

b 型嗜血性桿菌結合疫苗的免疫性與檢驗分析

李 啟 仁

美國食品藥物管理署生物製劑評鑑研究中心

摘 要

在美國以及世界各地, b 型嗜血性桿菌(Hib)感染是產生細菌性腦膜炎最主要的病因。此菌並且引起肺炎、骨髓炎、細菌血病, 會厭炎與膿毒性關節炎等疾病。許多生存者會導致聽力缺陷, 智力減退之永久性後遺症。

莢膜性多糖類(PRP)為該菌所具有的主要致病毒素, 而 PRP 多糖類抗體為產生血清殺菌作用的重要因素。PRP 是胸腺細胞非依存性抗原, 不需要 T 助理細胞之作用就可刺激 B 細胞的免疫反應。將 PRP 多糖類與蛋白質, 以化學作用結合時可將多糖類抗原之胸腺細胞非依存性變成依存性, 而增加免疫反應。

現在有三種 Hib 蛋白質結合疫苗, 利用不同的方法製造; 即使用不同的蛋白質媒體, 多糖類分子大小, 化學結合, 以及蛋白質與多糖類的比例: (1) Connaught 藥廠將白喉變性毒素結合到 Hib 多糖類; (2) Praxis 藥廠將變異的白喉毒素, CRM197, 結合到分子較小的 Hib 多糖類; (3) MSD 藥廠則使用 40KD 腦膜炎外表細胞膜蛋白質, 以特殊的化學反應結合到 Hib 多糖類。Praxis 和 MSD 藥廠製備的結合疫苗對 2~6 個月以上的嬰孩產生免疫反應。Connaught 藥廠所製的疫苗對 18 個月以上的嬰孩可產生免疫抗體, 所有的結合疫苗皆不產生顯著的副作用。

Hib 結合疫苗的管制檢驗可分為二階段: (A) 各批的多糖類要檢驗 (1) 化學成份, 例如 ribose, 與磷含量; (2) 細胞摻雜物質, 例如蛋白質, LPS 與核酸。蛋白質媒體要檢查其純度, 以及 LPS, 核酸之摻雜物, 熱原物質試驗。濃縮半製品要檢驗游離的 ribose 含量, 多糖類與蛋白質之比例, 分子大小, 以及 LPS 之摻雜, 熱原物質試驗。(B) 最終疫苗含有 10~15 μ g PRP 劑量。此製品要檢查鑑定分析, Hib 糖類的含量測定, 游離 ribose, 游離蛋白質的含量, LPS 之摻雜, 以及無菌試驗, 一般安全性試驗與熱原物質試驗。

Hib 結合疫苗的接種對於幼小兒童可防禦 Hib 的感染疾病。應用同樣的接種策略與化學合成技術, 將可防禦由其他莢膜性病原菌所引起的疾病。

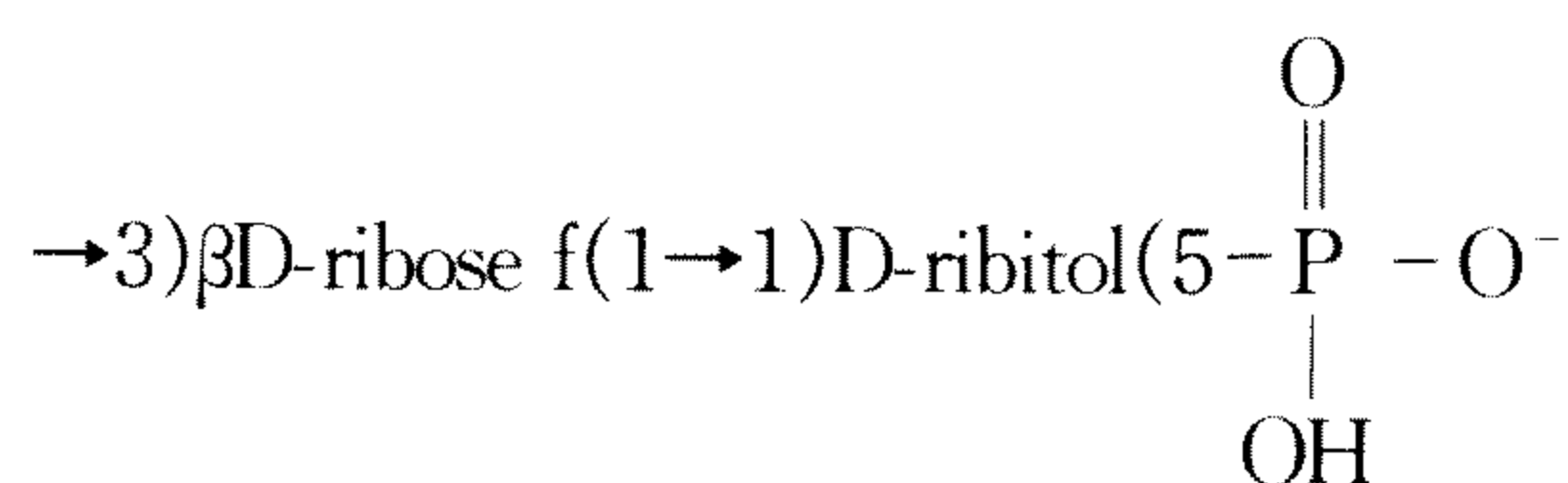
前 言

在美國, b 型嗜血性桿菌 (*Haemophilus influenzae* type b, Hib) 是引起 5 歲以下小孩感染的主要病原體。每年發生 20,000 人以上的致病率, 重要的感染疾病為腦膜炎, 約佔小孩病患的 60%, 死亡率為 3-6%, 生存者的 20-30% 會引起聽力缺陷, 智力減退等的永久性後遺症。還包括肺炎、骨髓炎、細菌血病、會厭炎、以及膿毒性關節炎等, 其中 1000~2000 人將導致死亡⁽¹⁻⁴⁾。雖然有效的抗生素被廣用, Hib 感染疾病仍然引起嚴重的

死亡率與致病率。更且, 此菌對於胺苄羧黴素 (Ampicillin) 以及氯黴素 (Chloramphenicol) 等抗生素產生抵抗力。為了減低感染疾病的發生率, 在 1985 年美國藥廠發展了 Hib 多糖類疫苗, 使用在 2 歲以上小孩的預防接種。更且, 在 1987 年 FDA 核准了更為有效的 Hib 結合疫苗, 使用在 18 個月以上的小孩。於 1990 年, 二個藥廠的疫苗被 FDA 批准可使用在二個月以上的小孩。這樣, Hib 疫苗就被有效率地應用於感染疾病的預防控制。

為了要區別病毒流行性感冒的 *Influenzae* 與細菌性的 *Haemophilus influenzae*, 該疫苗就稱為 *Haemophilus Conjugate Vaccine*。

Haemophilus influenzae 是革蘭氏陰性細菌，依照其莢膜性多糖類可分為 a, b, c, d, e, f6 型。其中 a, b, c, 和 f 型含有 Phospho diester linkage, 用以連接多糖類單位^(5,6)。在 6 型中只有 b 型會引起人體的感染疾病⁽⁷⁾。這化學構造式表示如下⁽⁸⁾：



如果在構造單位末端的磷酸鹽基與鄰近，ribitol 的 hydroxyl group 形成內部環狀 ester 構造時，很容易受到酸性或鹼性的水解作用而分解，變成不穩定的化學性質⁽⁹⁾。多糖類抗原的免疫反應跟其分子的大小密切關係；分子愈大則愈能產生最高的抗體濃度。在臨床試驗，使用大分子 Hib 多糖類疫苗，比使用小分子抗原疫苗獲得更高的血清抗體反應⁽¹⁰⁾。

由多糖類抗原所產生的抗體對病原細菌將產生免疫抵抗力。此抗體可從母體的胎盤轉移到胎兒，或在個體發育中漸漸產生。在 6 歲以上的兒童，約 95% 人中皆產生自然免疫抗體。這種自然抗體可能是由非病原細菌所具有免疫相互性 (Cross-reactive) 的多糖類抗原刺激而產生^(11,12)，例如 *E. coli* K100 持具跟 Hib 多糖類相同的化學成份，只有 ribose 和 ribitol 中的連接構造不同⁽¹³⁾。在實驗動物以及人體投與 *E. coli* K100 菌時會產生特異性抗體，並可預防細菌所引起的感染疾病^(14,15)。防禦感染疾病所需要的最低血清抗體濃度大約為 0.15μg/ml。因為抗體濃度在嬰兒，小孩比較急速降低，通常血中抗體需要維持在 1μg/ml 的濃度⁽¹⁶⁻¹⁹⁾。在 18 個月以下年齡的小孩顯示最高的腦膜炎感染率，亦對多糖類產生較弱的免疫反應⁽²⁰⁾。許多多糖類抗原皆不產生第二次接種的抗體增強反應 (Booster response)。

具有特殊免疫性質之胸腺非依存性多糖類抗原

胸腺依存性 (T-cell dependent, TD) 與胸腺非依存性 (T-independent, TI) 抗原的主要區別在於 TI 抗原不需要 T 淋巴球助理細胞 (T-helper cells) 協助產生抗體。T-helper cells 對於免疫反應具有重要調節作用，包括：

(一) 協助 B 淋巴球細胞生抗體。

(二) 將 IgM 抗體轉變成為 IgG 抗體。

(三) 調節抗體使其成為具有特殊的生物作用；例如，殺滅細菌體 (bactericidal)，增強結合力 (avidity) 等。

(四) 引起二次接種時之免疫記憶，或增強作用。TD 抗原主要為蛋白質分子。

TI 抗原可分為二型：^(21,22)

第一型 TI 抗原對於 CBA/N 鼠類會產生抗體反應，例如，小分子量附著體與 *Brucella abortus* 的結合抗原⁽²³⁾，LPS 等。第二型 TI 抗原則對此鼠類不產生抗體，而刺激較晚成熟 B-cells (Late maturing B-cells) 產生抗體。幼鼠對於此抗原要到 8 星期年齡發育成熟時才產生顯著的抗體反應^(24,25)。例如，Hib 肺炎球菌，以及其他細菌性多糖類^(26,27) 皆為 TI 抗原。這是由於新生幼鼠以及含有性欠陷變異體 (Sex-linked defective, Xid mutant) 的 CBA/N 鼠類皆缺少具有 Lyt5 表面抗原的 B 淋巴球細胞所致⁽²⁸⁾。此外，幼小動物的免疫反應受到抑制 T 細胞 (Suppressor T cell) 的調節管制作用。這種 T 細胞在幼小動物佔有較顯著的功能。相反地，具有輔助作用的 T 細胞 (Amplifier T cell) 發育較晚，要到 8~10 星期年齡 (白鼠) 才會成熟⁽²⁹⁾。TD 和 TI 抗原的性質表示於表一。

Hib 多糖類對於人體會刺激產生 IgM 以及 IgG1, IgG2 抗體，而 Hib 結合抗原主要產生 IgG1 抗體。TI 多糖類抗原具有下列的特性：

(一) 在幼小動物及人體產生較弱的免疫反應。隨著發育年齡的增加其免疫反應亦將增加。

(二) 所產生的抗體濃度變化大，產量不一致。

(三) 所產生的抗體種類主要屬於 IgM 以及 IgG。

(四) 缺乏反覆接種時引起之免疫記憶，或增強作用。

(五) 普通所使用的佐劑 (Adjuvant) 不產生效用。

先天性無胸腺的裸鼠 (Athymeric nude mice) 缺少 T 細胞，而對 TD 抗原不產生免疫反應。因此可使用此動物來區別 TD 和 TI 抗原。

為了使多糖類疫苗對於嬰孩，兒童能增強免疫反應，多糖類抗原可結合蛋白質分子，將 TI 性質變成胸腺依存性，使成為更為有效的疫苗。Hib 結合疫苗乃首次創製之多糖類—蛋白質結合疫苗。蛋白質媒體 (Carrier) 會被巨噬細胞 (Macrophage) 以及 T 細胞所認定，識別，將抗原帶到產生抗體的 B 細胞免疫系統。結合疫苗具有下列特性：

Journal of Food and Drug Analysis. 1993. 1(2)

Table 1. Characteristics of T-Dependent and T-Independent Antigens.

Characteristics	T-dependent	T-independent (type 2)
Helper T Cells activation	++	-
IgM to IgG class switch Predominant antibody	+ IgG1	- IgM
Booster response	++	-
Affinity maturation	+	-
Immune response in young children CBA/N mice	High +	Low -
Immune response to athymic nude mice	-	+
Requirement of $\text{Iy}b5^+$ mature B cells	-	+
Development of antibody response	At birth	3-18 months of age in humans; 3-6 weeks in mice
Example	Protein antigens or hapten-protein carrier conjugate	TI-1: Hapten conjugated to <i>Brucella abortus</i> TI-2: Bacterial polysaccharides

(一)使多糖類抗體的產量增加，特別在小孩的接種。

(二)反覆注射時可產生免疫增強作用。

(三)刺激免疫系統的成熟，而產生主要為 IgG 的抗體反應。

(四)事先，或同時注射媒體蛋白質時會刺激 T 細胞的增殖，因而加強，增進結合疫苗達到最高的免疫反應。此作用稱為媒體效果(Carrier effect)。

多采多姿的多糖類—蛋白質結合疫苗化學合成

一、Connaught Laboratories 製造的 PRP-D 結合疫苗。

Connaught 藥廠所製備的 PRP-D 疫苗使用白喉毒素蛋白質當做媒體，結合到經過加熱處理所形成較小分子的 PRP 多糖類。蛋白質媒體籍 Corbodiimide 的作用先連接到 adipic acid hydrazide 中間體(Spacer)，然後將此化合物跟多糖類反應而形成結合體。蛋白質與多糖類的重量比例為 1.5 到 2.0 其化學反應表示於圖一

PRP-D 結合疫苗在各種動物，包括兔子，白鼠，猴類以及 70,000 以上的人群試驗了免疫反應。不同於 PRP 多糖類的低免疫反應，PRP-D 抗原產生顯著的 T 細胞依存性免疫效果。新產生的抗體對於幼小鼠類亦引起吞噬細菌，殺滅抗菌作用⁽³⁰⁻³²⁾。在人體的接種產生 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的高血清濃度，而產生限少的副作用。⁽³³⁾

對於 2~30 個月年齡小孩曾做了廣泛的免疫性以及安全性試驗。雖然結合疫苗的免疫反應比較注射 PRP 抗原的對照群增加 20 倍，卻觀察到由不同年齡所產生抗體濃度的變異。PRP-D 疫苗對於所有不同年齡的小孩皆產生反覆注射時之免疫增強效果，主要產生 IgG 抗體。血中抗體濃度在一年之後漸漸減低，但是維持在高於沒有接種者，或接種 PRP 的小孩⁽³⁴⁾。

PRP-D 疫苗在 1987 年獲得 FDA 的批准使用於 18 個月年齡以上小孩的接種。與 PRP 多種糖類相比較，結合疫苗具有相同的安全性，但是其免疫反應則更為增加。於芬蘭所做的臨床試驗，30,000 嬰孩在 3, 4 和 6 個月年齡投與 3 劑量之 PRP-D 和 PRP 疫苗的試驗結果顯示結合疫苗

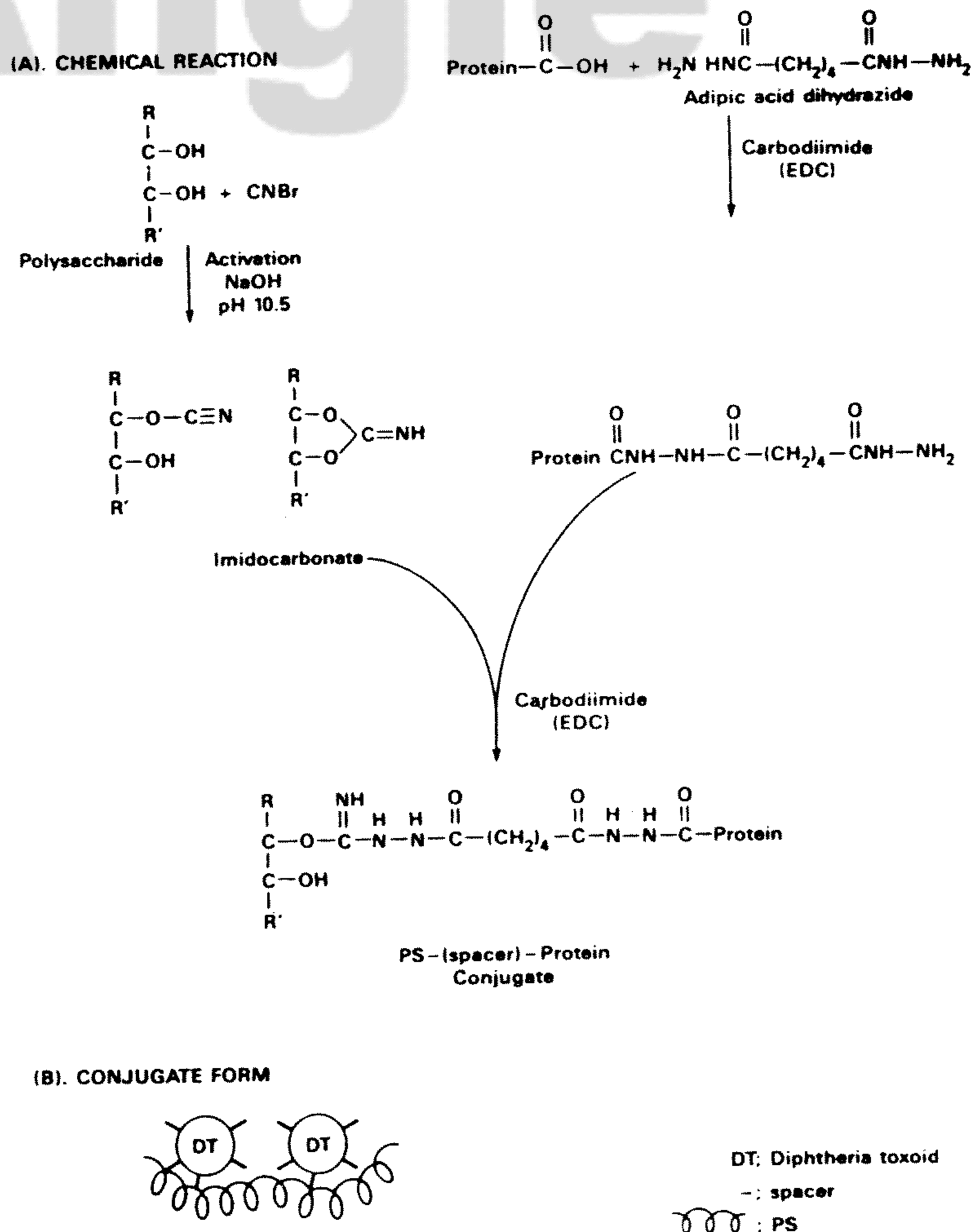
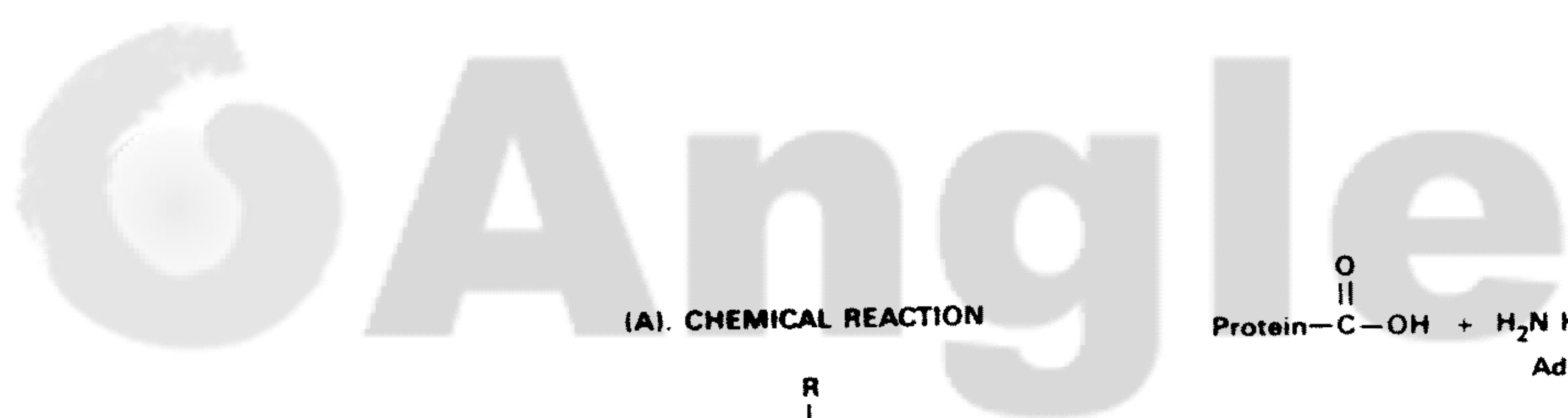


Figure 1. Preparation of polysaccharide – protein conjugate by coupling reaction

具有 87% 的防禦有效性。關於免疫性維持時間之多久，現在尚不十分清楚。

二、Praxis Biobogics 所製的 HbO-DT (CRM 197) 結合疫苗。

Praxis 製造疫苗的方法與前述的方法有顯著的不同。

(一) 該方法不使用連接 PRP 與蛋白質的中間體 (Spacer)；蛋白質直接結合於多糖類。

(二) 所使用的多糖類分割成為約 20 個多糖類單位之 Oligosaccharide (OS)。以小分子的 OS 結合到蛋白質時，更能表現免疫杭原因素 (Immunologic determinant) 而為 T 細胞所認識，接受，作用。

(三) 以白喉性毒素 CRM197 做為蛋白質媒介體。

(四) 化學合成方法應用 Reductirue amination 以結合多糖類與蛋白質，而形成高度交互連

接的化學構造 (圖二)。

Praxis 結合疫苗在 2 個月年齡之嬰孩注射三注劑量時，產生高濃度的血清抗體。反覆注射時產生免疫記憶，增強效果。該疫苗的安全性與其他藥廠製造的結合疫苗相似，副作用輕微，並無嚴重的發燒，或局部反應^(35,36)。

三、Merck Shanp and Dohme (MSD) 所製的 PRP-OMP 結合疫苗。

MSD 藥廠所製的結合疫苗果有幾點特色：

(一) 所使用的蛋白質媒體為腦膜炎球菌，B 群第二型菌株的 40,000 分子量外表細胞膜蛋白質 (Meningococal Oute membrane Protein, OMP)。選擇此蛋白質的原因是 PRP 與此蛋白質的結合疫苗會產生高濃度的血清抗體，另外，B 群腦膜炎球菌的多糖類抗原不能對人體產生有效的抗體，因此，希望以腦膜炎球菌的蛋白質抗原來防禦此菌所引起的腦膜炎。對於後者之目的，現在還

Journal of Food and Drug Analysis. 1993. 1(2)

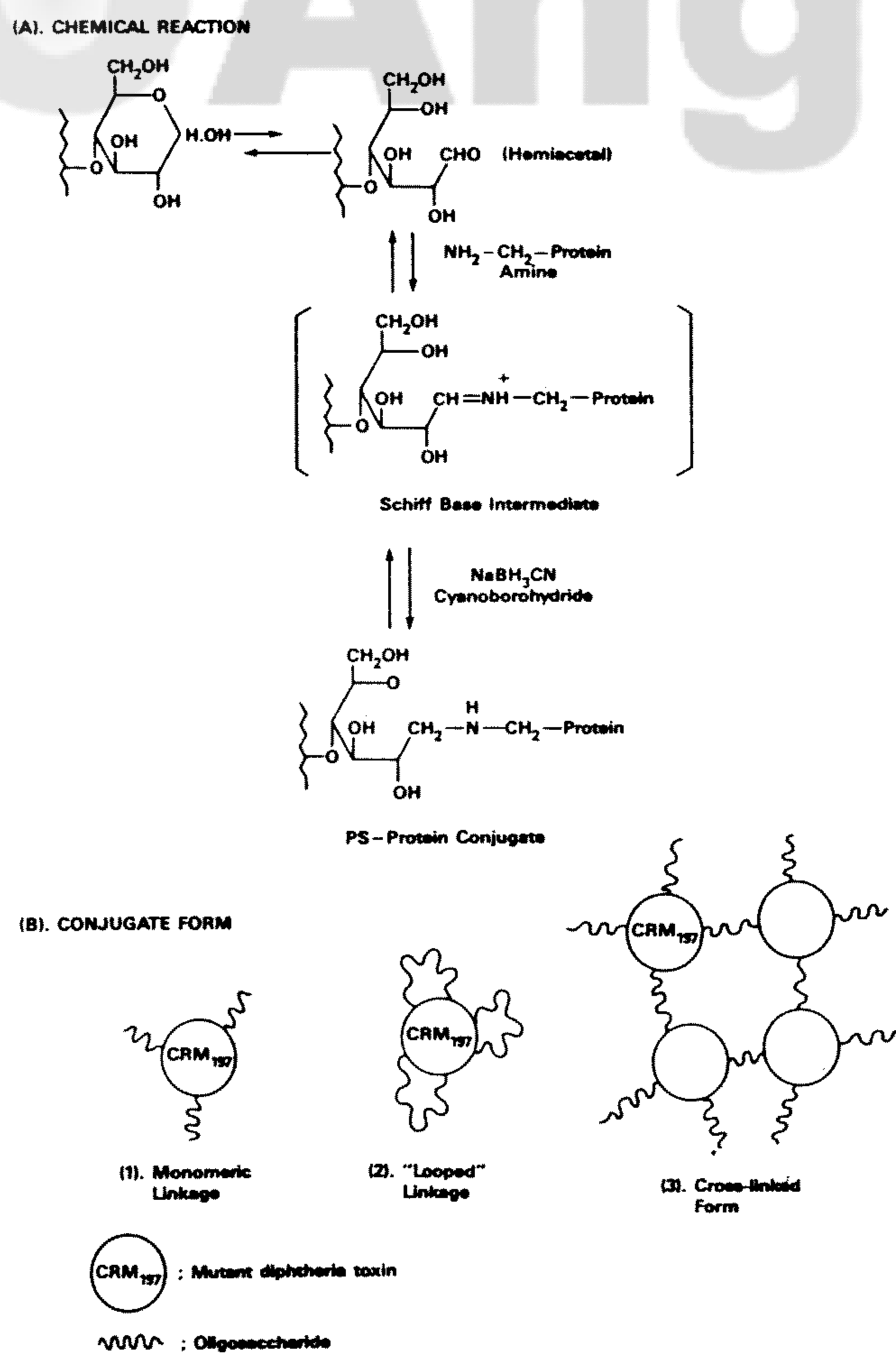


Figure 2. Preparation of polysaccharide - protein conjugate by coupling reaction

沒有充分的証據，顯示在結合疫苗中含有的細胞膜蛋白質抗原能產生有效抗體來防禦疾病之發生。

(二)應用特殊的化學合成技術來結合多糖類與蛋白質媒體。化學反應包括先將多糖類和蛋白質分別反應成為特別的化合物，然後再結合此二種改變的化合物，而形成具有堅強化學連接(Co-valent linkage)的結疫苗³⁹。PRP 與 OMP 中間的化學連接性質可由形成的新胺基酸

S-(Carboxy methyl)-homocystein 的分析結果得到証明。MSD 使用的合成方法表示於圖三。PRP-OMP 結合疫苗的臨床試驗結果顯示此疫苗對於嬰兒，小孩產生高濃度的抗體，特別對於二個

月以上年齡之嬰兒，會急速增加達到 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上的有效血清抗體濃度。反覆注射疫苗時會繼續增強抗體的產生。接種時所觀察到的副作用甚為輕微，緩和，可在 48 小時內減低，或消失症狀。結合疫苗加入氫氧化鋁的佐劑時，可結合疫苗中所含有的微量 endotoxin，或緩慢釋放出疫苗成份到局部而長久維持免疫作用⁽³⁸⁻⁴⁰⁾。

Hib 結合疫苗的管制與檢驗分析

(一)結合疫苗管制上的難題

PRP 抗體反應濃度測定上的困難包括使用同位素免疫檢驗(Radioimmuno-assay, RIA)時需要精巧技術來製備以同位素標識的 PRP 抗原。應用酵素免疫檢驗(ELISA)方法則往往引起非特异性反應。在不同的時間、人員、或環境下操作時容易產生不同的分析結果。許多實驗室的操作方法沒有統一，標準化。此外，缺少產生免疫反應的固定操作方法，接種以前個體的抗體濃度變異，血中抗體濃度維持之持久性皆不盡相同。這些問題皆增加管制分析之困難。對於這些影響因素，如果將操作方法標準化，制定於相同的實驗條件，則能有效地測定抗體濃度的相對變化。

所有的 Hib 結合疫苗皆使用相同的 PRP 抗原，可是各結合疫苗在製備方法與製品性質有很大的差異。因此不能直接比較其抗原的理化性質。各疫苗所使用的蛋白質媒體，多糖類大小，化學連接，以及蛋白質與多糖類的比例差異很大。因此對於結合疫苗抗體濃度的定量分析與疫苗的檢驗，皆需要個別制定管制的規格(表二)。

(二)檢驗分析的現狀與檢討。

FDA 對於疫苗檢驗的分析方法，原則上要求準確性、可靠、再現、敏感，與簡單化等之一般準則，而沒有規定必須使用何種方法或技術。通常藥廠要向 FDA 提出廠內所使用的分析方法，以及試驗結果。FDA 審核這些方法與結果，認為適當時就採用，做為檢驗分析之依據。FDA 實驗室會依照藥廠所提出的方法操作，檢討其分析效果。如果什麼地方有缺陷不適當，需要改進，則會提出意見與建議。不過這些有效檢驗方法的提出是藥廠的責任，自己要尋找，想辦法獲得準確，可靠的方法，而 FDA 的任務在於審核這些方法是否適當，可做為疫苗製品檢驗管制的方法⁽⁴¹⁾。

Hib 結合疫苗的管制檢驗可分為下列幾方面：

(1)PRP 多糖類：包括 Ribose，磷含量，以及核酸、蛋白質，LPS 摻雜物之限制量。

Table 2. Characteristics of and specifications for Hib conjugate vaccines.

Characteristics	Manufacturer		
	Connaught	Praxis	MSD
1.PS size	Heat-sized, medium.	Periodate oxidized, about 20 PRP unit oligosaccharide.	Native, large PS.
2.Protein carrier	Tetanus or diphtheria toxoid	CRM197, non-toxic variant of diphtheria toxin.	Meningococcal outer membrane protein(OMP).
3.Spacer linkage or reactant	ADH	No	PS-carbamate * Protein-homocysteine
4.Conjugate reaction	CNBr activation. Carbodi-imide coupling.	Reductive amination.	Carbamate-thioester conjugation.
Specifications:			
Vaccine	PRP-D	HbOC	PRP-OMPC
1.Polysaccharide			
(PRP, %)			
Ribose	> = 32	> = 32	35-45
Protein	< = 1	< = 1	< = 1
Nucleic acid	< = 1	< = 1	< = 1
Phosphorus(%)	-	-	7-9
LPS(EU/ug PS)	-	< = 1.0	-
2.Protein carrier.			
	Diph. toxoid	CRM197	MOMP
Sialic acid(%)	-	> = 90% Purity	> = 60% Purity.
Nucleic acid	-	-	< = 1
Pyrogenicity	-	< = 1	< = 1
		< = 1.0EU/μg protein	0.025 μg/ml/kg. b. wt.
3.Bulk concentrate.			
Free ribose(%)	< = 37	< = 10	-
PS/protein	1.45-2.0	0.30-0.70	0.05-0.10
Molecular size (Sephacrose CL-2B)	0.6-0.7	0.3-0.6 (CL - 4B)	> = 85%, 0.25
LPS (EU/ug ps) -	-	< = 10	
Pyrogenicity (μg/ml/kg. b. wt.)	-	1.0	0.025
4.Final container.			
PS (μg/dose)	10 ± 2	10 ± 2	15 ± 3
Pyrogenicity (μg/ ml/kg. b. wt.)	1.0	1.0	IV, 0.025 IM, 10
LPS(EU/ml)	-	< = 50	< = 20
Free ribose(%)	< = 37a	< = 10	-
Free protein	-	< = 1	-
Mouse immunogenicity	-	-	+
Sterility	+	+	+
General safety	+	+	+
Identity	+	+	+

Journal of Food and Drug Analysis. 1993.1(2)

Abbreviations used as follows:

- MSD = Merck, Sharp & Dohme. PS = Polysaccharide. PRP = Poly ribosyl-ribitol phosphate.
 MOMP = Meningococcal group B outer membrane protein. CNBr = Cyanogen bromide.
 CRM197 = Diphtheria toxin mutant protein. ADH = Adipic dihydrazide. LPS = Lipopolysaccharide.
 FU = Endotoxin unit. kg. b. wt. = kilogram body weight. a: Within 30 days, 1.2% increase/month.
 * : PS-N-acetyl butyl carbamate.
 Protein-N-acetyl homocysteine.

(2)蛋白質媒體:包括蛋白質的純度與含量,以及核酸,熱原物質之摻雜限制。

(3)濃縮半製品(Bulk concentrate):包括Free ribose,多糖類與蛋白質的比例,分子量大小,LPS含量以及熱原物質試驗。

(4)最終製劑(Final container):包括多糖類含量,LPS,Free ribose,游離蛋白質,一般安全性試驗,無菌試驗與熱原物質試驗等。

安定性試驗:Hib 結合疫苗的貯藏溫度為 2-8°C。此疫苗的安定試驗需要測定其分子大小,游離的糖類(ribose),以及對白鼠的免疫反應。通常將疫苗貯藏於 4°C、25°C、37°C 和 50°C,8 星期以上觀察其疫苗的分解情形。現在疫苗的貯藏期間為在 2-8°C,24 個月。

對於 Free ribose 的含量,Connaught 的 PRP-D 疫苗規定在 37% 以下在貯藏期間每個月不得

增加 1.2%。Praxis 的 HbOC 疫苗規定在 10% 以下。Free ribose 含量代表多糖類與蛋白質的結合漸漸分解而析出遊離糖類。Merck 的 PRP-OMPC 疫苗,因為應用特殊的化學合成技術,多糖類與蛋白質間的結合非常穩固,致使 free ribose 之含量保持在 1% 以下。

Praxis 的 HbOC 疫苗乃使用 15-30 反覆的 PRP 多糖類單位。若使用較短小的 PRP 多糖類,則結合疫苗會顯出較小的分子大小,會影響到免疫抗體反應。

Merck 的 PRP-OMPC 疫苗,使用革蘭氏陰性之腦膜炎菌外表細胞膜蛋白質,可能會摻雜 LPS,因此對於 LPS 含量,熱原物質試驗要特別注意,限制其摻雜量。

最近藥廠為了要簡單化疫苗接種的次數,因此將 Hib 結合疫苗與 DTP(白喉、破傷風、百日

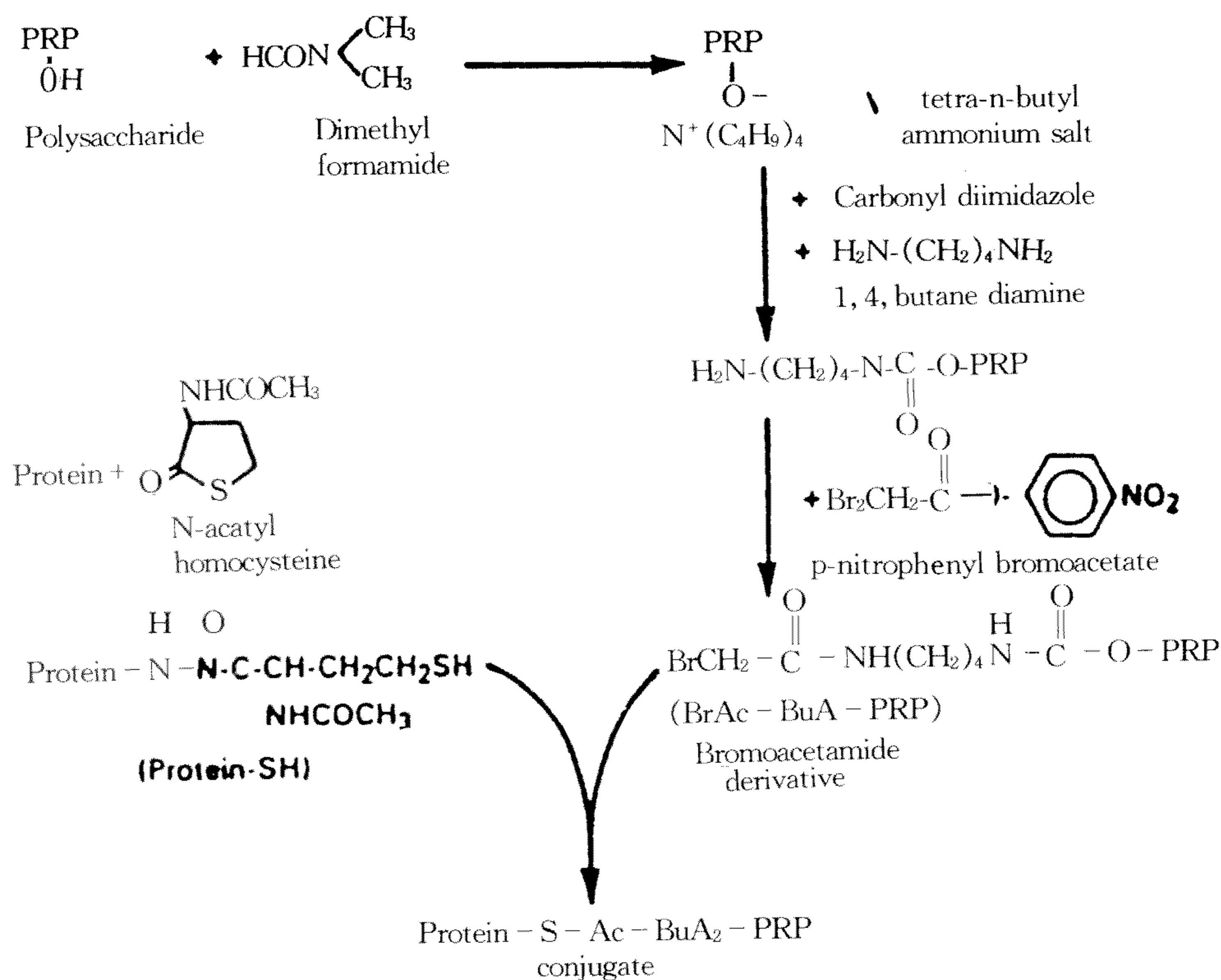


Figure 3. Synthetic reactions of polysaccharide - protein conjugate

咳)疫苗合併。此複合疫苗使得 PRP 之含量測定變成更為複雜,困難。對於這合併疫苗中的 PRP 含量測定,可以使用免疫電泳法(Rocket immunoelectrophoresis)來分析。

結 語

最近對於莢膜性多糖類病原菌,包括 Hib,肺炎球菌,腦膜炎球菌等所產生感染疾病的預防,引起醫藥衛生界的關心與重視。多糖類疫苗之發展與應用乃針對這些疾病的防禦問題所提出最有效的政策與措施。Hib 蛋白質結合疫苗的產生使多糖類抗原對於二個月以上年齡的嬰孩幼童能接種,有效地產生免疫抗體。今後將有許多的多糖類結合疫苗,包括肺炎球菌,連鎖球菌, *Klebsiella*, *Pseudomonas* 等,繼續被開拓與應用。這些結合疫苗的管制與檢驗分析,許多方面仍需要改進分析技術,制定更為有效的標準操作方法。對於檢驗分析的求進步,要吸取新的專門知識,別研究室的經驗,以及不斷的研究以改善試驗方法。

參考文獻

1. Broome, C. V. 1987. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b infections in the United states. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6:779-782.
2. Redmond, S. R., Pichichero, M. E. 1984. *H. influenzae* type b disease: an epidemiologic study with special reference to day care centers. *J. Am. Med. Assn.* 252:2581-2584.
3. Ward, J. I., Lum, M. K. W., Hall, D. B., et al., 1986. Invasive *H. influenzae* type b disease in Alaska: background epidemiology for a vaccine efficacy trial. *J. Infect. Dis.* 153:17-26.
4. Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). 1991. *Haemophilus b* conjugate vaccines for prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease among infants and children two months of age and older. *Mort. Morb. Wk. Rep.* 40:1-7.
5. Jennings, H. J. 1990 Capsular polysaccharides as vaccine candidates. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 150:97-126.
6. Robbins, J. B., Schneerson, R. and Pitman, M. 1984. *Haemophilus influenzae* type b infection. In *Bacterial Vaccine*, Germanier, R. ed. pp. 189-316. Academic press, Orlando, FL.
7. Parke, J. C. Schneerson, R., Robbins, J. B. and Schlesselman, J. J. 1977. Interim report of a controlled field trial of immunization with capsular polysaccharides of *Haemophilus influenzae* type b and Group C *Neisseria meningitidis* in Mecklenberg County, North Carolina (March 1974-March 1976). *J. Infect. Dis.* 136:S51-S56.
8. Crisel, R. M., Baker, R. S. and Dorman, D. E. 1975. Capsular Polymer of *Haemophilus influenzae* type b. I. Structural characterization of capsular polymer of strain Eagan. *J. Biol. Chem.* 250:4926-4930.
9. Egan, W., Schneerson, R., Werner, K. E. and Zon, G. 1982. Structural studies and chemistry of bacterial capsular polysaccharides. Investigations of phosphodiester-linked capsular Polysaccharides isolated from *Haemophilus influenzae* types a, b, c and f: NMR spectropic identification and chemical modification of end groups and the nature of base catalyzed hydropytic depolymerization. *J. Am. Chem. Soc.* 104:2898-2910.
10. Ward, J. and Cochi, S. 1988 *Haemophilus influenzae* vaccines. In *Vaccines*, Plotkin, S. A. and Mortimer, E. A., eds., pp. 300-332. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
11. Robbins, J. B., Myerowitz, R. L., Whisnant, J. K., Argaman, M., Schneerson, R., Handzel, Z. T. and Gotschlich, E. C. 1972. Enteric acteria cross-reactive with *Neisseria meningitidis* group A and C and *Diplococcus pneumoniae* type I and III. *Infect. Immun.* 6:651-656.
12. Handzel, Z. T. Argaman, M., Parke, J. C., Jr., Schneerson, R. and Robbins, J. B. 1975. Heteroimmunization to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b in-

Journal of Food and Drug Analysis. 1993.1(2)

- duced by enteric cross-reacting bacteria. *Infect. Immun.* 11:1045-1055.
13. Fraser, B. A., Tsui, F. P. and Egan, W. 1979. Mass-spectral studies of isomeric D-ribofranosylribitol disaccharides from the capsular polysaccharides of *Haemophilus influenzae* type b and *Escherichia coli* K100. *Carbohydr. Res.* 73:59-65.
 14. Moxon, R. and Anderson, P. 1979. Meningitis caused by *Haemophilus influenzae* in rat protective immunity and antibody priming by gastrointestinal Colonization with *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 140:471-487.
 15. Insel, R. A. and Anderson, P., Jr. 1982. Cross-reactivity with *Escherichia coli* K100 in the human serum anticapsular antibody response to *Haemophilus influenzae* type b. *J. Immunol.* 128:1267-1270.
 16. Smith, D.H., Peter, G., Ingram, G.L. Harding, A. L. and Anderson, P. 1973. Responses of children immunized with the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatrics.* 52:637-644.
 17. Peltola, H., Kayhty, H., Virtanen, M. and Makela, P.H. 1984. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteremic infections with the capsular polysaccharide Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 310:1561-1566.
 18. Kayhty, H., Karanko, V., Peltola, H. and Makela, P. H. 1984. Serum antibodies after vaccination with capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Infect. Dis.* 147:1100.
 19. Anderson, P. 1984 The Protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b (letter). *J. Infect. Dis.* 149:1034-1035.
 20. Smith, D.H., Peter, G., Ingram, D.L., et al. 1973 Responses of children immunized with the capsular polysaccharide of H. *Influenzae* type b. *Pediatrics.* 52:637-644.
 21. Mond, J.J., Mongini, P.K.A., Sieckman, D. and Paul, W.E. 1980. Role of lymphocytes in the response to TNP-AECM-Ficoll. *J. Immunol.* 125:1066-1070.
 22. Mosier, D.E. and Subbarao, B. 1982. Thymus-independent antigens: Complexity of B-lymphocyte activation revealed. *Immunol. Today.* 3:217-222.
 23. Mond, J.J., Scher, I., Mosier, D.E., Baese, M., Paul, W.E. 1978. T-independent responses in B cell-defective CBA/N mice to *Brucella abortus* and to trinitrophenyl (TNP) conjugates to *Brucella abortus*. *Eur. J. Immunol.* 8:459-463.
 24. Ahmed, A., Scher, I., Sharrow, S.O., Smith, A. H., Paul, W. E., Sachs, D. H. and Sell, K. W. 1977. B-lymphocyte heterogeneity: development and characterization of an alloantiserum which distinguishes B lymphocyte differentiation alloantiserum which distinguishes B lymphocyte differentiation alloantigens. *J. Exp. Med.* 145:101-110.
 25. Amsbaugh, D. F., Hansen, L. T., prescott, B., et al. 1972. Genetic control of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide in mice. I. Evidence that an x-linked gene plays a decisive role in determining responsiveness. *J. Exp. Med.* 136:931-949.
 26. Lee, C.J. 1987. Bacterial capsular polysaccharides--biochemistry, immunity and vaccine. *Mol. Immunol.* 24:1005-1019.
 27. Lee, C.J., Malik, F.G. and Robbins, J.B. 1978. The regulation of the immune response of mice to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *Immunology.* 34:149-156.
 28. Smith, H. R., Yaffe, L. J., Kastner, D. L. and Steinberg, A. D. 1986. Evidence that Lyb-5 is a differentiation antigen in normal and xid mice. *J. Immunol.* 136:1194-1200.
 29. Baker, P.J., Amsbaugh, D.F., Stashak, P. W., Caldes, G. and Prescott, B. 1981. Regulation of the antibody response to pneumococcal polysaccharide by thymus-derived cells. *Rev. Infect. Dis.* 3:332-341.

30. Granoff, D.M., Boies, E.G., Munson, R.S. 1984. Immunogenicity of *H. influenzae* type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine in adults. *J. Pediatr.* 105:22-27.
31. Cates, K.L., Marsh, K.H., Granoff, D.M. 1985. Serum opsonic activity after immunization of adults with *H. influenzae* type b-diphtheria toxoid conjugate vaccine. *Infect. Immun.* 48:183-189.
32. Cates, K.L. 1985. Serum opsonic activity for *H. Influenzae* type b in infants immunized with polysaccharide-protein conjugate vaccines. *J. Infect. Dis.* 152:176-177.
33. Lepow, M.L., Samuelson, J.S., Gordon, L.K. 1984. Safety and immunogenicity of *H. influenzae* type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine in adults. *J. Infect. Dis.* 150:402-406.
34. Lepow, M., Randolph, M., Cimma, R., et al. 1986. Persistence of antibody and responses to booster dose of *H. influenzae* type b polysaccharide diphtheria toxoid conjugate vaccine in infants immunized at 9 to 15 months of age. *J. Pediatr.* 108:882-886.
35. Anderson, P., Pichichero, M.E., Insel, R.A. 1985. Immunogens consisting of oligosaccharides from the capsule of *H. influenzae* type b coupled to diphtheria toxoid or the toxin Protein CRM197. *J. Clin. Invest.* 76:52-59.
36. Anderson, P., Pichichero, M.E., Insel, R.A., et al. Vaccines consisting of periodate-cleaved oligosaccharides from the capsule of *H. influenzae* type b coupled to a protein carrier: structural and temporal requirements for priming in the human infant. *J. Immunol.* 137:1181-1186.
37. Marburg, S., Jorn, D., Tolman, R.L. et al. 1986. Bimolecular chemistry of macromolecules: Synthesis of bacterial polysaccharide conjugates with *Neisseria meningitidis* membrane protein. *J. Am. Chem. Soc.* 108:5282-5287.
38. Einhorn, M.S., Weinberg, G.A., Anderson, E.L., et al. 1986. Immunogenicity in infants of *H. influenzae* type b polysaccharide in a conjugate vaccine with *Neisseria meningitidis* outer-membrane protein. *Lancet.* 2:299-302.
39. Ahonkhai, V.I., Lukacs, L.J., Jonas, L.C., et al. 1990. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (Meningococcal Protein conjugate) (PedvaxHIB): clinical evaluation. *Pediatrics.* 85:676-681.
40. Shapiro, E.D. and Capobianco, L.A. 1990. Long-term follow-up and response to a booster dose of *H. influenzae* type b polysaccharide-N. meningitidis outer membrane protein complex (PRP-OMP) conjugate vaccine among children first immunized at 2-17 months of age. *Pediatr. Res.* 27:183A.
41. 李啟仁 1991. 信賴性品質之保證——美國食品藥物管理局對醫藥品、生物製劑之管制. *藥物食品簡訊.* 133:2-5.

Immunity and Control Analysis of *H. Influenzae* Type b Polysaccharide-protein Conjugate Vaccine.

CHI - JEN LEE

Center for Biologics Evaluation and Research, FDA, Bethesda, MD. U. S. A.

Haemophilus influenzae type b (Hib) is the widest known cause of bacterial meningitis and a leading cause of bacterial diseases in the United States and many areas of the world. It causes epiglottitis, pneumonia, septic arthritis, osteomyelitis and pericarditis. Many survivors of meningitis experience in permanent mild hearing loss and mental retardation.

The capsular polysaccharide of polyribosyl-ribitol phosphate (PRP) is a major virulence factor of the organism. Antibody to PRP is the primary contributor to induce serum bactericidal activity.

Three types of Hib-protein conjugate vaccines were prepared by different methods, using a different protein carrier, PS size, nature of linkage, and ratio of protein and PS: (1) The Connaught Laboratories combined diphtheria toxoid (DT) to Hib PS by cyanogen bromide activation of PS and conjugation of PS and DT by carbodiimide; (2) In the praxis Biologics, Hib oligosaccharides were conjugated to a mutant diphtheria toxin, CRM197, by the reductive amination; (3) The Merck, Sharp & Dohme conjugate vaccine utilized a 40 KD meningococcal outer membrane protein (OMP) and a multiple

synthetic procedure. Hib PS-protein conjugate vaccine produced high antibody levels in infants 2-6 months of age and young children with no major adverse reactions.

Control tests of Hib conjugate vaccine were carried out in two stages: (A) Each lot of PS shall be examined for (1) the chemical content, such as ribose and phosphorus; (2) contamination of cell components, such as protein, LPS and nucleic acids. The carrier protein was then examined for its purity. The conjugate bulk concentrate was next examined for free ribose content, ratio of PS and protein, molecular size, contamination of LPS and pyrogenicity. (B) The final conjugate vaccine contains 10-25 μg PRP per dose. The vaccine was tested for identity and amount of Hib PS, contents of free ribose, free protein, LPS, as well as sterility, general safety and pyrogenicity.

Immunization of Hib PS-protein conjugate vaccine holds great promise for the prevention of Hib diseases in young children. An approach using similar technology can be applied to the prevention in the future of diseases caused by other encapsulated bacteria.

Key words: *Haemophilus* b conjugate vaccine, Polysaccharide-protein conjugate, Immunity and control of vaccine, conjugate vaccine.