

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580042407. X

[51] Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 11 月 21 日

[11] 公开号 CN 101076355A

[22] 申请日 2005. 11. 3

[21] 申请号 200580042407. X

[30] 优先权

[32] 2004. 11. 3 [33] US [31] 60/624,973

[86] 国际申请 PCT/US2005/039982 2005. 11. 3

[87] 国际公布 WO2006/062637 英 2006. 6. 15

[85] 进入国家阶段日期 2007. 6. 11

[71] 申请人 希龙公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 D·欧哈根

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范 征

权利要求书 2 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

流感疫苗

[57] 摘要

在传统上是通过肌肉内注射给予流感病毒。本发明的基础在于利用其他途径,更具体是不需要大剂量抗原的途径给予流感疫苗的设想。将流感病毒抗原递送给朗格汉斯细胞就是按照本发明选择的途径。已发现,这种途径特别适用于对流感病毒无免疫力(即,以前未产生针对流感病毒的免疫应答)的患者接种疫苗,这就意味着有利于免疫幼儿。

1. 一种免疫患者以抵抗流感病毒的方法,所述方法包括给予患者免疫原性组合物的步骤,其中

(a)所述患者对流感病毒无免疫力;

(b)所述免疫原性组合物包含流感病毒抗原; 以及

(c)所述免疫原性组合物被递送给患者的朗格汉斯细胞。 .

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述患者是 0-18 个月大的儿童。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述免疫原性组合物通过皮内注射、透皮注射或局部给药的方式递送给所述患者的朗格汉斯细胞。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述免疫原性组合物还包含佐剂。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述免疫原性组合物包含 15 μg HA/流感病毒株。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述免疫原性组合物包含 0.1-8 μg HA/流感病毒株。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述免疫原性组合物的体积为 0.05-0.5 ml。

8. 一种免疫患者以抵抗流感病毒的方法,所述方法包括给予患者免疫原性组合物的步骤,其中

(a)所述患者对流感病毒属无免疫力;

(b)所述免疫原性组合物包含流感病毒抗原; 以及

(c)所述免疫原性组合物被递送给患者的朗格汉斯细胞。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述患者对某种流感病毒亚型无免疫力。

10. 一种流感病毒抗原在制备用于免疫患者以抵抗流感病毒的药物中的应用,其中:

(a)所述递送装置包含免疫原性组合物;

-
- (b)所述免疫原性组合物包含流感病毒抗原；以及
- (c)所述递送装置适于将所述免疫原性组合物递送给朗格汉斯细胞。

流感疫苗

本文所引用的所有文献都已完整纳入本文作为参考。

发明领域

本发明涉及流感病毒疫苗。更具体地说，本发明涉及递送给朗格汉斯细胞的儿科疫苗。

发明背景

在过去，通常将流感疫苗给予流感感染会引起特别风险的患者，例如：患有哮喘、心脏病、镰刀形红细胞贫血、HIV 或糖尿病的儿童；所生活的家庭中有哮喘、心脏病、镰刀形红细胞贫血、HIV 或糖尿病患者的儿童；以及老年人。

近年来，有人建议应该将流感疫苗的接种范围扩大到所有儿童，而不仅仅是那些处于高风险中的儿童。然而，要想以这种方式提高覆盖范围就需要大大提高疫苗的生产能力，而疫苗生产商还没有达到这种要求。将疫苗储存起来也是不可能的，因为疫苗株每年都会发生变化，几乎得以即时的方式生产。

因此，需要扩充流感疫苗的可利用量，以满足增加的儿科疫苗需求量。

发明概述

虽然最近已经批准了鼻内疫苗用于人类，但是传统上流感疫苗都是通过肌肉内注射给予的[1]。本发明的基础在于利用其他途径，更具体是不需要大剂量抗原的途径给予流感疫苗的设想。将流感病毒抗原递送给朗格汉斯细胞就是按照本发明选择的途径。已发现，这种途径特别适用于对流感病毒无免疫力（即，以前未产生针对流感病毒的免疫应答）的患者接种疫苗，这就意味着有利于免疫幼儿。另外，与肌肉内注射相比，递送给朗格汉斯细胞可改善不同亚型免疫效应。

除了能够以给定量的抗原制备出更多的疫苗剂量之外,不采用肌肉内注射的方式意味着本发明避免了因流感疫苗接种而产生的疼痛,因此提高了患者的舒适性和依从性。

因此,本发明提供了一种免疫患者以抵抗流感病毒的方法,该方法包括将免疫原性组合物给予患者的步骤,其中:(a)患者对流感病毒无免疫力;(b)免疫原性组合物包含流感病毒抗原;和(c)免疫原性组合物被递送给患者的朗格汉斯细胞。

本发明还提供了流感病毒抗原在制备用于免疫患者以抵抗流感病毒的药物中的应用,其中:(a)患者对流感病毒无免疫力;和(b)药物用于递送给患者的朗格汉斯细胞。

本发明还提供了一种包含流感病毒抗原的免疫原性组合物,其中所述组合物适用于递送给朗格汉斯细胞。

本发明还提供了一种递送装置,其中:(a)该递送装置包含免疫原性组合物;(b)免疫原性组合物包含流感病毒抗原;和(c)该递送装置可用于将免疫原性组合物递送给朗格汉斯细胞。

患者

本发明涉及免疫对流感病毒无免疫力的患者。换言之,患者以前未产生针对流感病毒的免疫应答。患者以前未被流感病毒感染,也未进行抗流感病毒的免疫。因此,患者一般是0-18个月大的儿童,更一般0-12个月大的儿童,常常是0-6个月大的儿童。根据本发明,疫苗接种的最优选年龄是4-8个月,如5-7个月,或者约6个月大时。

在本发明的另外一个方面,患者以前可以产生过抗流感病毒的免疫应答,但是他们对所给疫苗的流感病毒属(即A型流感病毒或B型流感病毒)和/或亚型(H或N,特别是H亚型)无免疫力。这类患者可能是儿童(年龄在0月-12岁)、青少年(年龄在13-19岁),青年(年龄在20-35岁),中年人(年龄在36-64岁)或老年人(年龄在65岁或以上)。

患者可能已经接种了以下一种或多种(即1、2、3、4、5、6或7种)疾病的疫苗:白喉、破伤风、百日咳、b型嗜血流感杆菌(*Haemophilus influenzae*)、乙型肝炎病毒、脊髓灰质炎病毒和/或肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)。

一般来说,患者还未接种过麻疹、腮腺炎、风疹、水痘或甲型肝炎病毒的疫苗。

患者优选未患有哮喘、心脏病、镰刀形红细胞贫血、HIV 或糖尿病。类似地,患者所生活的家庭中最好没有患哮喘、心脏病、镰刀形红细胞贫血、HIV 或糖尿病的人。

流感病毒和流感病毒抗原

使用流感病毒抗原进行免疫以抵抗流感病毒的感染。作为抗原来源的特定病毒可以与保护作用所针对的特定病毒相同或不同,因为已知流感病毒,特别是同一病毒亚型的不同分离物之间能产生交叉保护作用。

另外,本发明还可以利用一种以上流感病毒的抗原进行免疫以抵抗一种以上流感病毒。流感病毒的疫苗株随季节而变化。在当前大流行间期,疫苗通常包含两株 A 型流感病毒(H1N1 和 H3N2)和一株 B 型流感病毒。因此,本发明所使用的抗原可以来自至少一株 A 型流感病毒和/或至少一株 B 型流感病毒。优选三价疫苗。本发明还可以使用大流行毒株的病毒,如 H2、H5、H7 或 H9 亚型病毒株,普通人群对这些病毒株没有免疫力。大流行情形下的疫苗可以是单价的,或者是添加大流行毒株的正常三价疫苗。

如果疫苗包含一种以上流感病毒毒株,那么不同的病毒株通常分别培养,在收获病毒和制备抗原后再混合起来。

应用于本发明方法中的流感病毒可以是重分类(reassortant)毒株,和/或通过反向遗传学技术获得的病毒。病毒可以是减毒的。病毒可以是温度敏感的。病毒可以是冷适应性的。也可以使用包含致病株来源的 HA 和/或 NA 病毒部分和非致病株(如 A/PR/8/34)来源的其余 6 个或 7 个部分的重分类病毒。

用于本发明免疫原性组合物中的流感病毒抗原可以是活病毒的形式,或者优选是灭活病毒的形式。病毒灭活通常包括用化学物质如甲醛或 β -丙内酯处理。如果使用的是灭活病毒,那么抗原可以是全病毒、裂解(split)病毒或病毒亚单位。裂解病毒可通过去污剂(如乙醚、聚山梨醇酯 80、脱氧胆酸、三-N-磷酸丁酯、Triton X-100、Triton N101、溴化十六烷基三甲基铵等)处理病毒粒子以制备亚病毒粒子制备物来获得。亚单位疫苗包含

流感表面抗原血细胞凝集素和神经氨酸酶中的一种或两种。也可以病毒体的形式递呈流感抗原[2]。

如果抗原是用流感病毒制备的（即，不是在没有流感病毒生长的重组或合成系统中制备的），那么可在卵上或细胞培养物中培养病毒。在无特定病原体的含胚卵内培养病毒是培养用于制备疫苗的流感病毒的传统途径，细胞培养则是最近发展起来的方法。如果利用细胞培养，那么通常在哺乳动物细胞上培养流感病毒疫苗，这些细胞如 MDCK 细胞[3-6]、Vero 细胞[7-9]或 PER.C6 细胞[10]。这些细胞的获得渠道很多，如美国典型培养物（ATCC）保藏中心[11]或 Coriell 细胞库[12]。例如，ATCC 供应各种不同的 Vero 细胞，其目录号为 CCL-81、CCL-81.2、CRL-1586 和 CRL-1587，ATCC 还提供 MDCK 细胞，目录号为 CCL-34。也可能在鸟类细胞系[如参考文献 13]，包括鸡来源的细胞系如鸡胚成纤维细胞（CEF）上培养病毒。

免疫原性组合物或药物组合物

本发明的免疫原性组合物和药物组合物适于给予患者的朗格汉斯细胞。这可通过各种途径来实现，其中包括而不限于：皮内注射[14,15]；透皮给药[16]；以及局部给药。这些途径可与皮肤磨损联合使用，如通过砂纸或使用微磨粉进行皮肤磨损。

本发明的免疫原性组合物和药物组合物优选以疫苗的形式递呈。

本发明的组合物可包含佐剂。已用于流感疫苗中的佐剂包括铝盐[17,18]、壳聚糖[19]、CpG 寡脱氧核苷酸如 CpG 7909 [20]、水包油乳剂如 MF59 [21]、水包油包水乳剂[22]、大肠杆菌(*E. coli*)不耐热毒素[23,24]及其解毒突变体[25,26]、单磷酸脂质 A[27]及其 3-o-脱酰衍生物[28]、百日咳毒素突变体[29]、胞壁酰二肽[30]等。在用于递送给朗格汉斯细胞时，不优选通过物理机制来发挥功能的佐剂（如乳剂和铝盐）；相反，优选使用免疫增效性佐剂，例如，通过结合于细胞表面受体而发挥功能的佐剂，如 CpG 寡脱氧核苷酸。

血细胞凝集素(HA)是灭活流感疫苗中的主要免疫原，疫苗的剂量可通过参考 HA 水平进行标准化，HA 水平通常通过单向辐射状免疫扩散（SRID）试验来定量[31,32]。用于肌肉内注射的疫苗通常包含约 15 μ g HA/株，尽管也可采用较低的剂量（如用于儿童或在大流行的情况下），也可

使用分数剂量如 1/2 (即, 7.5 μg HA/株)、1/4 或 1/8 剂量[17,33]。但是, 给予朗格汉斯细胞时不需要像肌肉内注射那么多的抗原, 因此, 本发明组合物所包含的 HA 一般为每株流感病毒 0.1-8 μg , 优选约 7.5、5、3、2.5、2、1.5、1、0.75、0.5、0.4、0.2 μg 等。

用于肌肉内注射的疫苗体积一般为 0.5 ml。但是, 给予朗格汉斯细胞时不需要像肌肉内注射那么大的体积, 因此, 本发明的组合物的体积一般为 0.05-0.5 ml, 如 90 μl -250 μl 之间。

该组合物还可以包含防腐剂如柳硫汞或 2-苯氧乙醇。但是, 优选的组合物应该基本不含(即, 低于 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)含汞材料, 如无柳硫汞的材料[34,35]。更优选不含汞的疫苗。

如果流感病毒是在细胞培养物上培养的, 那么, 每剂量中本发明组合物内所残存的宿主细胞 DNA 优选少于 100 pg, 但允许有痕量的宿主 DNA 存在。可在疫苗制备过程中通过标准的纯化方法如色谱方法等去除污染的 DNA。通过核酸酶处理如采用 Benzonase™ DNA 酶[36]处理可进一步去除残存的宿主细胞 DNA。优选每 10 μg 血细胞凝集素含有<100 pg 宿主细胞 DNA 的疫苗, 也优选每 0.25 ml 体积内含有<100 pg 宿主细胞 DNA 的疫苗。更优选每 50 μg 血细胞凝集素含有<100 pg 宿主细胞 DNA 的疫苗, 也更优选每 1 ml 体积内含有<100 pg 宿主细胞 DNA 的疫苗。

本发明的疫苗可以单剂量免疫方案递送。或者, 本发明的疫苗也可作为初始免疫-加强免疫的方案的基本单元递送(这意味着在第一次免疫后数周或数月内进行抗原性相似的第二次免疫)。

递送给朗格汉斯细胞

朗格汉斯细胞是高度特化的髓样抗原提呈细胞(APC), 定位在皮肤、粘膜和淋巴组织内。朗格汉斯细胞起源于骨髓, 然后迁移到表皮, 在这里形成规则有序的网状结构, 密度可达 700-800 个细胞/ mm^2 , 可覆盖人体皮肤总表面积的 25%。在电子显微镜图象中可以很容易地识别这种细胞, 因为它们包含类似于网球球拍的特征性细胞内胞浆细胞器, 被称为“朗格汉斯-颗粒”或“Birbeck 颗粒”。朗格汉斯细胞富含 MHC II 类分子。它们可以特异性地活化休眠的 T 辅助细胞, 从而触发 T 细胞依赖的初级免疫应答。细胞与抗原接触以后离开表皮, 通过淋巴系统到达淋巴结。细胞在其旅程

中经历了成熟过程，最后将抗原提呈到细胞表面。迁移的细胞被相应数量的来自于骨髓的新朗格汉斯细胞替代。在淋巴结中，成熟的朗格汉斯细胞活化其表面有相匹配的抗原特异性受体的 T 辅助细胞。它们以这种方式控制免疫系统的反应。

本发明主要涉及向表皮内的朗格汉斯细胞递送抗原。表皮是皮肤的外层，共有 5 层，分别是（从内向外）：基底层、表皮生发层、颗粒层、透明层和外面的角质层。朗格汉斯细胞主要位于表皮生发层内，位于角质层之下。

可使用各种传递装置通过各种方式实现向朗格汉斯细胞递送。优选递送到表皮内，尽管递送到真皮内（如真皮内递送）也可以使其与朗格汉斯细胞接触。

可使用能在皮肤角质层上产生微孔（“微穿孔”）的装置实现递送。这种装置包括在施用到皮肤上时能无痛地在角质层上产生微孔而不引起出血的显微结构（有时被称为显微针，这是目前本领域接受的称谓[37-40]）（如 3M 的 Microstructured Transdermal System，NanoPass 的 Micropylamid™ 系统等）。显微针可单根使用，也可多根使用（如以阵列的方式[41]）。显微针可在角质层上开孔，尺寸大小各异，如 25 μm 到 1 mm 长的孔。优选的是，显微针要足够小，以致于不会刺到真皮内，因此不会达到神经末梢，这样可以避免产生疼痛的感觉。结构可以是实心的（作为应用抗原前的预处理）、在针的外面直接包被抗原的实心针、或者空心针以便于使液体通过针头进入下表皮。它们可用各种材料制备，其中包括而不仅限于：硅、可生物降解的聚合物、金属（如不锈钢、金等）和玻璃。可生物降解的聚合物是安全的，即使针头在插入时突然折断。与无微孔的正常皮肤相比，这些装置产生的微孔可以使皮肤对药物扩散的阻力降低[42]，研究表明，这种系统可大大提高（高达 100,000 倍）大分子通过皮肤的渗透能力[43]。可通过振动来降低插入阻力[44]。

相似地，也可采用微粒轰击(microprojection)阵列系统（如 Alza 的 Macroflux™ 系统）。轰击物(projection)的长度约为 100-500 μm ，每平方厘米有 50-500 个微轰击物，覆盖 1-2 cm^2 的面积，轰击物一般都包被有抗原。这些系统递送的蛋白量可高达 80 μg ，平均深度为 100 μm ，深度不超过 300

μm [45]。递送速率可高达 5 秒内 20 μg 。抗原可以与佐剂或不与佐剂一起干包被。

也可采用微磨损系统。

可用激光系统消除表皮层的角质层[46]。在使用显微针时，消除区对药物扩散的阻力要低于非消除区。

也可用离子电渗和超声促渗增加透过角质层的流量。这些系统可明显增强皮肤的渗透性，其中包括对蛋白质的渗透性[47,48]，尤其是在无毛发时。

任选地，可以在给予组合物前(例如)用砂纸磨损皮肤。

因此，可以通过真皮内给药、透皮给药、表皮给药、局部给药（特别是在磨损后）等将组合物递送给朗格汉斯细胞。因而本发明的运送装置包括适于通过这些途径进行递送的装置。

免疫原性试验

测定流感疫苗免疫原性的方法是本领域所熟知的。一种方法包括如下步骤：(a)在接种前，从患者体内取 10 ml 静脉血样，一般是从手臂上取，用于循环系统抗 HA 抗体基线水平的滴定；(b)然后患者立即接受一个剂量的疫苗，如果给予手臂，那么应该给予采血手臂的对侧手臂上；(c)接种后约 3 周，从患者体内取 10 ml 血样。从血样中分离血清，储存在（如果需要） -20°C 。通过血凝抑制反应(HI [49])或单向辐射状溶血(SRH[50,51])分析血清中相关毒株的抗血细胞凝集素抗体。从公共参考实验室可获得阳性和阴性血清以及参考制备物。一式两份地进行抗体滴定，接种前和接种后血清同时滴定。每个样品的滴度取两个独立测定值的几何平均值（但是，为了便于计算，在标准条件下 <10 的 HI 结果（=无法检测的）表示为 5，阴性 SRH 结果表示为 4 mm^2 ）。

在 HI 试验中，血清转化对应于接种前后滴度比 >40 及抗体滴度明显升高（如至少 4 倍）。在 SRH 试验中，血清转化对应于接种后面积 $\geq 25\text{mm}^2$ ，至少等于接种前面积的 50%。

根据参考文献 52 所描述的试验，本发明的优选疫苗可导致患者发生血清转化。

通用术语

术语“包含”涵盖“包括”以及“由...组成”，如组合物“包含”X是指仅由X组成，或者可以包含其他物质，如X+Y。

与数值x相关的术语“约”指(例如) $x \pm 10\%$ 。

术语“基本上”并不排斥“完全”，例如，“基本上不含”Y的组合物可以是完全不含Y。在需要时，术语“基本上”可以从本发明的定义中删除。

有关流感疫苗的其他一般信息，其中包括毒株、用于培养的细胞系、剂量、组合、制剂等都可参见参考文献 53 的 17 和 18 章。有关流感病毒的其他详细信息，包括在病毒生长过程中的生命周期的细节，都可参见参考文献 54 的 46 章。

实施本发明的方法

儿科免疫

由流感毒株 A/New Caledonia/20/99 (H1N1)、A/Wellington/1/2004 (H3N2) 和 B/Shanghai/361/2002 制备三价疫苗。这些是在 2005 年冬季于南半球选择的三株原型毒株。疫苗包含来自于三株病毒的纯化表面抗原，对于每个毒株来说，标准化后每个剂量内所含的 HA 为 2.5 μg 。疫苗包含铝佐剂，但是不含防腐剂。将疫苗施涂到微粒轰击阵列装置的针尖上。

选择从未患过流感的儿童接受本发明的免疫接种。选择患者手臂上相对无毛发的皮肤块，将显微针装置放置到该皮肤块上。对于某些儿童来说，在放置装置前将皮肤轻微磨损。按照参考文献 52 所描述的方法检测免疫前后的血清。

成人免疫

由 A/Hong Kong/213/2003 毒株来源的 H5N1 重分类毒株制备单价疫苗。疫苗含有来自病毒的纯化表面抗原，对于每个毒株来说，标准化后每个剂量内所含的 HA 为 2.5 μg 。疫苗包含铝佐剂，但是没有防腐剂。将疫苗施涂到微粒轰击阵列装置的针尖上。

选择每年被常见的 H1N1 和 H3N2 流感毒株至少感染两次的 50-60 岁的成年人接受本发明免疫接种。选择患者手臂上相对无毛发的皮肤块，将显微针装置放置到该皮肤块上。对于某些患者来说，在放置装置前将皮肤轻微磨损。按照参考文献 52 所描述的方法检测免疫前后的血清。

应当理解,上面只是以实施例的方式来描述本发明,可以在本发明的范围和构思内对本发明作出修改。

参考文献(其内容已纳入本文作为参考)

- [1] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)* 43:728-30.
- [2] Huckriede 等(2003) *Methods Enzymol* 373:74-91.
- [3] WO97/37000.
- [4] Brands 等(1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- [5] Halperin 等(2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [6] Tree 等(2001) *Vaccine* 19:3444-50.
- [7] Kistner 等(1998) *Vaccine* 16:960-8.
- [8] Kistner 等(1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.
- [9] Bruhl 等(2000) *Vaccine* 19:1149-58.
- [10] Pau 等(2001) *Vaccine* 19:2716-21.
- [11] <http://www.atcc.org/>
- [12] <http://locus.umdnhj.edu/>
- [13] WO03/076601.
- [14] Halperin 等(1979) *Am J Public Health* 69: 1247-50.
- [15] Herbert 等(1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
- [16] Chen 等(2003) *Vaccine* 21:2830-6.
- [17] Hehme 等(2004) *Virus Res* 103:163-71.
- [18] 美国专利 6372223.
- [19] 美国专利 6534065.
- [20] Cooper 等(2004) *Vaccine* 22:3136-43.
- [21] Frey 等(2003) *Vaccine* 21:4234-7.
- [22] Bozkir 和 Hayta (2004) *Drug Target* 12:157-64.
- [23] Zurbriggen 等 (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
- [24] Guebre-Xabier 等(2003) *J Virol* 77:5218-25.
- [25] Peppoloni 等(2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-93.
- [26] Pine 等(2002) *J Control Release* 85:263-70.
- [27] Baldridge 等(2000) *Vaccine* 18:2416-25.

- [28] WO94/19013.
- [29] EP-A-0721782.
- [30] 美国专利 5292506.
- [31] Williams (1993) *Vet Microbiol* 37:253-262.
- [32] Fitzgerald 和 Needy (1986) *Dev Biol Stand* 64:73-79.
- [33] WO01/22992.
- [34] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.
- [35] WO02/097072.
- [36] 美国专利 5,948,410.
- [37] 美国专利 6,334,856.
- [38] 美国专利 6,503,231.
- [39] 美国专利 6,611,707.
- [40] Lee 等(2003) *Lab Chip*. 3:164-7.
- [41] WO02/085446.
- [42] Sebastien 等(1998) *J Pharm Sci* 87:922-5.
- [43] Barry BW (2001) *Eur J Pharm Sci* 14: 101-14.
- [44] Yang 和 Zahn (2004) *Biomed Microdevices* 6:177-82.
- [45] Matxiano 等(2002) *Pharmaceutical Research* 19:63-70.
- [46] Lee 等(2002) *J Pharm Sci* 91:1613-26.
- [47] Alain 等(2002) *J Controlled Rel.* 81:113-9.
- [48] Santi 等(1997) *Pharm Res.* 14:63-6.
- [49] Palmer 等(1975) 《免疫学诊断的高级实验技术》 (Advanced laboratory technicals for immunological diagnostic), 美国卫生署编, Welfare, P.H.S., Atlanta; Immunology ser. Nr. 6 程序指导, 第2部分: 血凝抑制试验, 1975, 25-62.
- [50] Schild 等, 单向辐射状溶血: 分析流感病毒血细胞凝集素抗体的新方法 (Single radial haemolysis: a new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin) . *Bull. WHO.* 1975, 52, 43-50.

[51] Aymard 等, Diagnostic serologique rapide de la grippe par la methode d'hemolyse radiale modifiee et evolution des anticorps. *Path. Biol.* 1980, 28, 第 8 期, 535-539.

[52] 《调和流感疫苗的要求的指南》(*Note for guidance on harmonisation of requirements for influenza vaccines*). CPMP/BWP/214/96.

[53] 《疫苗》(*Vaccines*), Plotkin 和 Orenstein 编辑, 第 4 版, 2004, ISBN 0-7216-9688-0.

[54] Knipe 和 Howley, 《病毒学领域》(*Fields Virology*) (第 4 版, 2001), ISBN 0-7817-1832-5.