

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/29

A61P 31/12



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96192146.3

[43] 授权公告日 2003 年 2 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1101225C

[22] 申请日 1996.2.15 [21] 申请号 96192146.3

[30] 优先权

[32] 1995. 2. 25 [33] GB [31] 9503863.4

[86] 国际申请 PCT/EP96/00681 1996.2.15

[87] 国际公布 WO96/26741 英 1996.9.6

[85] 进入国家阶段日期 1997.8.25

[71] 专利权人 史密斯克莱·比奇曼生物公司

地址 比利时里克林萨斯

[72] 发明人 皮埃尔·豪泽

纳撒利·M-J·C·加肯

皮埃尔·德斯蒙斯

[56] 参考文献

GB2220211A 1990.01.04 C07G17/00

WO9221292A 1994.09.29 A61B17/02

WO9319780A 1993.10.14 A61K39/29

审查员 魏春宝

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 11 页

[54] 发明名称 乙肝疫苗

[57] 摘要

提供了一种新的疫苗制剂，该制剂包含有与磷酸铝和 3-去-O-酰单磷酸酯类 A 结合的乙肝成分，尤其是乙肝表面抗原。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种疫苗组合物, 其包含乙肝抗原以及 3-O-去酰单磷酸基脂类 A 和磷酸铝。
- 5 2. 一种如权利要求 1 中所要求的疫苗组合物, 其中该抗原包含乙肝表面抗原(HBsAg)或其变体。
 3. 一种如权利要求 2 中要求的疫苗组合物, 其中该 HBsAg 包含 HBsAg 的 S-抗原(226 个氨基酸)。
 4. 一种如权利要求 3 中所要求的疫苗组合物, 其中该 HBsAg 还包含前
10 -S 序列。
 5. 一种如权利要求 3 或 4 中所要求的疫苗组合物, 其中该 HBsAg 是式 (L*, S)所示的组合颗粒, 其中 L*指乙肝病毒的修饰过的 L 蛋白, 该蛋白具有一段氨基酸序列, 该序列包括 L 蛋白的第 12-52 位残基, 接着是第 133-145 位残基, 接着是第 175-400 位残基, 并且 S 指 HBsAg 的 S-蛋白。
 - 15 6. 一种如前述任一项权利要求中所要求的疫苗组合物, 其包括一种或多种肝炎抗原和至少一种其它成分, 所述其它成分选自甲肝抗原或能提供抗一或多种下述疾病的保护作用的非-肝炎抗原: 白喉、破伤风、百日咳、b 型嗜血杆菌流感(Hib)、脊髓灰质炎和脑膜炎 A、B 或 C。
 7. 一种如权利要求 6 的疫苗组合物, 该组合物选自 DTP(白喉-破伤风
20 -百日咳)-HBsAg 组合、Hib-HBsAg 组合、DTP-Hib-HBsAg 组合以及 IPV(灭活的脊髓灰质炎疫苗)-DTP-Hib-HBsAg 组合。
 8. 一种如权利要求 7 的疫苗组合物, 其还包含甲肝抗原。
 9. 一种如前述任一项权利要求中所要求的疫苗组合物, 其中 3-O-去酰单磷酸基脂类 A 以每剂 10 μ g - 100 μ g 的剂量范围存在。
 - 25 10. 一种用于药物的如前述任一项权利要求中所要求的疫苗组合物, 其中所述药物用于治疗或预防选自肝炎、白喉、破伤风、百日咳、b 型嗜血杆菌流感 (Hib)、脊髓灰质炎和脑膜炎 A、B 或 C 的一或多种疾病。
 11. 权利要求 1 的疫苗组合物在制备用于预防或治疗肝炎感染的药物中的用途。
 - 30 12. 权利要求 11 的用途, 其中所述疫苗组合物用于治疗人类乙型肝炎感染。

13. 权利要求 1-10 中任一项的组合物在制备疫苗中的用途, 该疫苗是用于在人体内诱导 10mU 范围内的抗乙肝的中和抗体。

14. 一种生产如权利要求 1-9 中任一项的疫苗的工艺, 其包括将乙肝表面抗原吸附到磷酸铝上, 然后加入 3-O-去酰单磷酸基脂类 A。

乙肝疫苗

5 本发明涉及新的疫苗制剂、制备该制剂的方法以及其在治疗中的用途。本发明特别涉及新的用于治疗肝炎感染的制剂以及包含有乙肝疫苗成分的组合疫苗制剂。

由 A、B、C、D 及 E 型肝炎病毒引起的病毒性肝炎是非常常见的病毒疾病。特别是由 B 和 C 型病毒引起的肝炎还是造成很多肝癌病例的主要原因。因此极需研制出有效的疫苗，但是此项工作虽然已取得显著的成就，其仍然是一项正在进行的事业。在“柳叶刀”(Lancet)，1990 年 5 月 12 日，第 1142 页(A.L.W.F.Eddleston 教授)中可查得对当今肝炎疫苗的评论(包括很多主要的参考文献)。也可以参见“病毒性肝炎和肝病”(Viral Hepatitis and Liver Disease) (Vyas, B.N., Dienstag, J.L., 及 Hoofnagle, J.H., eds, Grune 和 Stratton, 15 Inc. (1984))以及“病毒性肝炎和肝病”(Viral Hepatitis and Liver Disease)(“1990 年国际专题讨论会会报”(Proceedings of the 1990 International Symposium), eds F.B.Hollinger, S.M. Lemon 及 H.Margolis, 由 Williams and Wilkins 出版)。

如文中所用到的，用“乙肝抗原”一词来指任何来自乙肝病毒的抗原物质，这些抗原物质可被用来诱导人体对该病毒的免疫。

20 乙肝病毒(HBV)感染是个有普遍性的难题，但是目前可以购买到可用于大量免疫接种的疫苗，例如通过遗传工程技术获得的'Engerix - B'产品(Smith Kline Beecham plc)。

有很多资料报道了乙肝表面抗原(HBsAg)的制备。例如，参见 Harford 等人[“发育生物学标准 54”(Develop. Biol. Standard)，第 125 页(1983)]、Gregg 25 等人[“生物技术”(Biotechnology)，5,第 479 页(1987)]、EP - A - 0226846、EP - A - 0299108 以及本文中的参考文献。

如文中所用到的，“乙肝表面抗原”或“HBsAg”一词包括任何表现 HBV 表面抗原的抗原性的 HBsAg 抗原或其片段。可以理解的是，除开 HBsAg S 抗原的 226 个氨基酸序列(参见 Tiollais 等人，“自然”(Nature)，317, 489(1985) 30 及文中的参考资料)之外，如果有必要，文中所述的 HBsAg 可以包括有如上所述参考文献及 EP - A - 0278940 中所述的前 - S 序列的全部或部分。特别

述参考文献及 EP - A - 0278940 中所述的前 - S 序列的全部或部分。特别是, HBsAg 可以包含有一个多肽, 该多肽具有一段含有第 12 - 52 残基的氨基酸序列, 接着是第 133 - 145 残基, 再接着是与 ad 血清型的乙肝病毒上的可读框有关的 HBsAg 的 L - 蛋白的第 175 - 400 残基。(将该多肽称作 L*, 5 参见 EP0414374)。本发明范围内的 HBsAg 也可以包括如 EP 0198474(Endotronics)所述的前 S1 - 前 S2 - S 多肽或其诸如 EP 034 578(Mc Cormick 和 Jones)中所述的那些多肽之类的类似物。文中所述的 HBsAg 也指一些突变体, 例如, WO 91/14703 或欧洲专利申请公开号 0511855A1 中所述的“逃逸”突变体, 尤其是其中 145 位的氨基酸取代是由甘氨酸至精氨酸的
10 HBsAg。

通常, HBsAg 会处于颗粒状态。例如这些颗粒可以只包含有 S 蛋白, 或者这些颗粒可以是组合颗粒, 例如(L*, S), 其中 L*是如以上定义的, 且 S 指 HBsAg 的 S - 蛋白。所述颗粒最好是处于某种状态, 其中该颗粒就是以这种状态在酵母中表达。

15 虽然由实验获得的和从市场上购得的肝炎疫苗, 例如 Engerix - B, 可产生很好的结果, 但已承认的事实是, 最适宜的疫苗不仅应激发中和的抗体, 而且应尽可能有效地激发通过 T - 细胞介导的细胞免疫。国际专利申请 WO93/19780 中公开了一些组合疫苗, 该组合疫苗是由基于一种乙肝表面抗原的乙肝成分、氢氧化铝和 3 - 去 - O - 酰单磷酸基脂类 A 组成。但未建议
20 一种含有磷酸铝的制剂。

出人意料之外的是, 本发明提供了一种制剂, 该制剂的有效性比 WO 93/19780 中所述的那些制剂的有效性高, 可达其 4 倍。

因此, 本发明提供了一种疫苗, 其含有乙肝抗原, 连同有 3 - 去 - O - 酰单磷酸基脂类 A(文中缩写为 MPL)以及磷酸铝。

25 前面已将 3 - O - 去 - 酰单磷酸基脂类 A(或 3 - 去 - O - 酰单磷酸基脂类 A)称作 3D - MPL 或 d3 - MPL, 来表明葡糖胺的还原性末端的第 3 位是去 - O - 酰的。至于制备, 参见 GB 2220211A。在化学性质上, 其为 3 - 去酰单磷酸基脂类 A 与第 4、5、6 位酰化了的链的混合物。文中将 3D - MPL(或 d3 - MPL)一词缩写成 MPL, 因为“MPL”是 Ribi Immunochem.,
30 Montana 的一个注册商标, Ribi 明确地用其来表示他们的 3 - O - 去酰单磷酸基脂类 A 产品。

优选在本发明的组合物中使用小颗粒的MPL。小颗粒MPL的颗粒大小通常小于120nm。这些制剂描述于国际专利申请NO.WO94/21292。

GB 2220211A 提到，在保留免疫原性特征的同时，降低了以前应用的肠细菌脂多糖(LPS)的内毒性。但是 GB 2220211 指出这些发现仅仅与细菌(革兰氏阴性菌)系统有关。

但意外的是，已发现本发明的含有乙肝抗原的疫苗组合物具有如文中所述的特别有利的特性。

特别有利之处在于，即使以非常低剂量的抗原，本发明的疫苗组合物也会非常有效地诱导防护性免疫。

10 该新疫苗制剂会使得有与目前可购得的乙肝疫苗制剂在两剂后的免疫原性促进作用相同的作用。特别是在人临床试验中，两剂疫苗后达到的抗体含量与3剂 Engerix - B 后的抗体含量相同。

其提供了极好的抗原性感染的保护作用，并且既有利地激发特异的体液(中和抗体)免疫应答，也有利地激发效应细胞介导(DTH)的免疫应答。

15 更重要的优点在于本发明的疫苗组合物也可被用作治疗用的疫苗。

以上定义的MPL通常以10 - 100 μ g的范围内的剂量存在，优选为25 - 50 μ g/剂，其中乙肝抗原通常以2 - 50 μ g/剂的范围内的剂量存在，并且磷酸铝以500 μ g(Al^{3+})/剂的范围内的剂量存在。

20 本发明的一个实施方案是下文所述的HBsAg抗原(例如 Engerix - B)与MPL及磷酸铝混合。

本发明的更特别的实施方案是如上文定义的(L*, S)颗粒的HBsAg抗原与MPL及磷酸铝混合。

25 本发明还有一个方面提供了文中所述的用于治疗、特别是用于治疗或预防肝炎感染的疫苗制剂。在一个优选的方面中，本发明的疫苗是一种可用于治疗正在发生中的乙肝感染的治疗疫苗。

在另一方面，本发明的肝炎疫苗组合物含有其他抗原，因而其能有效治疗或预防一种或多种其他细菌、病毒或真菌感染。

30 因此，本发明的一个实施方案的肝炎疫苗制剂至少含有一种选自其他抗原(特别是甲肝抗原)的其他成分或本领域中所知的提供保护作用以抗一种或多种以下疾病的非肝炎抗原，这些疾病如白喉、破伤风、百日咳、b型嗜血杆菌流感(Hib)以及脊髓灰质炎。还可以包括有抗脑膜炎A、B或C的抗原。

优选本发明的疫苗包含有如上文定义的 HBsAg。

在本发明的范围之内的特殊组合疫苗，包括 DTP(白喉-破伤风-百日咳)-乙肝组合疫苗制剂、Hib-乙肝疫苗制剂、DTP-Hib-乙肝疫苗制剂和 IPV(灭活的脊髓灰质炎疫苗)-DTP-Hib-乙肝疫苗制剂。

5 肝炎疫苗或上述组合物也可以有利地包括抗甲肝的保护性成分，特别是如存在于 Havrix 中的由 HM-175 菌株衍生的灭活减毒菌株。

用于这些疫苗的适宜成分早已可从市面上购得，并可从世界卫生组织获得详细资料。例如，IPV 成分可以是索尔克灭活脊髓灰质炎疫苗。包含有 3 种 B.百日咳抗原(69KDa、百日咳毒素(灭活了的)和丝状血凝素(FHA))的、与
10 白喉抗原和诸如 Infanrix DTPa 之类的破伤风抗原配制的百日咳疫苗可以包含有整个细胞或非细胞的产物。

在一个方面，本发明的肝炎或组合疫苗可以是儿科疫苗。

疫苗制备一般描述于“疫苗新动向和发展”(New Trend and Dertloptions in Vaccines)(由 Voller 等人编著，University Dark Press, Baltimore, Maryland
15 U.S.A 1978)。例如 Fullerton，美国专利 4235877 描述了在脂质体中的封装。还例如，Likhite，美国专利 4,372,945 以及 Armor 等人，美国专利 4474757 公开了蛋白质与大分子的缀合。

以一种在典型疫苗中诱导免疫防御反应而无重大、有害的副反应的剂量，来选择每一剂疫苗中的抗原的量。这一量会根据是使用哪一种特异抗原
20 来变化。通常可能每剂会含有 1-1000 μ g 的全抗原，优选 2-200 μ g。可通过涉及观察抗体效价和实验对象的其他反应的标准分析来确定特异疫苗的适宜剂量。在初次接种疫苗后，例如，在 2 和 6 个月后，实验对象可接受一或多次加强剂。

在本发明的另一方面，提供了一种制备能有效防御或治疗乙肝感染的疫
25 苗的方法，其中该方法包括将文中定义的肝炎抗原和磷酸铝以及 MPL 混合。

使用这种方法，优选将一或多种添加成份和 HBsAg 混合以生成组合疫苗。可以使用一些混合这些成分的方法。在一种方法中，可将各种抗原分别吸附到磷酸铝上，在一段时间后，于加入混合溶液之前，将 MPL 加入到各抗原上。

30 将了解到的是，本发明还提供了在易感染乙肝或正受乙肝感炎的人体内诱导 10mU 范围内的抗乙肝的中和抗体效价的方法，该方法是通过以不超过

在另一方面, 本发明提供了文中定义的组合物的用途, 即将其用来制备用于在人体内诱导效价在 10mU 范围内的抗乙肝的中和抗体的疫苗, 该诱导优选在不超过两剂后。

以下实施例说明了本发明及其优点。

5

实施例 1

乙肝疫苗制剂

MPL(3 - 去 - O - 酰单磷酸基脂类 A)从 Ribi Immunochem Research Inc 获得。磷酸铝从 Superphos (Denmark)获得。

10 将 MPL 以 0.2 - 3mg/ml 的变化浓度重悬于水中以用于注射, 通过声处理, 直至颗粒的大小达到如由光散射(photo correlation light scattering)测得的于 80 - 200nm 之间。

于室温下通过搅拌将 1 - 20 μ g 以 0.5 - 3mg/ml 浓度溶于磷酸缓冲液的 HBsAg(如 EngerixB 中的 S - 抗原)吸附到 5 - 1000 μ g 磷酸铝(3 - 6AL³⁺ * mg/ml 溶液)上, 持续 1 个小时。于室温下将该混合物存放 15 天, 然后, 于 15 再处理前将其保持在 4 °C 下。再将 5 - 200 μ g MPL(0.2 - 10mg/ml 的溶液)加入到该溶液中。用注射用水和盐水将体积和渗透性调节至 500 - 1000 μ l。加入硫柳汞(1 % W/V)至终浓度为 0.005 %, 以生成终产物。

通过将上文中定义的组合(L*, S)抗原用作 HBsAg 成分, 制备相似的制剂。在这一制剂中, 杀菌剂是 2 - 苯氧乙醇。

20

实施例 2

对用 3 - 去酰单磷酸基脂类 A 和磷酸铝配制的乙肝表面抗原的临床分析在临床试验中, 制备各种含疫苗的乙肝表面抗原。对以下各组进行了研究:

25 第 1 组: 在 1ml 中有 HBsAg(20 μ g)/MPL(50 μ g)/AlPO₄(Al:500 μ g)/硫柳汞(50 μ g)/150mM NaCl/pH6.1, 如实施例 1 中所述来制备。

第 2 组: 在 1ml 中有 HBsAg(20 μ g)/MPL(50 μ g)/Al(OH)₃ (Al:100 μ g)/硫柳汞(50 μ g)/10mM 磷酸缓冲液 + 150mM NaCl/pH6.8。

30 第 3 组: 在 1ml 中有 HBsAg(20 μ g)/Al(OH)₃ (Al:500 μ g)/硫柳汞(50 μ g)/10mM 磷酸缓冲液 + 150mM NaCl/pH6.8。

第 4 组: 类似 Engerix

第4组: 类似 Engerix

在1ml中有HBsAg(20 μg)/MPL(0 μg)/Al(OH)₃ (Al:500 μg)/
硫柳汞(50 μg)/10mM磷酸缓冲液 + 150mM NaCl/pH6.8.

第5组: 在1ml中有HBsAg(20 μg)/MPL(0 μg)/AlPO₄ (Al:500 μg)/

5 硫柳汞(50 μg)/150mM NaCl/pH6.1.

征召 18 - 40 岁的自愿者参加这次试验, 在第 0 天和 2 个月后对每一组 (于第 0 天, 每集约 60 位成年人) 于三角肌区肌肉内接种疫苗。在第一次注射前、第一次注射后 1 和 2 个月和第 2 次注射后的 1、2 和 4 个月时收集血样。用 AUSAB 试剂盒(Abbott)和校准的 WHO 基准, 以 mIU/ml 测量抗 HBs 的抗体。应答者效价 > 1mIU/ml。对于每一时间点, 计算血清转变体的几何平均效价(GMT)(Geometric Mean Titre).

结果

每种疫苗的 GMT 见表 1, 表 2 列出了各组接种者体内的抗体效价等级。

GMT 结果(表 1)清楚地表明: 在 2 剂含有 ALPO₄ + MPL(第一组)后, 与使用购买到的 Engerix B(第 4 组)所达到的效价相比, 在第 2 剂后观察到效价增加了 10 倍多。抗 - HBs 反应也快得多, 并且在第 1 剂后 1 和 2 个月时 51 % 和 70 % 的接种者具有保护性效价(与关于 Engerix B 的 34 % 和 16 % 相比)(表 2)。向 Engerix B(第 3 组)加入 3D - MPL, 只使用 ALPO₄(第 5 组)仅稍微增强抗 - HBs 反应(与 Engerix B 相比), 但效价比使用 ALPO₄ + MPL 剂型仍要低 4 - 5 倍。将 HBsAg 吸附到剂量减少的 Al(OH)₃ + MPL 产生的效价与使用 Engerix B 产生的效价相同。总之, 结果表明, 为了在 2 剂后在接种疫苗者体内的抗 - HBs 反应有一个最适宜的增加, AlPO₄ 和 MPL 都是必需的。

表 1

血清转化率(%)和血清转化物的抗 - HBs 抗体的几何平均效价(GMT):

25 初步分析

组别	时间	人数	血清 转化 阳性	%	GMT	置信 度低 于 95 %	置信 度高 于 95 %	最低 效价	最高 效价
1	注射前	59	0	0.0	0			0	0
	第一次注射	53	46	86.8	12	9	8	1	410

	后(第1个月)								
--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--

组别	时间	人数	血清 转化 阳性	%	GMT	置信 度低 于95 %	置信 度高 于95 %	最低 效价	最高 效价
	第一次注射 后(第2个月)	53	50	94.3	18	13	26	1	140
	第二次注射 后(第3个月)	53	53	100.0	2092	1356	3227	43	60000
	第二次注射 后(第4个月)	39	39	100.0	1613	1074	2423	40	19620
	第二次注射 后(第6个月)	25	25	100.0	890	582	1363	42	3900
2	注射前	59	0	0.0	0			0	0
	第一次注射 后(第1个月)	53	31	58.5	17	10	32	1	1000
	第一次注射 后(第2个月)	53	35	66.0	9	6	16	1	860
	第二次注射 后(第3个月)	53	35	100.0	215	128	360	1	25000
	第二次注射 后(第4个月)	40	40	100.00	122	74	201	2	2808
	第二次注射 后(第6个月)	22	22	100.0	85	50	145	2	900
3	注射前	59	0	0.0	0			0	0
	第一次注射 后(第1个月)	53	43	81.1	9	6	15	1	720
	第一次注射 后(第2个月)	53	44	83.0	7	4	10	1	1040

组别	时间	人数	血清转化阳性	%	GMT	置信度低于95%	置信度高于95%	最低效价	最高效价
	第二次注射后(第3个月)	53	53	100.0	527	332	838	3	10100
	第二次注射后(第4个月)	40	40	100.0	363	225	586	3	5638
	第二次注射后(第6个月)	24	24	100.0	177	99	316	9	2196
4	注射前	59	0	0.0	0			0	0
	第一次注射后(第1个月)	50	30	60.0	11	6	19	1	290
	第一次注射后(第2个月)	50	34	68.0	4	3	6	1	45
	第二次注射后(第3个月)	50	50	100.0	187	107	329	1	9500
	第二次注射后(第4个月)	42	42	100.0	211	127	350	5	10584
	第二次注射后(第6个月)	25	25	100.0	226	132	386	20	2595
5	注射前	59	0	0.0	0			0	0
	第一次注射后(第1个月)	52	30	57.7	12	6	25	1	1060
	第一次注射后(第2个月)	52	41	78.8	9	6	14	1	420
	第二次注射后(第3个月)	52	52	100.0	294	168	515	1	18000
	第二次注射后(第4个月)	41	41	100.0	287	158	521	2	15764
	第二次注射后(第6个月)	24	22	91.7	353	188	660	10	7701

表 2

个别抗-HBs 抗体效价分布的初步分析

组别	时间	人数	≥ 10 n	%	\geq 100· n	%	$> +$ 1000n	%
1	注射前	59	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	第一次注射后(第1个月)	53	27	50.9	2	3.8	0	0.0
	第一次注射后(第2个月)	53	37	69.8	2	3.8	0	0.0
	第二次注射后(第3个月)	53	53	100.0	49	92.5	40	75.5
	第二次注射后(第4个月)	39	39	100.0	37	94.9	27	69.2
	第二次注射后(第4个月)	25	25	100.0	24	96.0	15	60.0
	2	注射前	59	0	0.0	0	0.0	0
第一次注射后(第1个月)		53	20	37.7	3	5.7	1	1.9
第一次注射后(第2个月)		53	14	26.4	3	5.7	0	0.0

	第二次注射后(第3个月)	53	50	94.3	38	71.7	11	20.8
	第二次注射后(第4个月)	40	38	95.0	24	60.0	3	7.5
	第二次注射后(第6个月)	22	21	95.5	8	36.4	0	0.0
3	注射前	59	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	第一次注射后(第1个月)	53	17	32.1	7	13.2	0	0.0
	第一次注射后(第2个月)	53	17	32.1	1	1.9	1	1.9
	第二次注射后(第3个月)	53	51	96.2	45	84.9	20	37.7
	第二次注射后(第4个月)	40	39	97.5	34	85.0	10	25.0
	第二次注射后(第6个月)	24	23	95.8	18	75.0	3	12.5
4	注射前	59	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	第一次注射后(第1个月)	50	17	34.0	3	6.0	0	0.0

组别	时间	人数	> = 10 n	%	> = 100 n	%	> + 1000n	%
	第一次注射后(第2个月)	50	8	16.0	0	0.0	0	0.0
	第二次注射后(第3个月)	50	46	92.0	35	70.0	11	22.0
	第二次注射后(第4个月)	42	40	95.2	30	71.4	5	11.9
	第二次注射后(第6个月)	25	25	100.0	18	72.0	4	16.0
5	注射前	59	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	第一次注射后(第1个月)	52	15	28.8	5	9.6	1	1.9
	第一次注射后(第2个月)	52	20	38.5	3	5.8	0	0.0
	第二次注射后(第3个月)	52	48	92.3	39	75.0	14	26.9
	第二次注射后(第4个月)	41	39	95.1	31	75.6	9	22.0
	第二次注射后(第6个月)	24	22	91.7	18	75.0	5	20.8