



Kirjallisuustutkielma

Influenssa A- ja B-virus sekä käytössä olevat
influenssarokotteet ja kehitteillä olevat universaalit
influenssarokotteet

Mira Mäkelä

Käytetyt lyhenteet

ADCC	Vasta-aine riippuvainen soluvälitteinen sytotoksisuus
APC	Antigeenin esittelijä solu
COBRA	a computationally optimized broadly reactive antigen
CTL	Sytotoksinen T-solu
DC	Dentriittisol
ER	Endoplasmakalvosto
HA	Hemagglutiniini
IL-2	Interleukiini-2
IFN- γ	Interferoni- γ
M1/2	Matriksi1/2
NA	Neuraminidaasi
NEP	“nuclear export”-proteiini
NK-solut	Luonnollinen tappajasolu
NLR	NLR-inflammasomi
NLS	Tumalokalisaatiosignaali
NOS2	Typpioksidisyntaasi 2
NP	Nukleoproteiini
NS1	Ei-rakenteelliset proteiinit 1
PA	Polymeerasi happo
PAMP	Patogeenihin liittyvät molekyylikuviot
PB1	Polymeerasi emäs 1
PB2	Polymeraasi emäs 2
PRR	“pattern recognition”-reseptori

QIV	Nelivalenttinen influenssarokote
RdRp	Heterotrimeerisen RNA-riippuvaisen RNA-polymeraasi
RLR	RIG-I-reseptori
RNP	Ribonukleoproteiini
Th1/2/17	T-auttajasolut1/2/17
TIV	Trivalenttinen influenssarokote
TLR	“Toll like”-reseptori
TNF- α	Tuumorinekroositekijä alfa
VLP	Viruksen kaltaiset partikkelit
WHO	Maailman terveysjärjestö

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet

Sisällys

1. Johdanto	1
2. Influenssa A- ja B-virusten rakenne	2
2.1. Hemagglutiniini	3
2.2. Neuraminidaasi	4
2.3. M2-ionikanava	5
2.4. Genomi	5
3. Influenssaviruksen lisääntyminen	6
4. Influenssaviruksen aiheuttama immuunivaste	7
4.1. Synnynnäinen immunitetti	8
4.2. Adaptiivinen immunitetti	9
5. Kausi-influenssarokotteen tuotantoprosessi	9
5.1. Ongelmat influenssarokotteen tuotantoprosessia	10
6. Käytössä olevat influenssarokotteet	11
6.1. Trivalenttinen influenssarokote (TIV)	12
6.2. Elävää heikennettyä influenssavirusta sisältävä rokote (LAIV-rokote)	12
6.3. Nelivalenttinen influenssarokote (QIV)	13
6.4. Pandemiarokotteet	13
7. Kehitteillä olevat influenssarokotteet	14
7.1. HA:n varsidomeeniin pohjautuvat influenssarokotteet	15
7.2. HA:n globulaariseen päädomeeniin pohjautuvat influenssarokotteet	17
7.3. NA:n pohjautuvat influenssarokotteet	17
7.4. M2-ionikanavan ektodomeeniin pohjautuva influenssarokote	18
7.5. Sytotoksisia T-lymfosyyttejä aktivoivat influenssarokotteet	18
8. Lopuksi	19
9. Lähteet	19

1. Johdanto

Influenssa A- ja B-virukset ovat ortomyksovirusten heimoon kuuluvia negatiivisäikeisiä RNA-viruksia (Bouvier & Palese 2008). Influenssaviruksen aiheuttaman hengitystieinfektion oireita ovat mm. korkea kuume, väsymys sekä päänsärky. Ihmisillä esiintyy sekä influenssa A- että B-virusta. Lisäksi Influenssa A-virusta on löydetty mm. monilta lämminverisiltä eläimiltä, kuten linnuilta, hevosilta sekä sioilta. (Taubenberger & Morens 2008)

Influenssa A- ja B-virukset aiheuttavat kausittaisia epidemioita eteläisellä pallonpuoliskolla maaliskuusta syyskuuhun ja pohjoisella pallonpuoliskolla lokakuusta maaliskuuhun. (Sautto *et al.* 2018). Nämä kausittaiset influenssaepidemiat aiheutuvat kahdesta kiertävästä influenssa A-viruksen alatyypistä (H1N1 ja H3N2) sekä kahdesta influenssa B-viruksen haarautuneesta sukulinjasta (Yamagata ja Victoria) (Krammer & Palese 2015, Sautto *et al.* 2018). Arvion mukaan influenssa A- ja B-viruksien aiheuttamiin kausittaisesti esiintyviin epidemioihin sairastuu vuosittain 2-5 miljoonaa ihmistä, joista 250 000-500 000 ihmistä menehtyy infektion seurauksena. (Krammer & Palese 2015) Lisäksi influenssa A-virus aiheuttaa ajoittain odottamattomia pandemioita, kuten vuonna 1918 espanjantauti, johon menehtyi maailmanlaajuisesti yli 50 miljoonaa ihmistä. (Wong & Webby 2013)

Hemagglutiniini (HA) sekä neuraminidaasi (NA) ovat influenssa A- ja B-viruksen lipidivaipassa sijaitsevia kalvoglykoproteiineja, joiden avulla influenssa A-virukset voidaan luokitella alatyyppeihin (Bouvier & Palese 2008). HA:sta on löydetty yhteensä 18 alatyyppeä (H1-H18), jotka voidaan jakaa fylogeneettisesti kahteen erilliseen ryhmään. Ryhmä 1 sisältää 12 HA:n alatyyppeä (H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 ja H18) ja ryhmä 2 sisältää kuusi HA:n alatyyppeä (H3, H4, H7, H10, H14 ja H15). Influenssa A-viruksen NA:sta on puolestaan löydetty yhteensä 11 alatyyppeä (N1-N11), jotka voidaan jakaa kahteen fylogeneettisesti erilliseen ryhmään. (Sautto *et al.* 2018) Lukuun ottamatta lepakosta eristettyjä N10:tä sekä N11:ta, jotka eivät näytä kuuluvan kumpaankaan NA:n ryhmistä (Wohlbold & Krammer 2014). Ryhmä 1 sisältää neljä NA:n alatyyppeä (N1, N4, N5 ja N8) ja ryhmä 2 sisältää viisi NA:n alatyyppeä (N2, N3, N6, N7 ja N9) (Gamblin & Skehel 2010).

Influenssavirusten nimeämistapa on standardoitu WHO:n ohjeiden mukaan. Nimeäminen aloitetaan ilmoittamalla influenssaviruksen tyyppi sekä alkuperäinen isäntä (jos ei ihminen). Seuraavaksi ilmoitetaan eristyksen paikka, numero sekä vuosi. Viimeisenä, jos kyseessä on influenssa A-virus, ilmoitetaan HA:n sekä NA:n alatyypit. Esimerkiksi influenssa

A-viruksen alatyypin H1N1, joka on eristetty ihmisestä vuonna 1999 Uudessa-Kaledoniassa eristysnumerolla 20 nimettäisiin seuraavasti: A/New Caledonia/20/1999 (H1N1). (Taubenberger & Morens 2008)

Influenssa A- ja B-viruksen aiheuttamaa infektiota vastaan voi suojautua influenssarokotteella. Influenssarokotteen tehokkuus vaihtelee 60-90% välillä. Influenssaviruksia vastaan on käytössä useita erilaisia rokotteita, kuten trivalenttinen influenssarokote (TIV) sekä nelivalenttinen influenssarokote (QIV). Influenssarokotteet voivat sisältää mm. inaktivoituja kokonaisia influenssaviruksia, pilkottuja influenssaviruksia sekä influenssaviruksien pintaproteiineja. Käytössä olevat influenssarokotteet voidaan antaa joko intramuskulaarisesti tai intranasalisesti. (Soema *et al.* 2015)

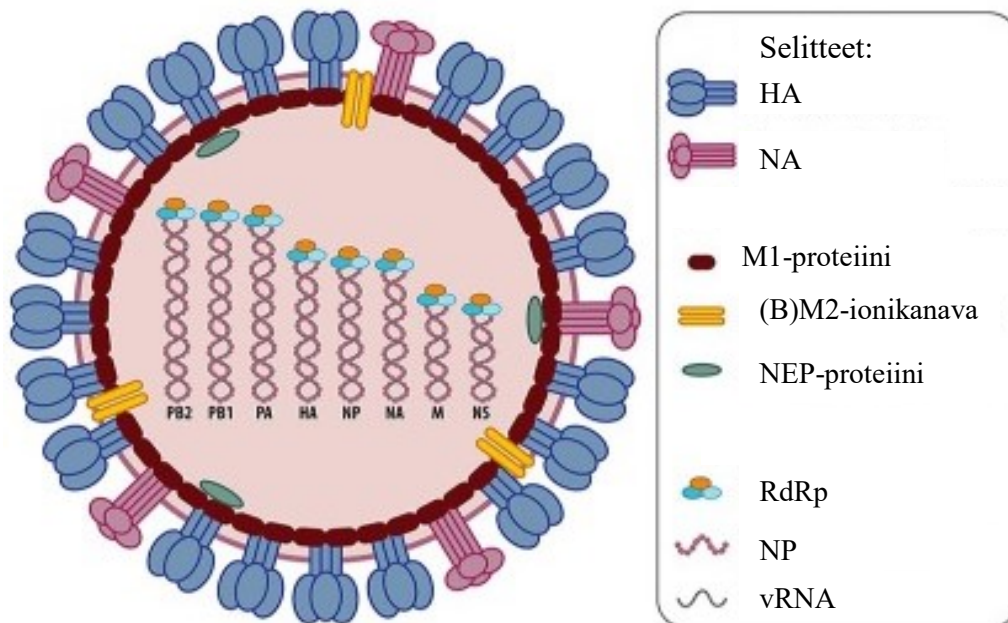
Influenssarokotteella on kuitenkin heikompi tehokkuus pieniin lapsiin, ikäihmisiin sekä immuunipuutteisiin yksilöihin. Pienillä lapsilla influenssarokotteen heikompi tehokkuus johtuu heikosta vasteesta rokotteeseen, kun taas ikäihmisillä sekä immuunipuutoksesta kärsivillä henkilöillä rokotteen heikompi tehokkuus johtuu heikentyneestä immuunijärjestelmästä. Influenssarokotteen tehokkuutta näissä ryhmissä voidaan lisätä kasvattamalla rokotteen immunogeenisyyttä sekä laajentamalla rokotteesta aiheutuvaa immuunivastetta. (Soema *et al.* 2015)

Uusia influenssarokotteita kehitetään jatkuvasti, koska tällä hetkellä käytettävät rokotteet mahdollistavat vain hyvin spesifisen ja lyhyen immunitetin influenssaviruksia vastaan (Sautto *et al.* 2018). Tällä hetkellä kehitteillä olevat influenssarokotteet pyrkivät antamaan mahdollisimman universaalin sekä pitkän suojan influenssa A- ja B-viruksia vastaan. Nämä rokotteet indusoisivat vasta-ainetuotantoa influenssaviruksissa esiintyviä muuttumattomia alueita kohtaan, kuten HA:n varsidomeeni ja M2-ionikanava. Lisäksi influenssarokotteiden tuotantoprosessia kehitetään tehokkaammaksi mm. uusien tekniikoiden avulla. (Rajão & Pérez 2018)

2. Influenssa A- ja B-virusten rakenne

Influenssa A- ja B-virukset voivat olla muodoltaan joko pallomaisia tai filamenttisia. Halkaisijaltaan pallomaiset influenssavirukset ovat noin 100 nanometriä, kun taas filamenttisten influenssavirusten pituus voi ylittää jopa 300 nanometriä. (Bouvier & Palese 2008)

Influenssa A- ja B-virusta ympäröi lipidivaippa, joka on peräisin isäntäsolun membraanista. Lipidivaippa sisältää integraalisia kalvoproteiineja, joita ovat HA, NA sekä M2-ionikanavat. (Bouvier & Palese 2008) HA:n määrä influenssaviruksen integraalisista kalvoproteiineista on noin 80%, kun taas NA:n määrä on noin 17%. Integraalisista kalvoproteiineista M2-ionikanavia on vähiten, vain noin 3% integraalisista kalvoproteiineista. (Samji 2009)



Kuva 1. Influenssa A- ja B-viruksen rakenne. Influenssaviruksen lipidivaippaan on uppoutuneena HA:a, NA:a sekä M2-ionikanavia. Lipidivaipan sisäpuolella sijaitsee M1-proteiinin muodostama kerros, joka sulkee influenssaviruksen ytimen sisäpuolelleen. Influenssaviruksen ytimessä sijaitsevat "nuclear export"-proteiini (NEP) sekä ribonukleoproteiini (RNP) kompleksi. RNP kompleksi koostuu viraalisista RNA segmenteistä, jotka ovat päällystetty nukleoproteiinilla (NP). Lisäksi RNP kompleksi sisältää heterotrimeerisen RNA-riippuvaisen RNA-polymeraasin (RdRp), joka rakentuu kolmesta polymeraasi alayksiköstä: polymeraasi emäs 1 (PB1), Polymeraasi emäs 2 (PB2) sekä polymeraasi happo (PA). (Bouvier & Palese 2008) Kuvan lähde: Rajão & Pérez 2018 (muokattu ja suomennettu)

2.1. Hemagglutiniini

HA on homotrimeerinen integraalinen kalvoglykoproteiini influenssa A- ja B-viruksen lipidivaipalla, jonka tehtävänä on sitoutua isäntäsolun pinnalla olevaan siaalihappoon sekä aiheuttaa endosomaalisen membraanin ja viraalisen membraanin fuusioituminen. (Bouvier & Palese 2008, Gamblin & Skehel 2010).

Toimiakseen HA monomeerin esiaste (HA0) täytyy katkaista kahdeksi polypeptidiksi (HA1 ja HA2), jotka sitoutuvat toisiinsa kahdella rikkisidoksilla. (Bouvier & Palese 2008) Aktiivinen monomeeri muodostuu globulaarisesta päädomeenista sekä

varsidomeenista. Monomeerin rikkisidoksien muodostavien kysteiniin väliin jäävät aminohapot muodostavat HA:n globulaarisen pään (Krammer & Palese 2015). HA:n varsidomeenin muodostavat HA1-polypeptidin C- ja N-terminaaliset päät sekä HA2-polypeptidin N-terminaalinen pää. (Krammer & Palese 2013)

Siaalihapon sekä antigeenin sitova kohta sijaitsee HA:n globulaarisessa päädomeenissa. Siaalihapon sitoutumiskohdan muodostavat 190- α -heliksi, 130- ja 220-silmukka sekä vetysidoksilla toisiinsa sitoutuneiden konservoituneiden aminohappojen verkosto. 130-silmukan aminohappotähteet luovat keskeisiä sidoksia HA:n sekä siaalihapon välille. 220-silmukan aminohapoissa tapahtuneet mutaatiot ovat aiheuttaneet lajispesifisyyttä yhdessä 190- α -heliksin kanssa. (Byrd-Leotis *et al.* 2017) Vetysidoksilla toisiinsa sitoutuneet konservoituneet aminohapot: Tyr-98, Trp-153, His-183, ja Tyr-195 muodostavat siaalihappoa sitovan taskun. (Gamblin & Skehel 2010).

Influenssaviruksen RdRp:lla ei ole korjauslukua, jonka vuoksi influenssaviruksen genomissa tapahtuu suhteellisen paljon pistemutaatioita. (Krammer & Palese 2015) Näiden pistemutaatioiden kertyessä HA:n globulaarisen päädomeenin antigeeniä sitovan alueen geneihin, tapahtuu aminohappojen muuttumista alueella. Tämän vuoksi olemassa olevat vasta-aineet eivät enää tunnista influenssavirusta, jonka ansiosta influenssavirus pystyy ns. pakenemaan immuunijärjestelmää. Tätä tapahtumaa kutsutaan antigeeniseksi ajautumiseksi. (Bouvier & Palese 2008)

2.2. Neuraminidaasi

NA on sienimäinen homotetrameerinen integraalinen kalvoglikoproteiini, joka toimii siaalihapon tuhoavana entsyyminä (Gamblin & Skehel 2010).

NA monomeeri muodostuu varsidomeenista sekä päädomeenista. Influenssaviruksen varsidomeenin pituus vaihtelee alatyypin välillä. (Gamblin & Skehel 2010) Lisäksi varsidomeenin pituutta voidaan muunnella tarpeen mukaan esim. lyhentämällä. Päädomeeni muodostuu kuudesta antiparalleelista β -levystä, jotka muodostavat propellin kaltaisen asetelman. Päädomeeni sisältää NA:n aktiivisen alueen, joka koostuu varauksellisista konservoituneista aminohapoista: Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 ja Tyr406. Lisäksi NA monomeerin päädomeeni sisältää kalsiumia sitovan alueen sekä joissakin kannoissa sekundäärisen siaalihappoa sitovan alueen. (Byrd-Leotis *et al.* 2017)

2.3. M2-ionikanava

M2-ionikanava on homotetrameerinen tyypin III integraalinen kalvoproteiini, jolla on tärkeä rooli influenssa A- ja B-virusten monistumisessa isäntäsolussa. Influenssa A-viruksen M2-ionikanavan sekä influenssa B-viruksen BM2-ionikanavan monomeeri koostuu N-terminaalisisestä ektodomeenista, yksinkertaisesta transmembraanidomeenista sekä C-terminaalisisestä sytoplasmisesta hännästä. (Pinto & Lamb 2005)

Influenssa A- ja B-virusten M2-ionikanavat eroavat toisistaan aminohappojen lukumäärän sekä järjestyksen suhteen. Influenssa A-viruksen M2-ionikanavan monomeeri koostuu 97 aminohaposta, kun taas influenssa B-viruksen BM2-ionikanavan monomeeri koostuu 109 aminohaposta. (Pielak & Chou 2011) Ainoa homologinen sekvenssi M2- sekä BM2-ionikanavien välillä on transmembraanidomeenissa sijaitseva HXXXW aminohapposekvenssi, joka on olennainen M2-ionikanavan toiminnan kannalta. (Pinto & Lamb 2005)

His37 sekä Trp41 aminohapoilla on tärkeä rooli influenssa A-viruksen M2-ionikanavien toiminnan kannalta, kun taas influenssa B-viruksella vastaavat aminohapot ovat His19 sekä Trp41. His37 ja His19 aminohapot ovat tärkeitä influenssaviruksien ionikanavien selektiivisyyden kannalta. M2-ionikanavan porttina toimivat puolestaan Trp41 sekä Trp29. (Pielak & Chou 2011) Influenssa A- ja B-viruksien M2-ionikanavat aukeavat, kun influenssaviruksen ulkopuolinen pH on alle 6,5. M2-ionikanavan portti on puolestaan suljettuna influenssaviruksen ulkopuolisen pH:n ollessa yli 7,5. (Pinto & Lamb 2005)

2.4. Genomi

Influenssa A- ja B-viruksen genomit muodostuvat kahdeksaan osaan segmentoituneesta negatiivisäikeisestä viraalisesta RNA:sta. Segmentit ovat numeroitu yhdestä kahdeksaan laskevan pituuden mukaan (Bouvier & Palese 2008).

Segmentit 1, 2 ja 3 koodaavat RdRp:n osia: Segmentti 1 koodaa PB2:ta, segmentti 2 PB1:ta ja segmentti 3 PA:a. Lisäksi segmentti 2 koodaa tietyissä influenssa A-viruksen kannoissa PB1-F2-proteiinia. Influenssaviruksen kalvogleykoproteiineja koodaavat segmentit neljä sekä kuusi. Segmentti 4 koodaa HA:a ja segmentti 6 koodaa NA:a. Nukleoproteiinia koodaa segmentti 5. Segmentti 7 koodaa puolestaan sekä M1- että M2-matriksi proteiineja. NS1 proteiinia ja NEP/NS2 proteiinia koodaa segmentti 8. (Bouvier & Palese 2008)

Influenssa A-viruksen segmentoitunut genomi mahdollistaa antigeenisen siirtymän. Antigeenisessä siirtymässä influenssa A-viruksen HA:a sekä NA:a koodaavat

segmentit korvataan eri alatyypin segmenteillä. Siirtymää voi tapahtua, jos saman solun on infektoinut samaan aikaan kaksi eri influenssa A-viruksen alatyyppeä. Juurikin influenssa A-viruksessa tapahtunut antigeeninen siirtymä voi aiheuttaa pandemian, jos ihmisellä ei ole ennestään vastustuskykyä kyseiselle uudelle influenssa A-viruksen alatyypille. (Bouvier & Palese 2008)

3. Influenssaviruksen lisääntyminen

HA:n globulaarisen päädomeenin avulla influenssavirus sitoutuu isäntäsolun pinnalla olevaan siaalihappoon, joka on muodostanut sidoksen galaktoosin kanssa. Siaalihapon ja galaktoosin välinen sidos voi olla joko $\alpha(2,6)$ - tai $\alpha(2,3)$ -sidos. Sidostyyppi määrittää influenssaviruksen lajispesifisyyden. (Byrd-Leotis *et al.* 2017). Influenssaviruksen HA tunnistaa ihmisillä pääasiassa $\alpha(2,6)$ -sidoksen (Gagneux *et al.* 2003). HA:n sitoutuminen solun pinnalla olevaan siaalihappoon aktivoi influenssaviruksen endosytoosin, jonka seurauksesta virus kuljetetaan solun sisälle endosomissa (Samji 2009).

Endosomin alhainen pH aiheuttaa konformaationaalisia muutoksia HA:ssa sekä aukaisee M2-ionikanavat. Muutokset HA:ssa aiheuttavat endosomaalisen membraanin sekä viruksen lipidivaipan fuusioitumisen. M2-ionikanavien avautuminen aiheuttaa viruksen ytimen pH:n alenemisen, jolloin viraalinen RNP kompleksi voidaan kuljettaa isäntäsolun sytoplasmaan. (Samji 2009)

Viraalinen RNP kompleksi kuljetetaan sytoplasmasta isäntäsolun tumaan tumalokalisatiosignaalien (NLS) avulla. Tumassa tapahtuu influenssaviruksen genomien transkriptio sekä replikaatio. Transkriptiota varten influenssaviruksen negatiivisäikeinen RNA täytyy muuttua positiivisäikeiseksi RNA:ksi, joka toimii mRNA:n tavoin templaattina sekä viraalisessa proteiini synteesissä, että komplementaarisen RNA:n (cRNA) synteesissä. Uutta negatiivisäikeistä RNA:ta voidaan valmistaa cRNA:n avulla. (Bouvier & Palese 2008)

RdRp aloittaa influenssaviruksen genomien replikaation sisäisesti 5'- sekä 3'-päiden avulla ilman aluketta. Influenssaviruksen 5'- ja 3'- päät voivat muodostaa keskenään korkkiruuvimaisen rakenteen emäsjärjestys vastaavuuden takia. Ennen kuin influenssaviruksen viraalinen RNA voidaan lukea mRNA:ksi ja käyttää translaatiossa isäntäsolussa, täytyy siihen lisätä poly-A häntä sekä 5'cap (Bouvier & Palese 2008). Poly-A häntä lisätään viraalisen RNA:n 3'-päähän ns. sulkumekanismien avulla. Jokaisen influenssaviruksen vRNA segmentin 5'-päähän lähetyviltä löytyy 5-7 emäksen jakso urasiilia, jonka avulla RdRp luo poly-A hännän

liikkumalla edestakaisin. Influenssavirus on kehittänyt omalaatuisen mekanismin 5'capin lisäämiseen, jossa metyloitu 5'cap varastetaan isäntäsolun mRNA:lta. (Samji 2009) Tätä mekanismia kutsutaan ”cap-snatching”-mekanismiksi. Mekanismiin osallistuu PB2 proteiinin ”cap-binding”-domeeni, joka nappaa isäntäsolun metyloidun 5'capin. Tämän jälkeen PA:n endonukleaasidomeeni irrottaa cap-rakenteen isäntäsolulta. (Te Velthuis & Fodor 2016) Isäntäsolun mRNA:sta varastetun 5'cap-rakenteen avulla isäntäsolun polymeerasi II aloittaa viraalisen RNA:n transkription. (Samji 2009)

Lukuun ottamatta kahta segmenttiä (7 ja 8) jokainen influenssa A-viruksen segmentti koodaa vain yhtä proteiinia. Segmentit 7 sekä 8 pystyvät koodaamaan kahta erilaista proteiinia silmukoinnin avulla. Segmentti 7 koodaa pääsääntöisesti M1-proteiinia, kun taas segmentti 8:n päätuote on NS1. Segmentit pystyvät koodaamaan myös M2-proteiinia sekä NEP-proteiinia, jotka syntyvät silmukoinnin lopputuloksena. (Bouvier & Palese 2008) Influenssaviruksella ei ole omaa silmukointikoneistoa, vaan se käyttää isäntäsolun silmukointikoneistoa. Lisäksi influenssavirus kykenee inhiboimaan isäntäsolua käyttämästä silmukointikoneistoa omiin toimintoihin, pääosin NS1-proteiinien avulla. Inhibointi tapahtuu silmukointi partikkeleiden uudelleen järjestämisen avulla, jonka NS1 aktivoi sitoutumalla mm. snRNA:han. (Samji 2009)

Integraaliset kalvoproteiinit valmistetaan ribosomeilla, josta ne kuljetetaan ER:lle laskostumista varten. ER:lta proteiinit kuljetetaan golgin laitteelle, jossa ne muokkaantuvat lopullisesti. Lopullisen muokkaamisen jälkeen proteiinit kulkeutuvat lopulta solukalvolle. M1-matriksiproteiinien sekä muiden proteiinien proteiinisynteesistä sekä kuljetuksesta solukalvolle tiedetään vain vähän. (Bouvier & Palese 2008) Ainoastaan negatiivisäikeiset vRNP kompleksit poistetaan tumahuokosten kautta. Kun kaikki influenssaviruksen osat on valmistettu ja kuljetettu solukalvon lähettyville voidaan viraaliset partikkelit koota ja vapauttaa solusta. (Samji 2009)

4. Influenssaviruksen aiheuttama immuunivaste

Influenssaviruksen infektiossa synnynnäinen vastustuskyky vastaa nopeasta, mutta epäspesifisestä puolustautumisesta influenssaviruksia vastaan. Synnynnäinen immunitetti ei kuitenkaan pysty luomaan muistia. Adaptiivinen immunitetti on puolestaan hitaampi ja spesifisempi kuin synnynnäinen immunitetti. Lisäksi adaptiivinen immunitetti pystyy luomaan muistisoluja, kuten T- ja B-muistisolut. (Van de Sandt *et al.* 2012)

4.1. Synnynnäinen immunitaetti

Synnynnäinen immunitaetti rakentuu fyysisistä esteistä (esim. lima ja lysosyyymi) sekä synnynnäisistä soluvasteista, kuten PRR-reseptoreista, makrofageista, NK-soluista ja dendriittisolusta (Van de Sandt *et al.* 2012)

Influenssaviruksen tunnistavat PRR-reseptorit voidaan jakaa kolmeen reseptorityyppiin. Näihin reseptoreihin kuuluvat TLR-reseptorit, RLR-reseptorit sekä NLR-inflammasomit. Influenssaviruksen RNA on immuunipuolustuksen aktivoija eli PAMP, jonka PRR-reseptorit tunnistavat. (Kreijtz *et al.* 2011) Intraselulaariset TLR7-reseptorit tunnistavat influenssa viruksen ssRNA:n, kun taas intraselulaariset TLR3-reseptorit sekä sytosolissa sijaitsevat RLR-reseptorit tunnistavat dsRNA:n. NLR-inflammasomeista NLRP3 aktivoituu influenssa viruksen dsRNA:sta. Näiden kaikkien reseptorien aktivoituminen johtaa lopulta interferonien, proinflammatoristen sytokiinien ja kemokiinien transkriptioon sekä neutrofiilien, makrofagien ja dendriittisolujen aktivointiin (Van de Sandt *et al.* 2012)

Alveolaariset makrofagit aktivoituvat influenssaviruksen infektoidessa keuhkoja. Nämä makrofagit estävät influenssaviruksen aiheuttaman infektion leviämistä fagosytoosin avulla. Lisäksi alveolaariset makrofagit tuottavat NOS2:ta ja TNF- α :a. (Kreijtz *et al.* 2011) NOS2 sekä TNF- α ovat vastuussa influenssaviruksen aiheuttaman taudin vakavuudesta (Van de Sandt *et al.* 2012). NK-solut tunnistavat vasta-aineilla merkityn infektoituneen solun, jonka jälkeen NK-solut kykenevät hajottamaan influenssaviruksen infektoiman solun vasta-aineesta riippuvaisen soluvälitteisen sytotoksisuuden (ADCC)-mekanismin avulla (Kreijtz *et al.* 2011).

Dendriittisolut (DC) ovat ns. professionaalisia antigeenin esittelijä soluja (APC) influenssaviruksen aiheuttamassa infektiossa. DC:t aktivoivat adaptiivista immuunijärjestelmää esittelemällä viraalisia antigeenejä naiiveille T- ja B-soluille sekä muisti T- ja B-soluille. DC:illa on kaksi toisistaan erillistä mekanismia tätä varten. Toinen reitti aktivoituu influenssaviruksen infektoidessa DC:n, jolloin proteasomit hajottavat viraaliset proteiinit pieniksi peptideiksi. Peptidit muodostavat MHC1-molekyylin kanssa kompleksin, joka kuljetetaan solun pinnalle virusspesifisten CD8⁺-sytotoksisten T-solujen tunnistettavaksi. Toinen mekanismi aktivoituu, kun DC:t fagosytoivat viruspartikkelin tai apoptoottisen epiteelisolun. Fagosytoosin jälkeen viraaliset proteiinit hajotetaan joko lysosomissa tai endosomeissa peptideiksi, jotka muodostavat kompleksin MHCII-molekyylin kanssa. CD4⁺ T-avustaja solut tunnistavat MHCII-molekyyliin sitoutuneen peptidin. (Van de Sandt *et al.* 2012)

4.2. Adaptiivinen immunitetti

Adaptiivinen immuunijärjestelmä voidaan jakaa humoraaliseen sekä soluvälitteiseen immunitettiin.

Humoraalinen immunitetti koostuu influenssavirukselle spesifisestä vasta-ainevasteesta. Influenssa spesifiset vasta-aineet tunnistavat mm. influenssaviruksen integraaliset kalvoproteiinit (HA, NA ja M2-ionikanava) sekä nukleoproteiinit. Influenssaviruksen aiheuttama infektiio indusoi IgA, IgM sekä IgG vasta-aineita. (Kreijtz *et al.* 2011)

Naiivien DC:en aktivoimat CD4⁺-solut voivat erikoistua joko T-auttaja 1 soluiksi (Th1) tai T-auttaja 2 soluiksi (Th2). Th1-solut tuottavat IFN- γ :a ja IL-2:ta sekä ovat vastuussa CTL-solujen aktivoinnissa. Lisäksi Th1-solut ovat olennaisia muisti CD8⁺-solujen indusoinnissa. CD4⁺-muistisoluja tuotetaan ensimmäisen influenssaviruksen aiheuttaman infektion jälkeen, jonka vuoksi CD4⁺-muistisoluilla on tärkeä rooli toisessa influenssaviruksen aiheuttamassa infektiossa. Naiivit CD8⁺-solut erikoistuvat CTL-soluiksi, jotka tunnistavat ja eliminoivat influenssaviruksen infektoimia soluja. CTL tunnistaa pääasiassa influenssaviruksen muuttumattomia sisäisiä proteiineja, kuten M1-proteiineja, NP ja PA. Tämän vuoksi CTL-solut mahdollistavat laajan immunitetin influenssaviruksen alatyyppejä vastaan.

Regulatoriset T-solut tasapainottavat immuunivastetta mm. kontrolloimalla CD4⁺- sekä CTL-vastetta. Th17 solut puolestaan estävät regulatoristen T-solujen toimintaa täten aktivoimien T-auttaja soluja. (Van de Sandt *et al.* 2012)

5. Kausi-influenssarokotteiden tuotantoprosessi

Kausi-influenssarokotteen tuotantoprosessi muodostuu useista eri vaiheista, jotka suoritetaan 6 kuukauden aikana. Tuotantoprosessiin sisältyy sopivien influenssavirusten kantojen valitseminen, reassortantivirusten tuotanto, reagenssin valmistus säteittäistä immunodiffuusiota varten, virusten tuotanto, monovalenttisen tuotteen valmistus, TIV sekoitteen valmistus, rokotteen lopullinen valmistus, rokotteen vapautus, kliinisen datan keräys sekä rokotteen jakelu datan hyväksymisen jälkeen. (Soema *et al.* 2015)

Kausi-influenssarokotteen valmistaminen aloitetaan valitsemalla kyseisellä hetkellä kiertävien influenssaviruksien kannat rokotteeseen. Valinnassa hyödynnetään

kolmenlaista antigeenistä dataa, jotka ovat HA:n inhibitiomääritys fretin infektion jälkeisestä antiseerumista, serologiset analyysit ennen ja jälkeen rokotuksen seerumi näytteistä sekä influenssaviruksen HA:sta sekvensoidusta datasta. Kerätyt datat esitellään kokouksissa, jotka pidetään kahdesti vuodessa. (Wong & Webby 2013)

WHO päättää kausi-influenssarokotteiden suositeltavan koostumuksen, mutta kunkin maan kansalliset sääntelyelimet tekevät itse lopullisen päätöksen käytettävistä influenssaviruksien kannoista kunakin vuonna. (Wong & Webby 2013) Käytettävien influenssaviruksen kantojen valitsemisen jälkeen influenssarokotteen jakelun aloittamiseen on noin 6 kuukautta aikaa (Soema *et al.* 2015).

Valinnan jälkeen influenssarokotteiden teollinen tuotantovaihe aloitetaan (Wong & Webby 2013). Villi tyyppin Influenssa A-virusten kasvu kananmunissa optimoidaan käyttämällä master-viruksien, kuten A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) (Soema *et al.* 2015). Villityypin influenssa A-virus muodostaa yhdessä master-viruksen kanssa reassortanttiviruksen, joka sisältää ainakin HA sekä NA segmentit villityypin influenssa A-viruksesta ja loput segmentit master-virukselta. Reassortanttivirukset valmistetaan infektoimalla kananmunat sekä master-viruksella että valitulla influenssa A-viruksen kannoilla. Tuotetut reassortanttivirukset kloonataan ja varmistetaan sekvensoimalla. Puolestaan influenssa B-virusten tuottoon influenssarokotteita varten käytetään tyypillisesti ainoastaan villityypin viruksia. (Wong & Webby 2013)

Virusten tuotannon jälkeen valmistetaan lopullinen rokote, jonka jakelu aloitetaan pohjoisella pallonpuoliskolla elo-syyskuussa ja eteläisellä pallonpuoliskolla helmimaaliskuussa (Soema *et al.* 2015).

5.1. Ongelmat influenssarokotteen tuotantoprosessissa

Influenssarokotteiden tuotannossa mahdollisia ongelmia aiheuttavat kananmunien saatavuus, virusten kasvamisnopeus sekä sääntelyvaatimukset. Lisäksi tuottajien täytyy myös täyttää bioturvallisuus sekä steriiliys vaatimukset tuotantoprosessin aikana (Wong & Webby 2013).

Ongelmia aiheuttaa erityisesti influenssavirusten kasvatusta kananmunissa, joka voitaisiin tulevaisuudessa ratkaista mm. käyttämällä soluviljelyä influenssavirusten kasvatukseen. Soluviljelyn käyttö influenssavirusten tuotannossa mahdollistaisi mm. suuremman tuoton sekä riippumattomuuden virusten tuotantoon sopivista kananmunista.

(Soema *et al.* 2015) Lisäksi influenssavirusten tuottaminen kananmunissa aiheuttaa potentiaalisen riskin linnun patogeenien aiheuttamalle kontaminaatiolle sekä teoreettisen riskin henkilöille, jotka ovat allergisia kananmunille (Wong & Webby 2013).

6. Käytössä olevat influenssarokotteet

Tällä hetkellä influenssarokote on tehokkain tapa suojautua influenssa A- ja B-viruksen aiheuttamaa infektiota vastaan (Soema *et al.* 2015). Kausi-influenssarokotteen ottamista suositellaan yli 65-vuotiaille, pitkäaikaissairaudesta kärsiville henkilöille, terveydenalalla työskenteleville sekä raskaana oleville naisille (Wong & Webby 2013, Osterholm *et al.* 2012). Käytössä olevat influenssarokotteet antavat hyvin spesifisen suojan tietyille influenssa A- ja B-viruksen kannoille (Margine *et al.* 2013). Muodostunut immuniteetti kestää kuitenkin vain lyhyen ajan (Krammer & Palese 2015).

Tällä hetkellä yleisimmin käytetty kausi-influenssarokote on trivalenttinen influenssa rokote (TIV) (Wong & Webby 2013). Lisäksi käytössä on LAIV-rokote, joka sisältää eläviä heikennettyjä influenssavirusia. LAIV-rokote voidaan antaa henkilöille jotka ovat 2-49-vuotiaita, eivätkä ole raskaana. LAIV-rokotteen on todettu olevan tehokas erityisesti 2-7 vuotiaille lapsille. (Osterholm *et al.* 2012) Heikentyneestä immuunipuolustuksesta kärsiville henkilöille tai heidän lähiomaisilleen ei kuitenkaan suositella LAIV-rokotetta (Wong & Webby 2013). Influenssarokotteita valmistetaan erikseen vuotuisia epidemioita sekä ajoittaisia pandemioita varten. (Krammer & Palese 2015)

Käytössä olevat influenssarokotteet sisältävät joko inaktivoituja influenssa A- ja B-virusia tai eläviä heikennettyjä influenssa A- ja B-virusia. Influenssarokotteen sisältämät inaktivoidut influenssavirukset voivat olla mm. kokonaisia tai pilkottuja influenssavirusia (split-rokote). Lisäksi käytetään paljon ainoastaan influenssaviruksen pintaproteiineja sisältävää influenssarokotetta (subunit-rokote). (Soema *et al.* 2015)

Käytössä olevat influenssarokotteet indusoivat pääasiassa neutralisoivien vasta-aineiden tuotantoa HA:n globulaarista päädomeenia vastaan. Ongelmana on kuitenkin jatkuva antigeeninen ajautuminen HA:n globulaarisessa päädomeenissa, jonka vuoksi hankittu immuunijärjestelmä ei kykene havaitsemaan influenssavirusta. (Margine *et al.* 2013)

Näiden influenssarokotteiden tehokkuutta voitaisiin parantaa lisäämällä rokotteen immunogeenin määrää sekä käyttämällä adjuvantteja. Lisäksi QIV-rokotteella on saatu

parannettua TIV-rokotteen tehokkuutta lisäämällä yksi influenssa B-virus (Krammer & Palese 2015).

6.1. Trivalenttinen influenssarokote (TIV)

TIV-rokote on intramuskulaarisesti annettava influenssarokote, joka sisältää kaksi influenssa A-viruksen kantaa (H1N1 ja H3N2) sekä yhden influenssa B-viruksen linjoista (Yamagata ja Victoria) (Wong & Webby 2013, Sautto *et al.* 2018).

Käytössä olevat TIV-rokotteet sisältävät pääasiassa joko pilkottuja influenssaviruksia tai ainoastaan influenssaviruksen pintaproteiineja. Kokonainen influenssavirus voidaan pilkkoa käyttämällä joko dietyylieetteriä tai pesuainekäsittelyä. Pilkkomisen jälkeen HA ja NA on mahdollista eristää lipidivaipasta subunit-rokotetta varten. Influenssaviruksen rakenteen pilkkominen influenssarokotetta varten heikentää influenssaviruksen luontaista immunogeenisyyttä. Lisäksi immunogeenisyyttä heikentää pilkkomisen yhteydessä menetettävä negatiivisäikeinen RNA. (Soema *et al.* 2015).

Standardien mukaisessa TIV-rokotteessa on kaiken kaikkiaan 45µg HA:a eli 15µg kustakin rokotteesta käytetystä influenssaviruksesta (Wong & Webby 2013). TIV-rokotteen tehokkuutta erityisesti ikäihmisiin sekä lapsiin voidaan parantaa esimerkiksi lisäämällä HA:n määrää rokotteessa tai käyttämällä sopivia adjuvantteja, kuten MF59-adjuvanttia. (Soema *et al.* 2015, Wong & Webby 2013).

Lisäksi TIV-rokotteesta on lisensoitu myös intradermaalisesti eli ihonsisäisesti annettava split-rokote, joka sisältää 9µg HA-glykoproteiinia jokaisesta rokotteesta käytetystä influenssaviruksesta. Intradermaalisessa TIV-rokotteessa voidaan käyttää vähemmän HA:a kuin intramuskulaarisesti annettavassa rokotteessa ihon pinnalla olevien APC-solujen takia. (Soema *et al.* 2015)

6.2. Elävää heikennettyä influenssavirusta sisältävät rokotteet (LAIV-rokote)

TIV-rokotteen lisäksi voidaan käyttää intranasaalisesti annettavaa influenssarokotetta, joka sisältää eläviä, heikennettyjä influenssaviruksia (LAIV-rokote) (Soema *et al.* 2015) LAIV-rokote sisältää TIV-rokotteen tavoin kaksi influenssa A-viruksen kantaa sekä toisen influenssa B-viruksen linjoista. (Wong & Webby 2013). Intranasaalisesti annettava LAIV-rokote jäljittelee luonnollista influenssaviruksen aiheuttamaa infektiota. (Soema *et al.* 2015)

LAIV-rokotteessa käytetään kylmäkäsiteltyjä influenssaviruksia, jotka elävät ja monistuvat lämpötilan ollessa +25 °C:sta ja kuolevat lämpötilan noustessa +35°C:een. Toisin sanoen LAIV-rokotteen influenssavirukset kuolevat siirtyessään nenästä hengitysteihin. (Wong & Webby 2013).

LAIV-rokote indusoi kauemmin kestävästä vasta-ainevastetta kuin TIV-rokote (Wong & Webby 2013). Rokotteen tehokkuus perustuu vahvan mukosaalisen IgA-vasteen syntyyn sekä soluvälitteisen immunitetin kehittymiseen influenssaviruksia vastaan (Soema *et al.* 2015).

6.3. Nelivalenttinen influenssarokote (QIV)

QIV-rokote kehitettiin parantamaan TIV-rokotteen tehokkuutta lisäämällä myös toinen influenssa B-viruksen kiertävistä linjoista rokotteeseen. QIV-rokote sisältääkin yhteensä neljää kiertävää influenssavirusta. Ylimääräisen influenssa B-viruksen linjan lisääminen lisää kausi-influenssarokotteen tehokkuutta, koska useampana vuonna TIV-rokotteeseen on valittu väärä influenssa B-viruksen kiertävistä linjoista. (Soema *et al.* 2015) Moa *et al.* tekemän tutkimuksen mukaan QIV-rokote antaa yhtä hyvän tehokkuuden, kuin TIV-rokote käytetyille kahdelle influenssa A-viruksen kannoille sekä yhdelle influenssa B-viruksen käytetyistä linjoista. Lisäksi tutkimus osoitti QIV-rokotteen antavan erinomaisen suojan myös toiselle QIV-rokotteeseen lisätylle influenssa B-viruksen linjalle. (Moa *et al.* 2016) QIV-rokotteesta on kehitetty mm. sekä split-rokotteita että subunit-rokotteita. (Soema *et al.* 2015).

Suomen sosiaali- ja terveystieteiden tiedotteen mukaan QIV-rokote otetaan käyttöön ensimmäistä kertaa Suomessa syksyllä 2018. Käyttöön otettava QIV-rokote on Sanofi Oy:ltä hankittu Vaxigrip Tetra -influenssarokote. (Sosiaali- ja terveystieteiden tiedote 2018)

6.4. Pandemiarokote

Ainoastaan Influenssa A-virus voi aiheuttaa pandemioita, jos se kykenee levittäytymään ihmisestä toiseen tehokkaasti sekä omaa suurimmaksi osaksi uudelleen järjestäytyneen genomin, jossa on segmenttejä sekä ihmiseltä että muilta lajeilta. Pandemian jälkeen kyseinen influenssa A-virus jää kiertämään ja aiheuttaa kausittaisia epidemioita käyden samalla läpi antigeneettistä ajautumista. (Krammer & Palese 2015)

Tällä hetkellä potentiaalisin pandemian aiheuttava influenssa A-virus on H5N1, joka on toisinaan aiheuttanut tappavia infektoita laajalla alueella. Ihmiset eivät ole kuitenkaan

täysin puolustuskyvyttömiä H5N1 virukselle, koska NA:n alatyypit N1 on hyvin samankaltainen tällä hetkellä kiertävän H1N1 NA:n kanssa. Lisäksi monet Influenssa A-viruksen alatyypit, kuten H7N9 ja H6N1 ovat aiheuttaneet kuolemia Aasiassa. (Krammer & Palese 2015)

Vaikka kokonaisia inaktivoituja influenssaviruksia käytetään harvemmin kausi-influenssarokotteissa ovat ne yleisiä pandemiarokotteissa. Kokonaisia inaktivoituja influenssaviruksia käytetään pandemiarokotteissa niiden korkean immunogeenisyyden vuoksi. Lisäksi LAIV-rokotteen kaltaista rokotetta ollaan harkittu käytettäväksi influenssa A-viruksen aiheuttamaa pandemiaa vastaan. (Soema *et al.* 2015)

Pandemiarokotteen tehokkuutta voidaan lisätä mm. käyttämällä adjuvantteja. (Soema *et al.* 2015) Lisäksi yksi strategia parantaa Pandemiarokotteen tehokkuutta on käyttämällä ensisijaisesti LAIV- tai DNA-rokotetta, jonka jälkeen annettaisiin tehosterokotteena inaktivoituja influenssaviruksia sisältävä influenssarokote (Krammer & Palese 2015).

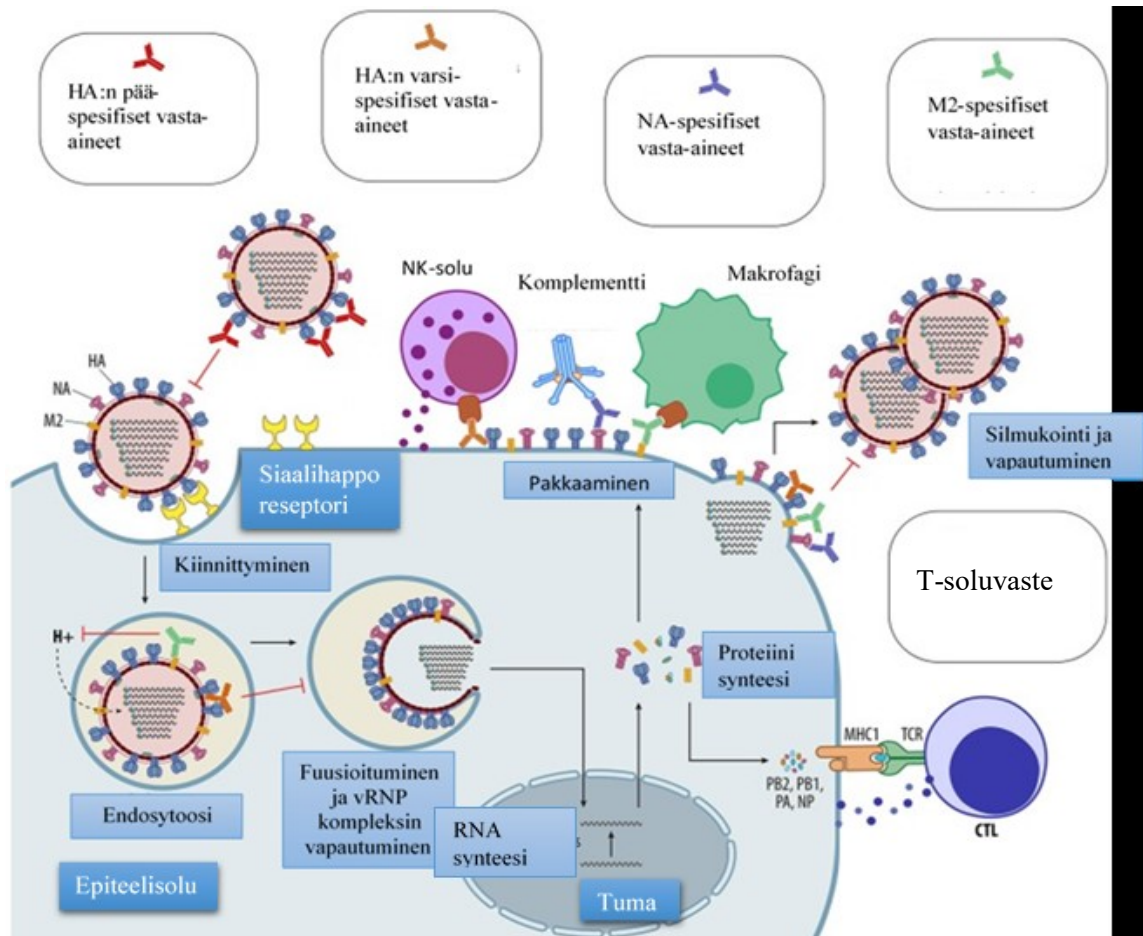
7. Kehitteillä olevat universaalit influenssarokotteet

Tänä päivänä käytettävät influenssarokotteet muodostavat immuniteetin ainoastaan rokotteessa käytetyille influenssa A- ja B-viruksen kannoille. Lisäksi influenssarokotteesta syntynyt immuniteetti on hyvin rajoittunut HA:n sekä NA:n antigeenistä variaatiota kohtaan. (Te Velthuis & Fodor 2016, Krammer & Palese 2015)

Uudenlaisia influenssarokotteita kehitettäessä pyritään valmistamaan mahdollisimman universaali influenssarokote eli rokotteen antaman immuniteetin tulisi olla mahdollisimman laaja influenssa A- ja B-viruksien kantoja vastaan. Lisäksi influenssarokotteiden kehityksessä tehokkuutta ikäihmisille sekä immuunipuutoksesta kärsiville henkilöille pitäisi parantaa. (Soema *et al.* 2015)

Universaalien influenssarokotteiden kehittämisessä on keskitytty kehittämään rokotteita, jotka luovat immuniteetin influenssa A- ja B-viruksissa esiintyviä muuttumattomia tai samankaltaisia alueita vastaan alatyypistä riippumatta. (Wong & Webby 2013). Tällaisia alueita ovat mm HA:n varsidomeeni sekä M2-ionikananvan N-terminaalinen ektodomeeni. Lisäksi yksi kehitteillä oleva influenssarokote keskittyy aktivoimaan T-soluvastetta. (Soema *et al.* 2015). Universaalien influenssarokotteen kehittäminen mahdollistaisi influenssarokotteen

ympäri vuotisen valmistuksen, sillä rokotetta ei tarvitsisi uusia vuosittain. (Wong & Webby 2013).



Kuva 2. Kehitteillä olevien influenssarokotteiden aktivoimat vasta-aineet ja niiden vaikutukset influenssaviruksen monistumiseen sekä immuunijärjestelmään. HA:n pääspesifiset vasta-aineet inhiboivat influenssaviruksen sitoutumista siaalihappoon sekä solumembraanin ja viraalisen membraanifuusioitumista. HA:n varspesifiset vasta-aineet estävät endosomin fuusioitumisen. NA-spesifiset sekä M2-spesifiset vasta-aineet inhiboivat influenssaviruksien vapautumista solusta. Lisäksi HA:n varspesifiset vasta-aineet, HA:n pääspesifiset vasta-aineet sekä NA-spesifiset vasta-aineet aktivoivat immuunijärjestelmän eri reittejä mm. NK-solujen ja komplementtijärjestelmän avulla. M2-spesifiset vasta-aineet aktivoivat myös makrofageja. T-soluvastetta aktivoiva rokotteen aiheuttaa infektoituneiden solujen hajoamisen. (Rajão & Pérez 2018) Kuvan lähde: Rajão & Pérez 2018 (muokattu ja suomennettu)

7.1. HA:n varsidomeeniin pohjautuvat influenssarokotteet

Influenssaviruksen aiheuttama infektio aktivoi neutraloivien vasta-aineiden tuottoa HA:n globulaarista päädomeenia sekä varsidomeenia vastaan. Tällä hetkellä käytössä olevat influenssarokotteet indusoivat pääasiassa kuitenkin vasta-aineiden tuotantoa ainoastaan HA:n globulaarista päädomeenia vastaan. (Sautto *et al.* 2018)

HA:n varsireaktiiviset vasta-aineet voivat estää joko influenssaviruksen siirtymisen solun sisäpuolelle tai influenssaviruksen genomin vapautumisen solun sytosoliin (Soema *et al.* 2015). Lisäksi varsireaktiiviset vasta-aineet aktivoivat ADCC-mekanismiin sekä komplementtijärjestelmän. (Krammer & Palese 2015) Varsi-reaktiiviset vasta-aineet mahdollistavat laajan immuniteetin sekä kausi-influenssaviruksia että pandemia influenssaviruksen kantoja vastaan. Jotta varsi-pohjainen influenssarokote antaisi laajan suojan influenssa A- ja B-viruksia vastaan täytyisi sen sisältää molemmista influenssa A-viruksen fylogeneettisista ryhmistä ainakin yhtä HA:a sekä influenssa B-viruksen HA:a. (Krammer *et al.* 2014)

HA:n varsidomeeniin kohdistuvia influenssarokotteita on kehitteillä useita, koska HA:n varsidomeeni on hyvin konservoitunutta aluetta verrattuna globulaariseen päädomeeniin. (Sautto *et al.* 2018) Lisäksi mutaatiot HA:n varsidomeenin alueella voisivat mahdollisesti häiritä influenssa viruksen infektoimiskykyä (Krammer & Palese 2013). HA:n varsidomeeniin pohjautuvissa influenssarokotteissa ollaan käytetty mm. kimeeristä HA:a (Sautto *et al.* 2018).

Kimeerinen HA koostuu influenssa A-viruksen H1 tai H3 varsidomeenista tai influenssa B-viruksen varsidomeenista. Lisäksi varsidomeeniin yhdistetään ”eksoottinen” globulaarinen päädomeeni, joka on yleensä peräisin linnun influenssa A-virukselta. HA:n rikkisidokset rajaavat domeenit varsi- ja globulaariseen päädomeeniin. (Krammer & Palese 2015)

On kuitenkin havaittu, että kimeeristä HA:a sisältävä influenssarokote antaa yhtä lyhyen suojan influenssaviruksia vastaan kuin tänä päivänä käytettävät influenssarokotteet. Immuniteetin kestoa voitaisiin mahdollisesti parantaa käyttämällä adjuvantteja rokotteessa. Kimeeristä HA:a sisältävä influenssarokote antaisi parhaimman ja monipuolisimman suojan peräkkäisinä annoksina antamalla ensin LAIV-rokote, jonka jälkeen immuniteetin kestävyyttä parannettaisiin vielä TIV-rokotteella. Tällaisen rokotesarjan toiminnan ajatellaan perustuvan eri immuunireittien aktivointiin, koska LAIV-rokote aktivoi ylähengitysteiden immuunijärjestelmää, kun taas intramuskulaarisesti annettava rokote aktivoi jo hankittua immuniteettiä. (Sautto *et al.* 2018)

Useat tutkimustulokset ovat vahvistaneet kimeeristen HA:en muodostavan laajan immuniteetin influenssaviruksia vastaan. Krammer *et al.* hiirillä tekemän tutkimuksen mukaan peräkkäisinä annetut kimeeristä HA:a sisältävät influenssarokotteet mahdollistavan laajan humoraaliseen vasteen influenssaviruksia vastaan (Krammer *et al.* 2013). Lisäksi freteille tehty tutkimus on osoittanut kimeeristen HA:en olevan tehokkaita laajan immuniteetin muodostamisessa influenssaviruksia vastaan (Krammer *et al.* 2014).

Muissa HA:n varsidomeeniin pohjautuvissa influenssarokotteissa on käytetty mm. HA:a ilman globulaarista päädomeenia ja hyperglykolysoitua HA:n päädomeenia (ns. glykaanimaski) (Krammer & Palese 2015).

7.2. HA:n Globulaariseen päädomeeniin pohjautuvat influenssarokotteet

Influenssaviruksen HA:n globulaarisesta päädomeenista löytyy epitooppeja, jotka eivät ole ainoastaan pysyviä influenssavirusten alatyypeillä vaan myös eri alatyypin välillä. (Sautto *et al.* 2018) Laajempaa immuniteettiä influenssavirusten HA:n globulaarista päädomeenia kohtaan yritetään kehittää jatkuvasti. Globulaariseen päädomeeniin keskittyvässä influenssarokote kehityksessä keskitytään tunnistamaan ns. keskeisiä sekvenssejä, jotka ovat hyvin vanhoja. Lisäksi tehdään laskennallisia analyyskejä (COBRA). COBRA on laskennallisesti optimoitu laajan valikoiman antigeenejä sisältävä synteettisesti valmistettu HA. (Krammer & Palese 2015)

COBRA-pohjaiset influenssarokotteen prototyypit aktivoivat immuunivastetta, joka kykenee suojaamaan menneiltä ja nykyisiltä influenssaviruksilta sekä teoreettisesti myös tulevilta influenssaviruksilta. (Sautto *et al.* 2018)

7.3. NA:n pohjautuvat influenssarokotteet

NA:ssa tapahtuu vähemmän antigeenistä ajautumista kuin HA:n globulaarisessa päädomeenissa. Tällä hetkellä käytettävissä influenssarokotteissa ei ole standardoitu NA:n määrää rokotetta kohden. Lisäksi NA:n stabiiliudesta sekä konfirmaatiosta käytettävissä rokoteteissa ei ole varmaa tietoa. (Krammer & Palese 2015) NA pohjainen influenssarokote aktivoi NA-spesifisiä vasta-aineita, jotka vaikuttavat influenssaviruksen vapautumiseen solunpinnalta sekä uusien virusten tuotantoon laskevasti (Rajão & Pérez 2018)

HA:n globulaarisen pään on huomattu olevan dominoivampi, jonka vuoksi vasta-ainevaste on suurempi HA:n globulaarista päädomeenia vastaan kuin NA:a. Tämän vuoksi NA:n pohjautuvissa influenssarokotteissa voitaisiinkin käyttää sekä NA:a että ns. eksoottisempia HA:n globulaarisia päädomeeneja tai ainoastaan NA:a. Kumpikin tapa aktivoisi enemmän NA-spesifisiä vasta-aineita kuin HA:n pääspesifisiä vasta-aineita. (Krammer & Palese 2015)

7.4. M2-ionikanavan ektodomeeniin pohjautuvat influenssarokotteet

Tällä hetkellä käytössä olevat kausi-influenssarokotteet eivät juurikaan aktivoi M2-ionikanavalle spesifisiä vasta-aineita (Soema *et al.* 2015). M2-ionikanavan N-terminaalinen ektodomeeni sisältää hyvin pysyvän sekvenssin, joka on muuttumaton influenssavirusten välillä. Tämä sekvenssin samankaltaisuus influenssavirusten välillä mahdollistaa laajan immuunivasteen syntymisen influenssavirusten eri kantojen välille. (Fiers *et al.* 2009)

Tällä hetkellä käytössä olevat kausi-influenssarokotteet eivät sisällä influenssaviruksen M2-proteiinia eikä se täten myöskään aktivoi vasta-aine tuotantoa M2-ionikanavia vastaan. (Soema *et al.* 2015) Todennäköisesti M2-spesifiset vasta-aineet eivät neutralisoi influenssavirusta (Wong & Webby 2013). M2-ionikanavan N-terminaaliseen ektodomeeniin spesifiset vasta-aineet pystyvät merkitä solun NK-solujen tai makrofagien fagosytoitavaksi ADCC-mekanismiin, Opsonisaation tai komplementtijärjestelmän avulla. (Rajão & Pérez 2018) Lisäksi nämä vasta-aineet voivat häiritä influenssaviruksen vapautumista solusta. M2-ionikanavaan pohjautuvat influenssarokotteet eivät kuitenkaan estä influenssaviruksen aiheuttamaa infektiota, mutta vasta-aineet pystyvät inhiboimaan viraalista replikoitumista viruksen kulkeutuessa soluun. (Soema *et al.* 2015)

M2-ionikanavan N-terminaalisen ektodomeenin immunogeenisyys on luonnostaan huono, mutta immunogeenisyyttä on yritetty parantaa mm. lisäämällä rokotteeseen adjuvantteja, M2-ionikanavan multimeerisen rakenteen avulla, immunisoimalla muiden influenssarokotteiden kanssa sekä fuusioimalla kantajaproteiinin kanssa. (Rajão & Perez 2018) Esimerkiksi M2-ionikanavan N-terminaalisen ektodomeenin peptidi muokattiin erittäin immunogeeniseksi fuusioimalla se joko geneettisesti tai kemiallisesti sopivaan kantajaan, kuten viruksen kaltaiseen partikkeliin (VLP). (Fiers *et al.* 2009)

7.5. Sytotoksisia T-lymfosyyttejä aktivoivat influenssarokotteet

Aktivoituvien sytotoksisten T-lymfosyyttien (CTL) määrää influenssarokotteen jälkeen on yritetty kasvattaa, koska CTL:t vaikuttavat erityisesti influenssaviruksen konservoituneisiin proteiineihin luoden laajemman immuniteetin influenssaviruksia vastaan. CTL:t vaikuttavat pääasiassa influenssaviruksen sisäisiin proteiineihin, jonka vuoksi CTL:t eivät estä infektion syntymistä vaan tarjoavat apua infektoituneille soluille sekä estävät infektion leviämistä muihin soluihin.

Tutkimukset ovat osoittaneet, että influenssaviruksen aiheuttaman infektion olevan lievempi sekä nopeampi, jos henkilöllä on jo ennestään CTL:jä (Soema *et al.* 2015). Vaikka CTL-immuniteettiä aktivoivat influenssarokotteet eivät todennäköisesti estäisi infektiota tai sairautta ne voisivat vähentää merkittävästi influenssaviruksista johtuvia kuolemia. (Wong & Webby 2013).

8. Lopuksi

Tällä hetkellä käytössä olevat influenssarokotteet eivät muodosta riittävän laajaa sekä kauan kestävästä vastustuskykyä influenssaviruksia vastaan. Lisäksi käytössä olevien influenssarokotteiden tehokkuutta laskee huomattavasti yhteensopimattomuudet kiertävien influenssavirusten kanssa (Krammer & Palese 2015). Kehitteillä olevien universaalien influenssarokotteiden tulisi aktivoida useita eri immuunireittejä, kuten vasta-ainetuotantoa ja T-soluvastetta influenssaviruksien muuttumattomia sekä alatyypin ylittäviä epitooppeja kohtaan. (Rajäro & Pérez 2018)

Influenssaviruksen monistumisen ymmärtäminen isäntäsolussa mahdollistaisi mm. parempien rokotteiden kehityksen (Samji 2009). Lisäksi influenssaviruksen aktivoiman immuniteetin ymmärtäminen paremmin sekä laajemmin edesauttaisi tehokkaampien influenssarokotteiden kehitystä (Van de Sandt *et al.* 2012) Universaalien influenssarokotteiden tuotantoprosessin kehittäminen universaalille influenssarokotteelle vähentäisi merkittävästi influenssavirusten aiheuttamien epidemioiden sekä pandemioiden terveydellistä taakkaa (Rajäro & Pérez 2018).

9. Lähteet

Bouvier NM & Palese P (2008) THE BIOLOGY OF INFLUENZA VIRUSES. Vaccine [online] 26(4):D49-D53 [viitattu 6 tammikuuta 2018] saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3074182/>

Byrd-Leotis L, Cummings RD & Steinhauer DA (2017) The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase. International Journal of Molecular Sciences [online] 18(7): 1541 [viitattu 20 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.3390/ijms18071541>

Fiers W, De Filette M, El Bakkouri K, Schepens B, Roose K, Schotsaert M, Birkett A & Saelens X (2009) M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine* [online] 23;27(45):6280-3 [viitattu 25 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.007>

Gagneux P, Cheriyan M, Hurtado-Ziola N, Brinkman van der Linden ECM, Anderson D, McClure H, Varki A and Varki NM (2011) Human-specific Regulation of α 2-6-linked Sialic Acids. *Journal of biological chemistry* [online] 278:48245-48250 [viitattu 20 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.1074/jbc.M309813200>

Gamblin SJ & Skehel JJ (2010) Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins. *Journal of biological chemistry* [online] 285(37):28403-28409 [viitattu 10 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.1074/jbc.R110.129809>

Krammer F & Palese P (2013) Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines. *Current Opinion in Virology* [online] 3(5): 521–530 [viitattu 10 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.07.007>

Krammer F & Palese P (2015) Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nature reviews drug discovery* [online] 14(3):167-82 [viitattu 1 maaliskuuta 2018] saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25722244>

Krammer F, Hai R, Yondola, M, Tan GS, Leyva-Grado VH, Ryder AB, Miller MS, Rose, JK, Palese P, García-Sastre A & Albrecht RA (2014) Assessment of Influenza Virus Hemagglutinin Stalk-Based Immunity in Ferrets. *Journal of Virology* [online] 88(6):3432–3442 [viitattu 25 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.1128/JVI.03004-13>

Krammer F, Pica N, Hai R, Margine I & Palese P (2013). Chimeric Hemagglutinin Influenza Virus Vaccine Constructs Elicit Broadly Protective Stalk-Specific Antibodies. *Journal of Virology* [online] 87(12): 6542–6550 [viitattu 25 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.1128/JVI.00641-13>

Kreijtz JH, Fouchier RA & Rimmelzwaan GF (2011) Immune responses to influenza virus infection. *Virus research* [online] 162:19-30 [viitattu 28 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.022>

Margine I, Krammer F, Hai R, Heaton NS, Tan GS, Andrews SA, Runstadler JA, Wilson PC, Albrecht RA, Garcia-sastre A & Palese P (2013). Hemagglutinin Stalk-Based Universal Vaccine Constructs Protect against Group 2 Influenza A Viruses. *Journal of Virology* [online]

87(19): 10435–10446 [viitattu 18 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.1128/JVI.01715-13>

Moa AM, Chughtai AA, Muscatello DJ, Turner RM & MacIntyre CR (2016) Immunogenicity and safety of inactivated quadrivalent influenza vaccine in adults: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Vaccine* [online] 29;34(35):4092-4102 [viitattu 21 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.064>

Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, & Belongia EA (2012) Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *The lancet infectious diseases* [online] 12(1):36-44 [viitattu 20 maaliskuuta 2018] saatavissa: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70295-X](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70295-X)

Pielak RM & Chou JJ (2011) Influenza M2 proton channels. *Biochimica et Biophysica Acta* [online] 1808(2):522–529 [viitattu 15 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.04.015>

Pinto LH & Lamb RA (2005) The M2 Proton Channels of Influenza A and B Viruses. *Journal of biological chemistry* [online] 281, 8997-9000 [viitattu 15 helmikuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.1074/jbc.R500020200>

Rajão, DS & Pérez DR (2018) Universal Vaccines and Vaccine Platforms to Protect against Influenza Viruses in Humans and Agriculture. *Frontiers in Microbiology* [online] 9:123 [viitattu 15 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00123>

Samji T (2009) Influenza A: Understanding the Viral Life Cycl. *Yale journal of biology and medicine* [online] 82(4):153-159 [viitattu 15 maaliskuuta 2018] saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2794490/>

Sautto GA, Kirchenbaum GA & Ross TM (2018) Towards a universal influenza vaccine: different approaches for one goal. *Virology Journal* [online] 15:17 [viitattu 28 helmikuuta 2018] saatavissa: <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0918-y>

Soema PC, Kompier R, Amorij J-P & Kersten GFA (2015) Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online] 94:251-63 [viitattu 9 tammikuuta 2018] saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.023>

Sosiaali- ja terveysministeriö (2018) Kattavampi influenssarokote käyttöön ensi syksynä. Tiedote Saatavissa: http://stm.fi/artikkeli/-/asset_publisher/kattavampi-influenssarokote-kayttoon-ensi-syksyna

Sriwilajaroen N & Suzuki Y (2012). Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* [online] 88(6), 226–249 [viitattu 10 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.2183/pjab.88.226>

Taubenberger JK & Morens DM (2008) The Pathology of Influenza Virus Infections. *Annual review of pathology* [online] 3:499-522 [viitattu 10 tammikuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154316>

Te Velthuis AJW & Fodor E (2016) Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nature Reviews. Microbiology* [online] 14(8):479–493 [viitattu 15 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87>

Van de Sandt CE, Kreijtz JHCM & Rimmelzwaan GF (2012) Evasion of Influenza A Viruses from Innate and Adaptive Immune Responses. *Viruses* [online] 4(9):1438–1476 [Viitattu 28 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://doi.org/10.3390/v4091438>

Wohlbold TJ & Krammer F (2014) In the Shadow of Hemagglutinin: A Growing Interest in Influenza Viral Neuraminidase and Its Role as a Vaccine Antigen. *Viruses* [online] 6, 2465-2494 [viitattu 1 huhtikuuta 2018] saatavissa <http://doi.org/10.3390/v6062465>

Wong SS & Webby RJ (2013) Traditional and new influenza vaccines. *Clinical Microbiology Reviews* [online] 26(3): 476–492 [viitattu 27 maaliskuuta 2018] saatavissa: <http://cmr.asm.org/content/26/3/476.long>