个分离出痤疮丙酸杆菌; 98% 有效
	方法H	134个无生长; 100% 有效

方法E对比方法H

64 心脏捐献者	方法 E	60个无生长; 4个分离出酵母; 94% 有效
	方法H	64个无生长; 100% 有效

方法F对比方法H

24 心脏捐献者	方法 F	23个无生长; 组B中1个分离链球菌 和肠杆菌种，96％有效
	方法H	24个无生长；100％有效

总结果:

方法 D，E，F		方法 H	
216	无生长，97％有效	223	无生长，100％有效
7	生长		

方法 H 样本中任何一个均未观察到细菌或真菌生长。因此，在抑制细菌生长以及酵母生长上，混合物 E 优于混合物 B 和 C(使用单一的或组合的方法 D、E 和 F)。方法 H 样本中任何一个均未观察到细菌或真菌生长。因此，在抑制细菌生长以及酵母生长上，混合物 E 优于方法 B 和 C(使用单一的或组合的方法 D、E 和 F)。

前面的详细描述旨在说明，而非限定，并应当理解正是下面的权利要求书（包括所有的等同物）才可限定本发明的范围。