

Molekyylitiedon avulla influenssaa vastaan

Käänteisen genetiikan avulla pystytään nykyisin tuottamaan uusia influenssaviruksia, joista patogeenisuustekijät on eliminoitu mutta joissa antigeenisuus on säilynyt. Näihin seikkoihin perustuu uusien rokotteiden valmistus. Virusproteiinien rakenteesta saatu yksityiskohtainen tieto on osaltaan mahdollistanut influenssalääkkeiden suunnittelun. Keinomme tunnistaa vastustaja ja taistella sitä vastaan lisääntyvät koko ajan.

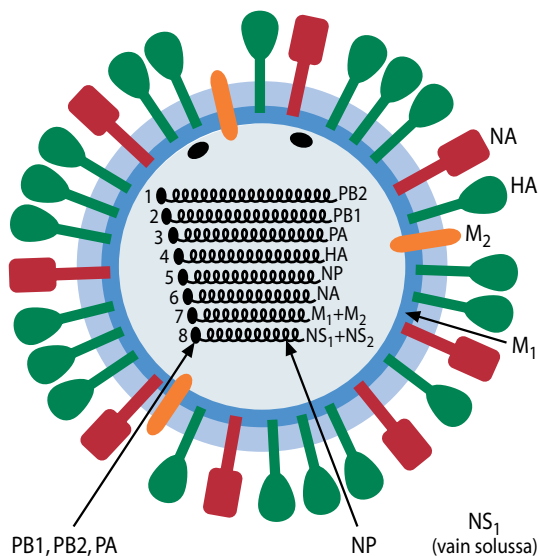
Influenssavirus on piinannut ihmiskuntaa ehkä tuhansia vuosia (Pyhälä 2002, Linnanmäki 2006). Viime vuosisadalla monet muut vaaralliset virustaudit, kuten isorokko, kelta-kuume, polio, sikotauti, tuhkarokko ja vihurirokko, saatiin hallintaan tehokkaiden rokotteiden ansiosta. Myös influenssaa vastaan suositellaan riskiryhmien vuosittaisia rokotuksia.

Influenssavirus on ovela vastustaja, joka onnistuu jatkuvasti välttämään elimistön aikaisemmin muodostuneiden vasta-aineiden suojamuurin. Virustutkijat ovat vuosikymmenien aikana selvittäneet influenssaviruksen rakennetta ja lisääntymistä soluissa. Näin on saatu tietoa viruksen ainutlaatuisista strategioista, joiden avulla se murtaa isäntiensä tehokkaat puolustusjärjestelmät (yleiskatsaukset Pyhälä 2002, Horimoto ja Kawaoka 2005). Näiden tutkimusten tulokset pätevät myös eläimistä, esimerkiksi linnuista, peräisin oleviin influenssaviruksiin.

Influenssavirusperhe koostuu influenssa A, B ja C -viruksista. Merkittävin influenssavirusten ominaisuus on niiden 7–8 geenin sijainti erilisinä jaokkeina päinvastoin kuin useimmissa muissa viruksissa. Jaokkeita voitaisiin verrata junan vaunuihin, joissa jokaisella on oma tehtävä. »Vaunut» irtoavat toisistaan sen jälkeen, kun virus on tunkeutunut solun sisälle.

Influenssa A ja B -virusten pinnalla on hemagglutiniinia (HA) ja neuraminidaasia (NA), jotka ovat glykoproteiineja (kuva 1). HA-proteiinin avulla virus tarttuu solun pinnalla oleviin reseptoreihin. NA-proteiini on entsyymi, jonka avulla soluissa valmistuneet virukset lopullisesti irtoavat solun pinnalta (kuva 2). HA- ja NA-proteiineja kohtaan muodostuvat vasta-aineet ovat elimistön tärkein puolustusmekanismi samaa virusta vastaan. Influenssa C -viruksella on vain yksi pintaproteiini (HEF), joka huolehtii samoista tehtävistä kuin HA- ja NA-proteiinit. Kaikki kolme virustyyppiä aiheuttavat hengitystieinfektioita. Influenssa A ja B -virukset ovat kuitenkin ihmisen kannalta harmillisempia kuin C-virus. Sen HEF-proteiinin rakenne ei juuri muuntele, joten kertainfektio antaa yleensä vastustuskyvyn sitä vastaan. Influenssa A ja B -virusten HA- ja NA-proteiinit sen sijaan muuntelevat jatkuvasti, joten aikaisemmat vasta-aineet eivät tunnista niitä. Tästä syystä WHO:n influenssaviruslaboratoriot ympäri maailmaa eristävät uusia influenssaviruksia (A ja B). Näiden tutkimusten perusteella WHO antaa suosituksia vuosittain annettavien rokotteiden koostumukseksi.

Influenssaviruksista A on ihmiselle vaarallisin monesta syystä. Sillä on todettu 16 erilaista HA- ja yhdeksän erilaista NA-alatyyppiä, jotka



KUVA 1. Influenssa A -virus. Pinnalla ovat hemagglutiiniini-proteiinien (HA) trimeerit (noin 500/virus), jotka infektoivassa viruksessa ovat HA1-HA2-komplekseina, ja neuraminidaasi-proteiinien (NA) tetrameerit (noin 100/virus). Pienen M2-proteiinin muodostama ionikanava läpäisee viruksen lipidivaipan. Vaipan sisäpintaa peittää matriksi-proteiini (M1), joka rajaa viruksen ydinosaan membraanista. Ytimessä sijaitsee kahdeksan erilaista RNA-jaoketta (1–8), jotka muodostavat viruksen genomien. Yksisäikeiset (v)RNA-molekyylit muodostavat nukleoproteiinin (NP) avulla spiraalirakenteen. Viruspartikkelin ja jaokkeiden mukana kulkeva polymeerasi (koostuu PB1-, PB2- ja PA-proteiineista) tekee mahdolliseksi vRNA:den kopioinnin lähetti-RNA:ksi viruksen tunkeuduttua soluun.

voivat muodostaa 144 (16 x 9) pintaproteiinien suhteen erilaista influenssa A -virusta. Alatyypin geeniyhdistelmiä merkitään lyhenteillä H1N1, H5N1, H9N2, H7N7 jne. Linnuista on eristetty kaikki hemagglutiiniinin muodostumista ohjaavat alatyypit (H1–H16), hevosista H3 ja H7, sioista H1, H3 ja H9 ja ihmisistä H1–H3, H5, H7 ja H9. Uudet HA/NA-yhdistelmät syntyvät, kun isäntäsolu infektoituu samalla kertaa kahdella eri influenssa A -viruksella, jolloin geenit sekoittuvat.

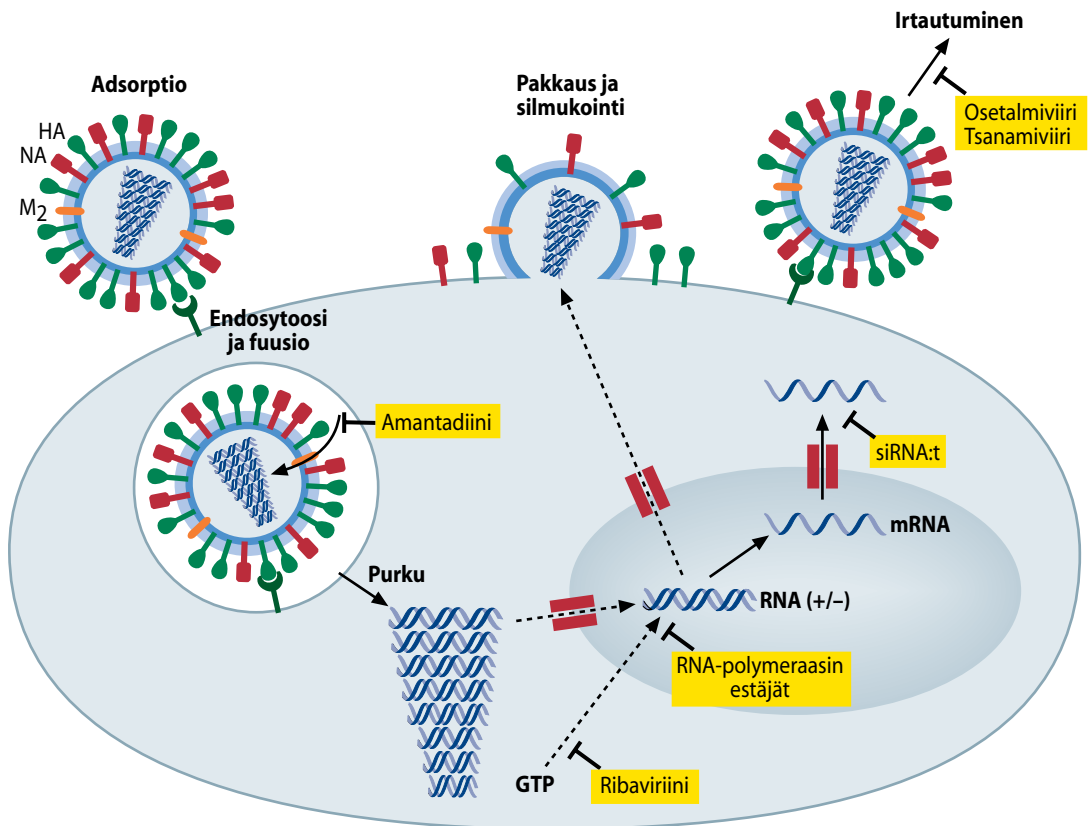
Influenssapandemiat 1900-luvulla

Vuonna 1918 linnuista siirtyi suoraan ihmiseen espanjantaudin aiheuttanut H1N1-virus. Tämä pandemia tappoi arviolta 40–50 miljoonaa ih-

mistä eri puolilla maailmaa. Espanjantaudin jälkeen H1N1-virus muunteli aiheuttaen pieniä epidemioita. »Aasialainen» influenssa (H2N2) syntyi, kun linnuista peräisin olevat H2- ja N2-geenit sekä PB1-geeni yhdistyivät viiteen muuhun geeniin (kuva 1), jotka olivat peräisin maailmalla vuosina 1918–57 kiertäneestä influenssa A -viruksesta. Pandemian jälkeen H2N2-virus muunteli aiheuttaen toistuvia epidemioita. Vuonna 1968 syntyi uusi pandemia »hongkongilainen» (H3N2), kun linnuista peräisin olevat H3-geeni ja aikaisemmin tuntematon PB1-geeni yhdistyivät aasialaisen kuuteen »vanhaan» geeniin. Kymmenen vuotta myöhemmin ilmestyi jälleen H1N1-yhdistelmä, joka aiheutti »venäläisenä» tai »moskovalaisena» influenssana tunnetun vähemmän vakavan »pandemian» vuonna 1977. Tämä virus oli lähes identtinen 1950-luvulla esiintyneen H1N1-kannan kanssa, joten vanhemmassa väestössä oli vasta-aineita sitä vastaan. Todennäköisesti virus oli karannut laboratorion, jossa sitä oli säilytetty pakasteena.

Espanjantaudin aiheuttaneen H1N1-viruksen rekonstruktio

Lokakuussa 2005 julkaistiin Science-lehdessä rohkea tutkimus, jossa espanjantaudin aiheuttanut influenssa A -virus rekonstruointiin laboratorio-olosuhteissa (Tumpey ym. 2005). Viruksen geenit saatiin eristettyä mm. pakastetuista potilasnäytteistä. Tähän vaaralliseen, turvalaboratoriossa suoritettavaan kokeeseen Yhdysvaltojen terveysviranomaiset antoivat luvan pitkän keskustelun jälkeen. Geenit voitiin yhdistää tekniikalla, jossa viruksen kaikki kahdeksan geeniä saatetaan soluihin erikseen DNA:n muodossa (kuva 3). Viruksen eri geenien osuutta sen patogeenisuuteen hiirille ja kananpojille tutkittiin konstruoimalla erilaisia geeniyhdistelmiä normaalin viruksen ja vuoden 1918 H1N1-viruksen geneistä. Tutkimuksen perusteella patogeenisuuden aiheuttivat H1-geeni ja viruksen perimän monistumisesta huolehtivat geenit. PB2-proteiiniin oli tullut muutos, joka tehosti sen toimintaa erityisesti ihmisen soluissa. Kaikkiaan kolmessa geenissä todettiin yhteensä kymmenen mutaatiota (Kobasa ym. 2004).



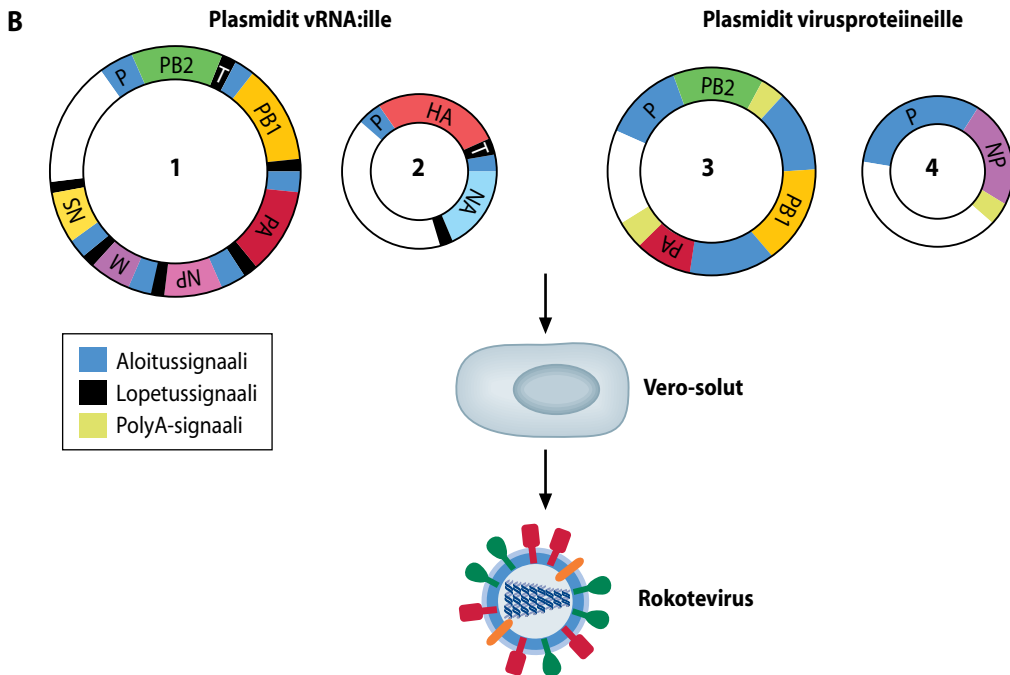
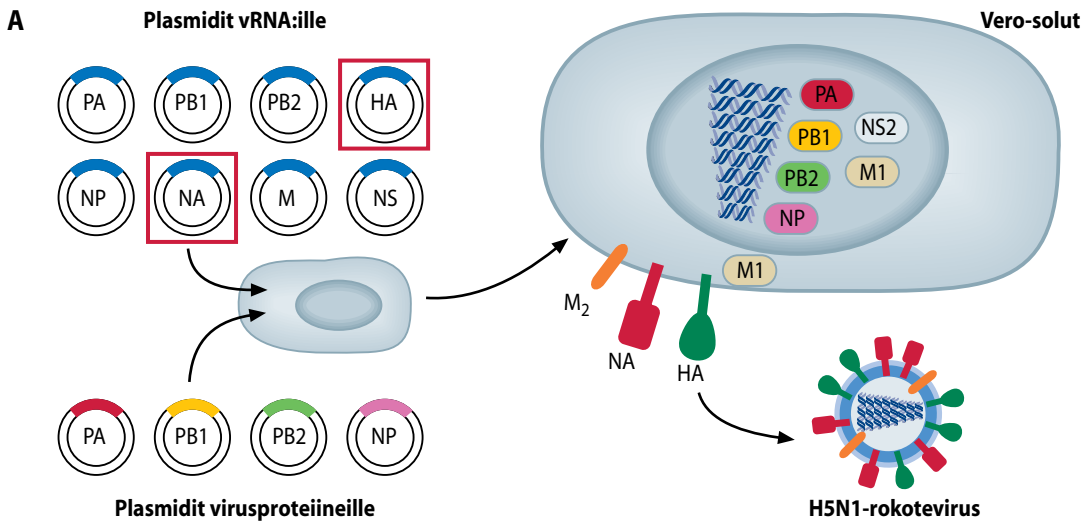
KUVA 2. Influenssaviruksen kasvuykli ja lääkekehityksen kohteet. Virus tarttuu HA-proteiinin avulla isäntäsolun siaalihappoja sisältäviin glykaaneihin. Tarttunut virus siirtyy solun sisälle endosytoosin avulla. Endosomien sisällä tapahtuu HA2-proteiinin hydrofobisen N-terminaalisen osan iskeytyminen endosomin kalvoon. Seurauksena on viruksen vaipan fuusio endosomin kalvoon ja viruksen ytimen vapautuminen solulimaan. Edellytyksenä fuusion onnistumiselle on protonien tunkeutuminen M2-ionikanavan kautta viruksen sisälle. Amantadiini estää tämän. vRNA:t kulkeutuvat solun tumaan, jossa viruksen polymeraasi kopioi niistä vastaavat lähetti-RNA:t ja uudet vRNA-jaokkeet. RNA-polymeraasin toimintaa on pyritty estämään nukleosidianalogien sekä esimerkiksi ribaviriinin avulla. Viruksen kypsyminen tapahtuu solun plasmakalvolla. Jokainen vRNA-jaoke sisältää sekvenssit, jotka ohjaavat sen muodostuvaan virukseen. NA-proteiini solun ja viruksen pinnalla leikkaa solun glykaanien siaalihapot irti, jolloin virus pääsee vapautumaan ympäröivään nesteeseen. Osetalmiviiri ja tsanamiviiri estävät tämän tapahtuman. (De Clerk 2006 mukaan).
 Lyhenteitä: GTP = guanosiinitrifosfaatti, siRNA = small interfering RNA

Uusia influenssaviruksia siirtyy linnuista ihmisiin

Vuonna 1997 eristettiin Hongkongissa H5N1-virus, joka surmasi useita ihmisiä. Epidemian uhka onnistuttiin kuitenkin torjumaan teurastamalla alueen koko siipikarja. Tautia aiheuttaneen viruksen H5-geeni oli eristetty vuotta aikaisemmin kuolleesta kiinalaisesta hanhasta. Uusi H5N1-virus ilmaantui jälleen Hongkongissa vuonna 2002 ja aiheutti laajoja epidemioita siipikarjassa vuosina 2003–2004. Virus infektoi myös

ihmisiä, ja 97 sairastuneesta 42 kuoli. Vuonna 1999 H9N2-lintuinfluenssaviruksen todettiin aiheuttaneen taudin kahdelle ihmiselle. Osa vuoden 1997 viruksen muista kuin H5N1-geeneistä oli samoja kuin H9N2-viruksella.

Englannissa eristettiin vuonna 1996 H7N7-virus, joka aiheutti silmätulehduksen. Virus oli vuotta aikaisemmin eristetty kalkkunasta Irlannissa. Lähes identtinen H7N7-virus havaittiin vuonna 2003 Hollannissa, missä puhkesi laajoja epidemioita kanaloissa. Se aiheutti joillekin työntekijöille lievän silmätulehduksen.



KUVA 3. Rekombinanttivirusten valmistaminen geeniteknikan avulla. Koska influenssaviruksen genomi koostuu kahdeksasta vRNA-molekyylistä, jotka eivät sellaisenaan pysty ohjaamaan koodaamiensa proteiinin synteesiä, solussa tarvitaan lähetti-RNA-molekyylejä, jotka koodaavat RNA-polymeraasin komponentit PB1, PB2 ja PA sekä NP-proteiinin. Lisäksi tarvitaan kaikki kahdeksan vRNA:ta. A) Aluksi jokainen komponentti saatettiin soluihin omassa plasmidissa, joka solussa kopioituu vastaavaksi RNA-molekyyliksi. B) Menetelmää kehitettiin edelleen ja sama informaatio voitiin siirtää neljässä plasmidissa soluihin, jolloin kuusi vRNA:ta tuotetaan plasmidista 1, HA:n ja NA:n vRNA:ta varten on oma plasmidi 2, polymeraasille plasmidi 3 ja NP-proteiinia varten plasmidi 4. Tällä tavoin on mahdollista vaihtaa helpommin pintaproteiineja esimerkiksi rokotteiden tuottamiseksi eri HA-variantteja vastaan. Hämmästyttävää kyllä, monimutkainen systeemi toimii, ja seurauksena on kaikkien viruksen tarvitsemien komponenttien synteesi aivan kuten influenssaviruksen infektoimassa solussa. Tuotetuissa viruksissa geenit ovat oikeassa järjestyksessä ja oikein pakattuina. Tällaista virusta voidaan käyttää tavalliseen tapaan uusien virusten tuottamiseen soluviljelmissä tai haudotuissa kananmunissa (Neumann ym. 2005, Horimoto ym. 2006, kuva Horimoton ja Kawaokan 2006 mukaan).

Vuonna 2004 löydettiin H7N3-virus siipikarjasta Brittiläisessä Kolumbiassa, Kanadassa. Se tarttui myös ihmisiin aiheuttaen muutamalle silmätulehduksen.

Nämä havainnot osoittavat, että virukset, joissa on alatyypit H5, H7 ja H9, pystyvät tarttumaan ja infektoimaan myös ihmisiä (Horimoto ja Kawaoka 2005, Olsen ym. 2006).

HA-proteiinin merkitys viruksen patogeenisuudelle

Lintujen influenssavirusten HA-proteiini tarttuu isäntäsolun pinnalla oleviin glykaaneihin, joissa terminaalinen siaalihappo (SA) on liittynyt galaktoosiin α 2,3-sidoksella (kuva 4A). Nämä viruksen reseptoreina toimivat glykaanit sijaitsevat linnun henkitorven ja suoliston limakalvon epiteelisolujen pinnalla. HA-proteiinissa olevaan »taskuun» asettuu 5–6 monosakkaridin pituinen jakso glykaanin alkupäästä (kuva 4B). Reseptorin tunnistamisessa siaalihappo ja sidos sitä seuraavaan galaktoosiin ovat tarttumisen kannalta olennaiset rakenteet (Ha ym. 2001 ja 2003, Gamblin ym. 2004, Russell ym. 2004). Ihmisen keuhkojen hengitysteiden ylemmissä glykaaneissa on SA α 2,6-sidos, jonka tunnistavat ihmiselle patogeenisien influenssa A -virusten HA-proteiinit. Tästä syystä lintujen influenssavirukset eivät normaalisti siirry ihmisiin.

Sian on arveltu olevan välittäjänä viruksen siirtyessä ihmiseen, koska sialla on molempia sokerimuotoja hengitysteissään. On pidetty todennäköisenä, että geenijaokkeiden (»vaununjen») vaihtoa tapahtuu erityisesti sian soluissa, jolloin seurauksena voi olla uuden pandemiaviruksen syntyminen. Sika ei ehkä kuitenkaan ole ollut väli-isäntänä vuosien 1918, 1957 ja 1963 pandemioiden syntyessä, koska näiden virusten varhaisimmat HA-proteiinimuodot tunnistivat SA α 2,6-sidoksen, vaikka virukset muiden geenien sekvenssien perusteella siirtyivätkin suoraan linnuista ihmiseen.

Viime vuosina esiintyneet H5N1-virukset ovat aiheuttaneet influenssan yli 250 ihmiselle, joista yli puolet on kuollut. Influenssan pelätty siirtyminen ihmisestä toiseen on kuitenkin ollut erittäin harvinaista (Maines ym. 2006). Äsket-

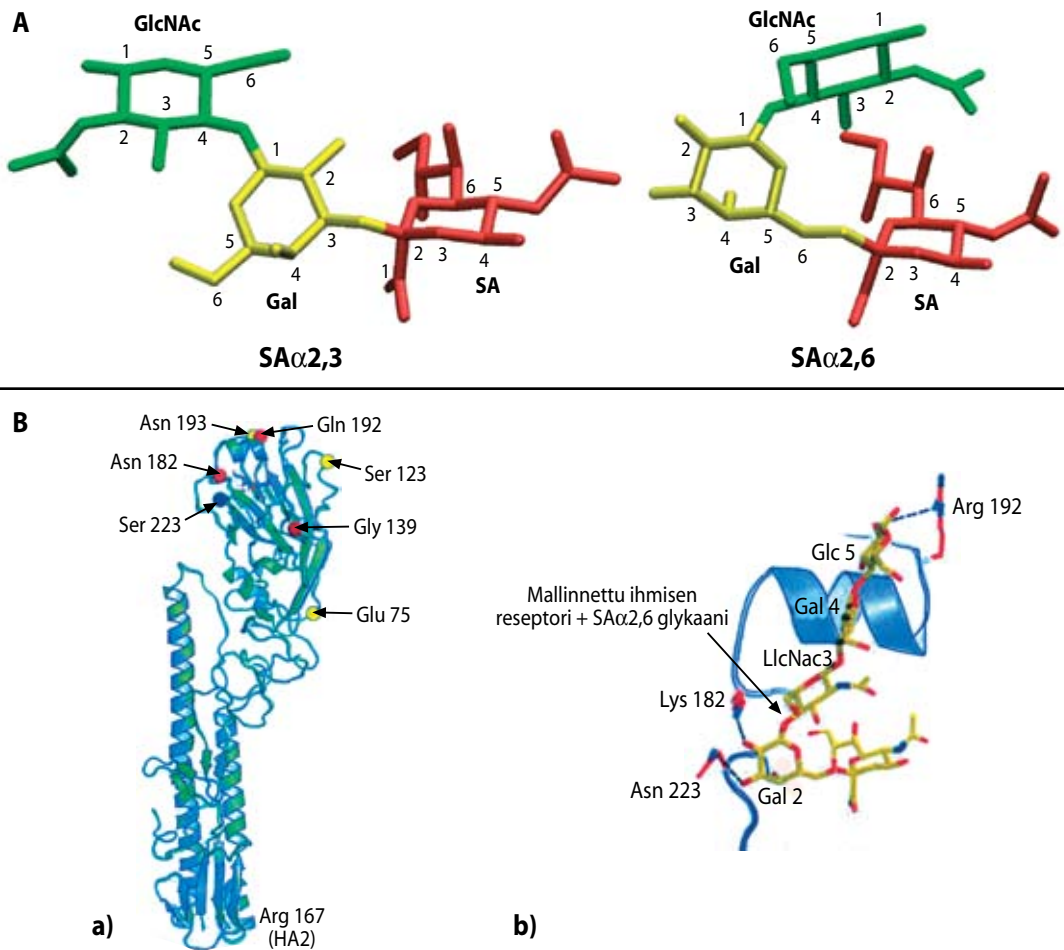
täin on osoitettu, että ihmisen keuhkojen alaosan epiteelisoluissa on SA α 2,3-reseptoreita, joihin H5N1-virus voi tarttua. Tämä havainto voisi selittää lintuinfluenssan siirtymisen suoraan linnuista ihmiseen. Ilmeisesti infektiio edellyttää läheistä yhteyttä lintujen kanssa ja suuria virusmääriä.

Perusteelliset tutkimukset ovat osoittaneet, että yhden ainoan aminohapon vaihtuminen HA1-molekyylissä (Asn182>Lys, Gln192>Arg, Ser223>Asn) voi muuttaa affiniteetin SA α 2,3-sidoksesta SA α 2,6-sidokseen. Kaksi ensimmäistä muutosta on havaittu kolmesta H5N1-viruksen infektoimasta potilaasta. Niitä ei todettu 600:ssa linnuista eristetystä H5N1-viruksessa (Yamada ym. 2006).

Toinen tärkeä HA-proteiinin patogeenisuutta säätelevä tekijä on molekyylinsisäisen katkaisukohdan aminohappojen järjestys. Jotta virusinfektio onnistuisi, viruksen ytimen täytyy läpäistä solun sisällä oleva endosomin kalvo. Tämä edellyttää HA-proteiinin katkeamista kahteen osaan (HA1 ja HA2). Katkaisun yhteydessä vapautuu HA2-proteiinin alkupää, jonka avulla viruksen geenit pääsevät solun sisälle (kuva 2). Katkaisukohta sisältää yleensä arginiinin, jonka vierestä trypsiinin kaltainen entsyymi suorittaa katkaisun. Kaikilla lieviä tai oireettomia infektiota aiheuttavilla lintujen influenssaviruksilla on katkaisukohdassa vain yksi arginiini. Vakavia infektiota aiheuttavilla lintujen viruksilla on katkaisukohdassa useita emäksisiä aminohappoja (Arg/Lys), jotka sallivat katkaisun furiinin kaltaisilla proteaaseilla. Nämä virukset aiheuttavat systeemisen infektion ja tappavat uhrinsa usein jopa vuorokaudessa. Monissa tapauksissa »vaaraton» virus on muuttunut tappavaksi, kun katkaisukohtaan on tullut Arg/Lys-aminohappoja mutaatioiden seurauksena (Horimoto ja Kawaoka 2005).

Muita patogeenisuuteen vaikuttavia tekijöitä

Viruksen genomien monistumisesta huolehtivat proteiinit PB1, PB2 ja PA. Niistä PB2 on ihmiseen kohdistuvan patogeenisuuden kannalta tärkeä. Yhden aminohapon muutos asemassa (Glu627>Lys) tehostaa viruksen lisääntymistä



KUVA 4. Influenssavirus tarttuu spesifisiin sialyyliglykaaneihin. A) Molekyyylimallit H5N1-lintuinfluenssaviruksen ligandina toimivasta SA α 2,3-Gal-GlcNAc-glykaanista ja ihmisen soluissa esiintyvistä influenssa A -viruksen ligandista SA α 2,6-Gal-GlcNAc. Kumpikin glykaani on esitetty siinä konformaatiossa, jossa se on HA-proteiinin reseptoritaskussa. B) Kolmiulotteiseen rakenteeseen perustuva malli a) H5N1-viruksen HA-monomeerista, jossa reseptorin sitomisen spesifisyyteen vaikuttavat aminohappotähteet (Asn 182, Gln192 ja Gly139) on merkitty punaisilla symboleilla. b) Alkuperäinen H5-reseptoritasku on mallinnettu mutaatioilla Asn182>Lys ja Gln192>Arg, jolloin ihmisen reseptorin SA α 2,6-Gal-GlcNAc:n tunnistaminen tulee mahdolliseksi. Mukailtu Yamadan ym. (2006) artikkelista. (Kiitämme dosentti Hannu Maaheimoa glykaanien molekyyylimallien laatimisesta.)

ainakin ihmisen ja hiiren soluissa Tämä mutaatio on havaittu vuoden 1918 H1N1-kannassa ja H5N1-viruksessa vuodelta 1997. Sama mutaatio todettiin H7N7-viruksessa, joka eristettiin Hollannissa vuonna 2003. Kyseinen potilas oli menehtynyt siipikarjassa riehuneen epidemian aikana influenssaan. Samaan aikaan kanoista eristetyissä H7N7-kannoissa ei havaittu mutaatiota (Taubenberger ym. 2005).

Pienellä NS1-proteiinilla, joka esiintyy vain infektoituneissa soluissa, on useita tehtäviä. Se

ehkäisee solujen puolustuksessa tarpeellisten interferonin ohjaamien geenien toimintaa. Patogeenisestä hanhen H5N1-influenssaviruksesta on eristetty NS1-geeni, jossa mutaatio Val149>Ala estää interferonin ja siitä riippuvien geenien toimintaa kanan soluissa päinvastoin kuin apatogeenisen H5N1-viruksen NS1, jossa on Val149 (Li Z ym. 2006). Todennäköisesti NS1-vaikutus perustuu proteiinikinaasi R:n estoon (Li S ym. 2006). Vuoden 1918 H1N1-viruksen NS1 oli tässä suhteessa normaalia tehokkaampi. Vuoden

1997 ja 2003 H5N1-viruksissa NS1-geeni stimuloi tulehdusreaktioita säätelevien sytokiiniin ylituotannon, jonka seurauksena tulehdusreaktiosta tulee haitallisen vaikea, joskus kohtalokkain seurauksin (Horimoto ja Kawaoka 2005). Tammikuussa 2007 julkaistiin tutkimus, jossa rekonstruoidulla vuoden 1918 H1N1-viruksella infektoitiin makaki-apinoita (Kobasa ym. 2007). Rekonstruoitu vuoden 1918 virus aiheutti vakavia patologisia muutoksia keuhkoissa muttei muissa elimissä, jotka olivat samanlaisia kuin hiirillä (Tumpey ym. 2005) ja vuonna 1918 kuolleilla potilailla. Apinoiden sytokiiniivaste infektiioon oli huomattavasti heikentynyt. Tutkijoiden mielestä NS1-geenin kyky estää interferonin ja muiden sytokiiniin välittämää synnynäistä («innate immune») immuunivastetta on ollut tärkeä patogeneenisuustekijä vuoden 1918 influenssavirusinfektiossa. Rekonstruoidun vuoden 1918 viruksen kyky aiheuttaa infektiio hiirissä ja apinoissa johtui HA-proteiinin kyvystä tunnistaa sekä SA α 2,3- että SA α 2,6-sidos, vaikka se oli peräisin linnuista (Kobasa ym. 2004).

Lääkkeitä influenssaa vastaan

Suuri määrä kemiallisia yhdisteitä testattiin 1960-luvulla etsittäessä viruseräitä. Tällöin löydettiin amantadiini, joka estää influenssaviruksen lisääntymistä. Myöhemmin osoitettiin sen estävän viruspartikkelin purkamista isäntäsolussa. Amantadiinin kohteena on viruksen M2-proteiinin ionikanava (kuvat 1 ja 2). Aikaisemmin amantadiini ja siitä johdettu rimantadiini olivat ainoat lääkkeet, joilla saatiin tuloksia influenssan ehkäisyssä. Erityisesti rimantadiinin käyttöä ehkäisyyn on ehdotettu hätätilanteessa vakavan pandemian aikana (Hayden 2006).

Kun influenssaviruksen HA-proteiinin rakenne määritettiin 25 vuotta sitten, alkoi rationaalinen suunnittelu tarkoituksena kehittää lääkkeitä, jotka estäisivät viruksen tarttumisen isäntäsolun pinnalla olevaan glykaaniin. Mitkään kehitystyistä yhdisteistä eivät toimineet. Tutkimus ei kuitenkaan mennyt hukkaan, sillä monet yhdisteet estivät NA-proteiinin entsyymaattisen aktiivisuuden. Normaalisti NA irrottaa siaalihapon solun pinnalla olevista glykaaneista. Jos tämä aktii-

visuus estetään, virus ei pääse irtoamaan solun pinnasta (kuva 2).

Oseltamiviiri ja tsanamiviiri ehkäisevät kumpikin NA-proteiinin toiminnan. Oseltamiviiriä käytetään tabletteina ja se on siten helpompi käyttää kuin hengitysteihin suihkutettava tsanamiviiri. Influenssan tarttuessa ihmisestä toiseen siirtyy valtava määrä viruksia aerosolina suoraan keuhkoihin. Tästä syystä itämisaika on lyhyt ja lääkkeen ottamisen ajoitus on keskeinen taudin ehkäisyssä ja hoidossa. Taudin kulkua pystytään lyhentämään ja sen vaikeusastetta helpottamaan parhaiten, jos lääke nautitaan aivan taudin alussa tai ennen tartunnan saamista. On todennäköistä, että neuraminidaasin estäjille resistenttejä mutanteja syntyy. Sellaisesta on jo raportoitu (Le ym. 2005). Siksi on ehdotettu yhdistelmähoitoa amantadiinilla ja oseltamaviirilla. Soluviljelmässä suoritettavat kokeet rohkaisevat tutkimaan asiaa myös ihmisillä (Ilyushina ym. 2006).

Äskettäin julkaistiin H5N1-viruksen N-geenin ohjaaman NA-proteiinin kolmiulotteinen rakenne. Se poikkeaa jonkin verran aikaisemmin määritetystä N2- ja N9-geenin ohjaamien NA-proteiinien lähes identtisistä rakenteista, jotka ovat olleet oseltamiviiriin ja tsanamiviiriin kehittämisen lähtökohtina. Tutkijoiden mielestä uusi rakenne tarjoaisi tilaisuuden uusien ja tehokkaampien estäjien kehittämiseksi (Russell ym. 2006).

Vuosikymmeniä jatkuneista tutkimuksista huolimatta ei ole onnistuttu kehittämään tehokkaita ja turvallisia influenssaviruksen RNA-polymeraasin (PB1) estäjiä päinvastoin kuin HIV:n polymeraasille. PB2-endonukleaasi on influenssavirukselle spesifinen entsyymi, jolle on kehitelty estäjiä. Kehitetyt yhdisteet eivät kuitenkaan vielä sovellu influenssan hoitoon. Ribaviriini, joka syntetisoitiin jo vuonna 1970, estää influenssaviruksen lisääntymistä. Se on hyväksytty hepatiitti C- ja RS-virusinfektioiden hoitoon (Magden ym. 2005, De Clercq 2006). Yhdistelmähoitoa oraalisella ribaviriinilla ja oseltamaviirilla on tutkittu influenssa A- (H1N1) ja influenssa B -viruksella infektoituilla hiirillä. Kummallakin yhdisteellä yksin käytettynä todettiin selvä suojavaikutus. Oseltamiviiri ei parantanut ribaviriinin tehoa yhdistelmähoitossa (Smee ym. 2006).

Rokotteita influenssapandemian varalle

Varhaiset influenssarokotteet tuotettiin hedelmöityneissä kananmunissa. Virukset puhdistettiin ja tapettiin esimerkiksi formaldehydillä. Eristetty uusi influenssaviruskanta sopeutettiin lisääntymään munissa. Tämä vaihe saattoi kestää useita viikkoja. Saannon täytyy olla riittävän suuri (noin 10^9 virusta millilitrassa), jotta rokotetta voidaan valmistaa riittävästi. Rokotetta H5N1-virusta vastaan ei voida valmistaa samalla tavalla, koska virus tappaa kananalkiot ja koska ihmiselle vaarallisen viruksen tuottaminen massamäärin on henkilökunnan turvallisuuden takia mahdotonta.

Uusien tekniikoiden ansiosta on nyt mahdollista yhdistää rokotukseen parhaiten soveltuvat H- ja N-geenit kuuden muun geenin kanssa ja luoda turvallinen virus rokotteen tuottamista varten (kuva 3). Tällaisia rokotetta on tekeillä eri puolilla maailmaa. Niissä käytetään H- ja N-geenien kanssa turvallisista kannoista (esim. H1N1/PR8 1933) peräisin olevia muita geenejä, joiden ansiosta rokotevirus lisääntyy hyvin kanan alkioissa. Tällaisia »koerokotteita» valmistetaan parhaillaan rokotetehtaissa ympäri maailmaa. Haudottujen kananmunien lisäksi käytetään myös soluviljelmiä. Koerokotteiden avulla saadaan toivottavasti ainakin osittainen suoja mahdollista pandemiavirusta vastaan.

YDINASIAT

- **Influenssa A -virukset muodostavat jatkuvan uhan ihmiskunnalle, koska viruksen genomien rakenne mahdollistaa uusien geeniyhdistelmien muodostumisen viljeissä lintupopulaatioissa, joissa nämä virukset esiintyvät endeemisinä.**
- **Koska lintuviruksen reseptori on SA α 2,3-Gal-tyyppiä, viruksen siirtyminen ihmiseen edellyttää muutosta HA-proteiinissa.**
- **Influenssavirusten koko genomi voidaan nykyisin määrittää nopeasti ja käänteisen genetiikan avulla pystytään tuottamaan uusia influenssaviruksia rokotetta varten.**

Äskettäin on julkaistu muutamia vapaaehtoisilla suoritetuista rokotuskokeista, joissa on käytetty edellä kuvatulla tavalla valmistettua, inaktivoitua H5N1-virusta (Stephenson 2006). Suurimmalla annoksella (10 μ g kahdesti) saatiin aikaan neutraloivia vasta-aineita noin 75 %:lla rokotetuista (Lin ym. 2006).

Jos HA1- ja HA2-proteiinien välissä oleva trypsiinin katkaisukohta korvataan elastaasin katkaisukohtalla, saadaan syntymään inaktiivinen virus, joka ei pysty tunkeutumaan isäntäsoluihin. Kun alkuperäinen virus tuotetaan plasmidien avulla, se voidaan aktivoida käsittelemällä sitä elastaasilla, jolloin HA1:n ja HA2:n välinen silta katkeaa. Tällä tavoin käsitelty virus pääsee soluihin, mutta seuraava sukupolvi ei enää pysty infektoimaan uusia soluja (Stech ym. 2005). Näin valmistettua elävää, heikennettyä rokotetta on tutkittu koe-eläimissä, ja tulokset ovat olleet lupaavia (Suguitan ym. 2006). Pelko samanaikaisesta infektiosta villillä influenssaviruksella arveluttaa kuitenkin tällaisen elävän viruksen käyttämisessä massarokotuksiin.

Vaihtoehtoisia influenssarokotteita

Influenssa A -viruksen NP-, M2- ja NS1-proteiinien käyttämisestä rokotteina on tutkittu vuosien ajan. Vasta-aineet niitä vastaan eivät estä viruksen tarttumista soluihin (kuva 1). Sen sijaan ne voivat saada aikaan soluvälitteisen immunitetin, joka johtaa infektoituneiden solujen eliminoimiseen. Koska partikkelin sisällä olevat proteiinit muuntelevat huomattavasti vähemmän kuin HA ja NA, ne voidaan lisätä tavanomaisiin influenssarokotteisiin hyvissä ajoin ennen pandemian ilmaantumista (Epstein ym. 2005, Doherty ym. 2006).

Immunitettia HA- ja NA-proteiineja vastaan voidaan saada aikaan myös käyttämällä esimerkiksi adenovirusvektoreita, joiden genomiin on siirretty halutut H- ja N-geenit. Genomi pakataan adenoviruksen kapsi-

diproteiineihin ja ruiskutetaan potilaaseen. Virus tuottaa haluttuja proteiineja soluissa, joihin se onnistuu pääsemään, mutta se ei voi siirtyä uusiin soluihin. Halutut geenit on mahdollista saattaa elimistöön myös pelkän DNA:n muodossa (Gao ym. 2006, Kaiser 2006).

On kuitenkin vaikeaa korvata rokotteita, jotka perustuvat puhdistettujen, inaktivoitujen influenssavirusten käyttöön. Niiden käytöstä massarokotuksiin on vuosikymmenien kokemus. Vaikka niillä saatu suoja ei ole suinkaan optimaalinen, niiden käyttö on toistaiseksi ainoa

tapa ehkäistä infektiota. Kilpajuoksu rokotteiden valmistamiseksi riittävän nopeasti pandemian uhatessa edellyttää kitkatonta kansainvälistä yhteistyötä tutkijoiden ja rokotteiden valmistajien kesken. Vaikka tutkijat ovat luoneet uusia edellytyksiä taistelussa influenssaa vastaan, tässä vaiheessa paras keino välttää H5N1-viruksen aiheuttama pandemia on pyrkiä estämään sen leviäminen siipikarjassa. Valitettavasti ihmisten ja siipikarjan läheinen yhteiselämä erityisesti tiheään asutuissa Aasian maissa tulee tuottamaan jatkuvasti uusia uhkia.

Kirjallisuutta

- De Clercq E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:1015–25.
- Doherty PC, Turner SJ, Webby RG, Thomas PG. Influenza and the challenge for immunology. *Nat Immunol* 2006;7:449–55.
- Epstein SL, Kong W, Mispion JA, ym. Protection against multiple influenza subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine* 2005;23:5404–10.
- Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, ym. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science* 2004;303:1838–42.
- Gao W, Soloff AC, Lu X, ym. Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization. *J Virol* 2006;80:1959–64.
- Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. X-ray structures of avian H5 and H9 swine influenza hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11181–6.
- Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. X-ray structure of the hemagglutinins of the potential H3 avian progenitor of the 1968 Hong Kong pandemic influenza virus. *Virology* 2003;309:209–18.
- Hayden FG. Antivirals for influenza: historical perspectives and lessons learned. *Antiviral Res* 2006;71:372–8.
- Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:591–600.
- Horimoto T, Kawaoka Y. Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses. *Trends Mol Med* 2006;12:506–14.
- Horimoto T, Takada A, Fujii K, ym. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine* 2006;24:3669–76.
- Ilyushina NA, Bovin NV, Webster RG, Govorkova EA. Combination chemotherapy, a potential strategy for reducing the emergence of drug-resistant influenza A variants. *Antiviral Res* 2006;70:121–31.
- Kaiser J. A one-size-fits-all flu vaccine? *Science* 2006;312:380–2.
- Kobasa D, Jones SM, Shinya K, ym. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* 2007;445:319–23.
- Kobasa D, Takada A, Shinya K, ym. Enhanced virulence of influenza A viruses with the hemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* 2004;431:703–7.
- Le QM, Kiso M, Someya K, ym. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 2005;437:1108. *Erratum* 2005;438:754.
- Li S, Min J, Krug RM, Sen GC. Binding of the influenza virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* 2006;349:13–21.
- Li Z, Jiang Y, Jiao P, ym. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J Virol* 2006;80:11115–23.
- Lin J, Zhang J, Dong X, ym. Safety and immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1) vaccine: a phase I randomised controlled trial. *Lancet* 2006;368:991–7.
- Linnanmäki E. Historian influenssapandemiat. *Duodecim* 2006;122:2023–31.
- Magden J, Kääriäinen L, Ahola T. Inhibitors of virus replication: recent developments and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;66:612–21.
- Maines TR, Chen L, Matsuoka Y, ym. Lack of transmission of H5N1 avian-human reassortant influenza viruses in a ferret model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:12121–6.
- Matrosovich M, Matrosovich T, Uhlendorff J, Garten W, Klenk H-D. Avian-virus-like receptor specificity of the hemagglutinin impedes influenza virus replication in cultures of human airway epithelium. *Virology* 2007 (painossa).
- Neumann G, Fujii K, Kino Y, Kawaoka Y. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16825–9.
- Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AE, Fouchier RA. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* 2006;312:384–8.
- Pyhälä R. Influenssapandemia uhkaa yhä – missä rokote? *Duodecim* 2002;118:573–7.
- Russell RJ, Gamblin SJ, Haire LF, ym. H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes. *Virology* 2004;325:287–96.
- Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, ym. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* 2006;443:45–9.
- Smee DF, Wong MH, Bailey KW, Sidwell RW. Activities of oseltamivir and ribavirin used alone and in combination against infections in mice with recent isolates of influenza A (H1N1) and B viruses. *Antivir Chem Chemother* 2006;17:185–92.
- Stech J, Garn H, Wegemann M, Wagner R, Klenk H-D. A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin. *Nat Med* 2005;11:683–9.
- Stephenson I. H5N1 vaccines: how prepared are we for a pandemic? *Lancet* 2006;368:965–6.
- Suguitan AL, McAuliffe J, Mills KL, ym. Live, attenuated influenza A H5N1 candidate vaccines provide broad cross-protection in mice and ferrets. *PLoS Med* 2006;3:e360.
- Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 2005;437:889–93.
- Tompa T, Basler CF, Aguilar PV, ym. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005;310:77–80.
- Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, ym. Hemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 2006;444:378–82.

LEEVI KÄÄRIÄINEN, professori, emeritus
leevi.kaariainen@helsinki.fi
Helsingin yliopisto, biotekniikan instituutti
PL 56, 00014 Helsingin yliopisto

TERO AHOLA, dosentti, akatemiattutkija
Helsingin yliopisto, biotekniikan instituutti
PL 56, 00014 Helsingin yliopisto