



Kandidaatintutkielma

Emma Klemola

Malaria ja RTS,S/AS01-rokote sen ehkäisyssä

Oulun yliopisto
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta
2020

Sisällysluettelo

1.Käytetyt lyhenteet	3
2. Johdanto	5
3.Malaria	5
3.1 Malarian epidemiologia	6
3.2 Malarialoisen elinkierto	8
3.2.1 Merotsoiittien tunkeutuminen punasoluihin	10
3.3 Malariaa aiheuttavat parasiitit	12
3.3.1 <i>Plasmodium falciparum</i>	13
3.4 Immunitetti ja immuunireaktio malariaa vastaan	14
3.5 Malariarokotteet	15
3.5.1 Pre-erytrosyyttiset rokotteet	17
3.5.2 Kokonaiset sporotsoiittirokotteet	18
3.5.3 Verivaiheen rokotteet	18
3.5.4 Seksuaalisiin ja hyttysvaiheisiin kohdistuvat rokotteet	19
3.5.5 Vivax-rokotteet	20
4. RTS,S-rokote	22
4.1 RTS,S-rokotteen kehitys	24
4.1.1 RTS,S-rokotteen kehityksen vaikeudet	26
4.2 RTS,S-rokotteen rakenne	27
4.3 RTS,S-rokotteen toiminta	29
5. CSP	30
5.1 CSP:n rakenne	30
5.1.1 NANP-vasta-aineet	32
6. RTS,S/AS01	32
6.1 RTS,S/AS01-rokotteen rakenne	33
6.1.1 AS01-adjuvantti	34
6.2 RTS,S/AS01-rokotteen toimintamekanismi	35
6.3 RTS,S/AS01-rokotteen immunogeenisuus	36
6.4 RTS,S/AS01-rokotteen valmistus	37
7. RTS,S/AS01-rokotteen vaiheen III tutkimus	37
7.1 Tutkimuksen toteutus	38
7.2 Tutkimuksen tulokset	40
7.3 RTS,S/AS01-rokotteen turvallisuus	44
8. RTS,S/AS01-rokote ja tulevaisuus	44
8.1 Vaiheen IV tutkimus	46
9. Kirjallisuusviitteet	47

1. Käytetyt lyhenteet

AIDS = Acquired Immune Deficiency Syndrome

AMA1 = Apical Membrane Antigen 1

Asn = Asparagiini

CAP = Chemically attenuated parasite, kemiallisesti heikennetty parasiitti

CD4 = Cluster of differentiation 4

CHMI = Carboxymethyl-2-hydroxyumuconate isomerase

CHMP = Committee for Medicinal Products for Human Use, Euroopan lääkeviraston ihmisille tarkoitettuja lääkkeitä käsittelevä komitea

CSP = Cirkumsporotsoiittiproteiini

CS-proteiini = Cirkumsporotsoiittiproteiini

CVac = Chemoprophylaxis vaccination

Cys = Cysteine, kysteini

CyRPA = Cysteine-rich protective antigen

DTPwHepB/Hib + OPV = Diphtheria, Tetanus, pertussis, Hepatitis B, Haemophilus influenzae tybe b + Oral polio vaccine

EBA = Erythrocyte-binding antigen

EGF = Epidermal growth factor, epidermaalinen kasvutekijä

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay

EMA = European Medicines Agency, Euroopan lääkevirasto

GACVS = Global Advisory Committee on Vaccine Safety, WHO:n rokoteturvallisuuden maailmanlaajuinen neuvoa-antava komitea

GAP = Genetically attenuated parasite

GPI = Glykosyylifosfatidyyli-inositoli

GSK = GlaxoSmithKline

HBsAg = Hepatitis B-virus surface antigen, hepatiitti B-viruksen pinta-antigeeni

HIV = Human Immunodeficiency Virus

IgG = Immunoglobulin G, Immunoglobuliini G

INDEPTH = Innovation Deployment and Digital Repository

INF = Interferoni

mm = muun muassa

MPL = 3-O-desasyyli-4'-monofosforyylilipidi A

MSP-proteiini = Macrophage Stimulating Protein, makrofageja stimuloiva proteiini

MVI = Malaria Vaccine Initiative
NANP = Asparagiini-Alaniini-Asparagiini-proliini
NK = Natural killer, luonnollinen tappaja -solu
NKT-solut = Natural killer T-cell, luonnollinen tappaja T-solu
NPDP = Asparagiini- Prolini- Asparagiinihappo-Prolini
NVDP = Asparagiini-Valiini-Asparagiinihappo-Prolini
PfCSP = *P. falciparum* CSP-molekyyli
PfGARP = *Plasmodium falciparum* glutamic-acid-rich protein
PfRh-proteiini = *P. falciparum* reticulocyte binding homolog -proteiini
PfRh5 = *P. falciparum* reticulocyte binding homolog 5
PfRipr = PfRh5-interacting protein
Pfs25 = *Plasmodium falciparum* surface protein 25
Pfs230 = *Plasmodium falciparum* surface protein 230
Pfs48/45 = *Plasmodium falciparum* surface protein 48/45
PfSEA-1 = *Plasmodium falciparum* Schizont Egress Antigen 1
PfSPZ = *Plasmodium falciparum* sporozoites
PfSPZ-GA1 = *Plasmodium falciparum* sporozoites-genetically attenuated
PvDBP = *Plasmodium vivax* Duffy Binding proteiini
Pvs230 = *Plasmodium vivax* surface protein 230
P. falciparum = *Plasmodium falciparum*
P. malariae = *Plasmodium malariae*
P. ovale = *Plasmodium ovale*
P. vivax = *Plasmodium vivax*
RON-kompleksin = Rhoptry Neck Protein complex
RON2 = Rhoptry Neck Protein 2
TLR4 = Toll-like-receptor
WHO = World Health Organization, Maailman terveysjärjestö
WRAIR = Walter Reed Army Institute of Research
 $\mu\text{g/ml}$ = mikrogramma / millilitra
 αTSR = α -trombospondiinitoisto

2. Johdanto

RTS,S on maailman edistynein rokotekandidaatti malariaa vastaan. Rokotteen tarkoituksena on antaa suoja Saharan eteläpuolisen Afrikan malariaendeemisillä alueilla lapsille ja vastasyntyneille *Plasmodium falciparumin* aiheuttamaa kliinistä sairautta vastaan. RTS,S/AS01-rokotteesta on tehty Afrikassa äskettäin vaiheen III tehokkuustutkimus. Tutkimuksen tavoitteena on ollut kehittää rokote, jonka antaminen laajennetun immunisaatio-ohjelman kautta on turvallista ja tehokasta, ja joka voisi vähentää merkittävästi kliinisesti tärkeän malariataudin riskiä ensimmäisten elinvuosien aikana. Jos vakavaan malariaan ja muihin malariainfektioon liittyvien samanaikaisten sairauksien riskiä voidaan pienentää, RTS,S-rokote voi olla merkittävä uusi työkalu malariataakan vähentämisessä Saharan eteläpuoleisessa Afrikassa. Rokotteen II:n vaiheen tehokkuustutkimus on antanut kannustavaa tietoa, joka viittaa siihen, että nämä tavoitteet voivat todella olla saavutettavissa. (Ballou, 2009). RTS,S on ensimmäinen malariarokotekandidaatti, joka on saavuttanut tieteellisen virstanpylvään ja saanut myönteisen tieteellisen lausunnon Euroopan lääkevirastolta rokotteen käyttöön pienten lasten malarian ehkäisemiseksi Saharan eteläpuolisessa Afrikassa. Euroopan lääkeviraston ihmisille tarkoitettuja lääkkeitä käsittelevä komitea on yksimielisesti todennut, että RTS,S-rokotteen edut ovat suuremmat kuin riskit. RTS,S jatkaa edelleen potentiaalisena ensimmäisenä malariarokotteena loisen aiheuttamaa sairautta vastaan ihmisessä. (Biernaux ja Kaslow, 2015.)

3. Malaria

Malaria on *Plasmodium*-sukuun kuuluvien itiöeläinten (Sporozoa, Apicomplexa) tartuttama akuutti, systeeminen loistauti. Malariaa tartuttava alkueläin plasmodi eli horkkaloisio leviää *Anopheles*-sukuun kuuluvien hyttysten välityksellä ja infektoi ihmisen punasoluja. Vain naaraspuolinen hyttynen voi levittää tautia. Loinen pääsee kulkeutumaan ihmiseen hyttysten piston välityksellä. Pistoksen seurauksena ihmisen laskimoverenkiertoon siirtynyt loinen kulkeutuu ensin maksaan ja tämän jälkeen veren punasoluihin. Punasoluista poistuessaan loisten erittämät, ihmiselle myrkylliset aineenvaihduntatuotteet, vapautuvat verenkiertoon ja saavat aikaan malarialle tyypilliset oireet. (Campell *et al.* 2011.)

Malariaa aiheuttaa viisi *Plasmodium*-suvun lajia; *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* sekä *Plasmodium knowlesi*. Suurimman osan infektiosta aiheuttaa *Plasmodium falciparum*. *P. falciparum* on tropiikin yleisin malarialoinen,

ja se aiheuttaa alle 5-vuotiailla enemmän kuolemia kuin mikään muu yksittäinen taudinaiheuttaja. Loisella on kaksi ainutlaatuista ominaisuutta, jotka tekevät siitä vaarallisemman kuin muut malarialoisiot. Ensimmäiseksi, *P. falciparum* on ainoa loinen, joka voi tunkeutua kaiken ikäisiin punasoluihin. Tila, jossa yli 10 % punasoluista on infektoitunut, on jo hengenvaarallinen. Toiseksi, *P. falciparum* kykenee erittämään proteiineja, jotka saavat aikaan veren virtauksen vähenemistä sekä hapen kulkeutumisen heikkenemistä verenkierron mukana. Myös paikalliset tulehdusreaktiot lisääntyvät. (Campell *et al.* 2011.) Kaikki viisi malarialoisiota aiheuttavat samanlaisia oireita. Taudille tunnusomaista on 7–14 päivän itämisaika ja systeemiset oireet kuten kuume, vilunväristykset, hikoilu, huonovointisuus, päänsärky sekä monet muut oireet, joiden erottaminen muista virusten tai bakteerien aiheuttamista sairauksista voi olla hyvin vaikeaa. Vakavamman malarian saaneilla henkilöillä ilmenee myös tajunnan heikkenemistä, hengitysvaikeuksia, kouristuksia ja epänormaalia verenvuotoa. Vakavaan malariaan sairastuneilla henkilöillä kuolemanriski on 90 % kotona ja 20 % sairaalahoitossa. (Laurens, 2019.)

Kliinisellä malarialla viitataan tapauksiin, joissa malariaparasitiittitartunta aiheuttaa sairauden. Malaria-endeemisillä alueilla lasten veressä voi olla malariaparasitteja ilman minkäänlaisia sairauden oireita. Vakavalla malarialla tarkoitetaan puolestaan malariatartuntaa, jossa alkuperäinen infektio kehittyy akuutiksi, hengenvaaralliseksi sairaudeksi. (Laurens, 2019.)

3.1 Malarian epidemiologia

Vuonna 2018 malariatapauksia arvioitiin olevan maailman laajuisesti 228 miljoonaa. Tilastojen mukaan malariaan kuolee vuosittain satoja tuhansia ihmisiä. Uusin World Malaria Report on julkaistu joulukuussa 2019, ja sen mukaan malariatapausten määrä nousi vuoden 2018 aikana 228 miljoonaan tapaukseen. Vuonna 2017 malariatapausten määrä oli 231 miljoonaa. Malariasta johtuvia kuolemia arvioitiin vuonna 2017 tapahtuneen 416000 kappaletta. Vuonna 2018 kuolemien lukumäärä oli 405000 kappaletta. Alle 5-vuotiaat lapset ovat kaikista haavoittuvien ryhmä, johon malaria vaikuttaa. Vuonna 2018 malariasta johtuneista kuolemista 67 %, eli 272000, oli alle 5-vuotiaita lapsia. Aikuiset, jotka viettävät lapsuutensa malariaendeemisillä alueilla ja pysyvät samalla alueella myös aikuisena, eivät ole yleensä vaarassa kuolla malariaan. Afrikan malariaendeemisissä valtioissa elävät vastasyntyneet sekä nuoret lapset, sairastuvat usein muutamia kertoja malariaan ennen kuin heille kehittyy immuniteetti malariaa vastaan. Immuniteetti suojaa heitä sairautta vastaan, sekä malariasta aiheutuvalta kuolemalta. (WHO, 2020.)

Vuonna 2018 lähes puolet maapallon väestöstä oli vaarassa saada malariatartunnan. Saharan eteläpuolisessa Afrikassa tapahtuu kuitenkin suurin osa malariatapauksista sekä malarian aiheuttamista kuolemista. WHO:n Afrikan alueilla tapahtui vuonna 2018 93 % malarian tapauksista ja 94 % malarian aiheuttamista kuolemista. Myös Kaakkois-Aasia, Välimeren itäosat, Länsi-Tyynenmeren alue sekä osa Amerikasta on suuren riskin alueita. Joillakin maapallon väestöryhmistä on huomattavasti suurempi riski sairastua malariaan kuin toisilla. Näihin ryhmiin kuuluvat vastasyntyneet, alle 5-vuotiaat lapset, raskaana olevat naiset, HIV/aids-potilaat, liikkuvat väestöt sekä matkustajat. (WHO, 2020). Euroopassa malariatapauksia todetaan vuosittain noin 10000 kappaletta ja kuolleisuus *P. falciparum* -loisoin aiheuttamaan malariaan on 1–4 %. Suomessa malariatapauksia on vuosittain noin 30–60 kappaletta. (Kyrönseppä ja Siikamäki, 2001.)

Malaria aiheuttaa vuosittain suuria kustannuksia. Vuonna 2018 kokonaisrahoitus malarian torjuntaan ja poistamiseen oli arviolta 2,7 miljardia dollaria. Tästä summasta malariaaendemisten maiden rahaosuus oli 900 miljoonaa Yhdysvaltojen dollaria. Tämä oli 30 % kokonaisrahoituksesta. (WHO, 2020.)

Useimmat afrikkalaiset valtiot ovat toteuttaneet huomattavia torjuntatoimia malariaa vastaan. Näitä keinoja ovat muun muassa pitkäaikaisten, hyönteismyrkyllä käsiteltyjen, hyönteisverkkojen laaja-alainen käyttöönotto, sisällä suihkutettavat hyönteismyrkyt joissakin tiloissa sekä nopea diagnoosi laadukkailla testeillä ja tehokas hoito (WHO, 2020).

Afrikan alueilla malarialoisten leviäminen voi olla ympärivuotista tai voi vaihdella voimakkaasti kausittain. Kausittainen vaihtelu on suurilta osin riippuvaista sademääristä. Leviämisen tehokkuus riippuu vektorin puremisnopeudesta ja eloonjäämisestä, joten intensiteetti vaihtelee näiden kahden funktiona. Lämpötilalla ja kosteudella on suuri vaikutus molempiin tekijöihin. Koska ilmastotekijät vaihtelevat ja vektorille on saatavilla lisääntymispaikkoja välillä vain rajoitetusti, malariaparasitiittien leviäminen voi olla yhdenkin valtion sisällä hyvin heterogeenista. Esimerkiksi Kenian länsiosissa malariaparasitiittien leviäminen on hyvin runsasta, kun taas Kenian muilla alueilla loisten leviäminen on vähäistä tai sitä ei tapahdu ollenkaan. (WHO, 2020.)

3.2 Malarialoisen elinkierto

Malarialoinen käyttää vektorinaan eli kantajanaan *Anopheles*-suvun naarapuolisia hyttysiä. Kaikki hyttysset eivät toimi malarialoision vektoreina vaan laji on keskittynyt *Anopheles*-sukuun. Loinen ei pysty lisääntymään hyttysessä, vaan tarvitsee siihen ihmistä (Kainulainen ja Siikamäki 2016, Lumio 2012). Loisen luonnolliseen elinkiertoon kuuluu syklinen kierto ihmisen ja hyttysen välillä. Ihmisessä loiset ensin kasvavat ja lisääntyvät maksasoluissa, jonka jälkeen ne siirtyvät veren punasoluihin. Uudet loiset kasvavat punasolujen sisällä ja vapautuessaan tuhoavat punasolut. Vapautuneet parasiitit pystyvät infektoimaan uusia punasoluja tunkeutumalla niihin. (CDC, 2020.)

Malarialoinen pääsee siirtymään ihmiseen hyttysen piston aikana syljen välityksellä. Naarashyttysset imevät ihmisestä verta ravitakseen tuottamiaan munia. Syljen välityksellä leviäviä loisia kutsutaan sporotsoiiteiksi. Sporotsoiitit kulkeutuvat laskimoverenkierron välityksellä maksaan ja infektoivat maksassa olevia soluja, hepatosyyttejä. Sporotsoiitit kypsyvät ja lisääntyvät jakautumalla maksasoluissa schizontiiteiksi, jotka repeytyvät ja aiheuttavat näin merotsoiittien vapautumisen. Maksassa lisääntyvät sporotsoiitit tuottavat 30–40000 jälkeläistä 6 päivän aikana. Tämä täydentää loisen kehityksen pre-erytrosoyttisen vaiheen. Pre-erytrosoyttinen vaihe ei aiheuta isännälle kliinisiä oireita. Schizontiitit voivat myös siirtyä toisiin maksasoluihin ja lisääntyä edelleen niissä. Maksassa tapahtuvaa loisten elämänvaihetta kutsutaan maksakierroksi, ja se on samalla osa pre-erytrosoyttistä vaihetta. (CDC, 2020.)

P. vivax ja *P. ovale* lajeilla on ominaisuus pysyä maksasoluissa lepotilassa. Lepotila voi jatkua viikkoja tai jopa vuosia ja aiheuttaa näin malarian oireita vasta pitkän ajan kuluttua infektiosta. Lepotilassa olevia loisijoita kutsutaan hypnozoiiteiksi (CDC, 2020).

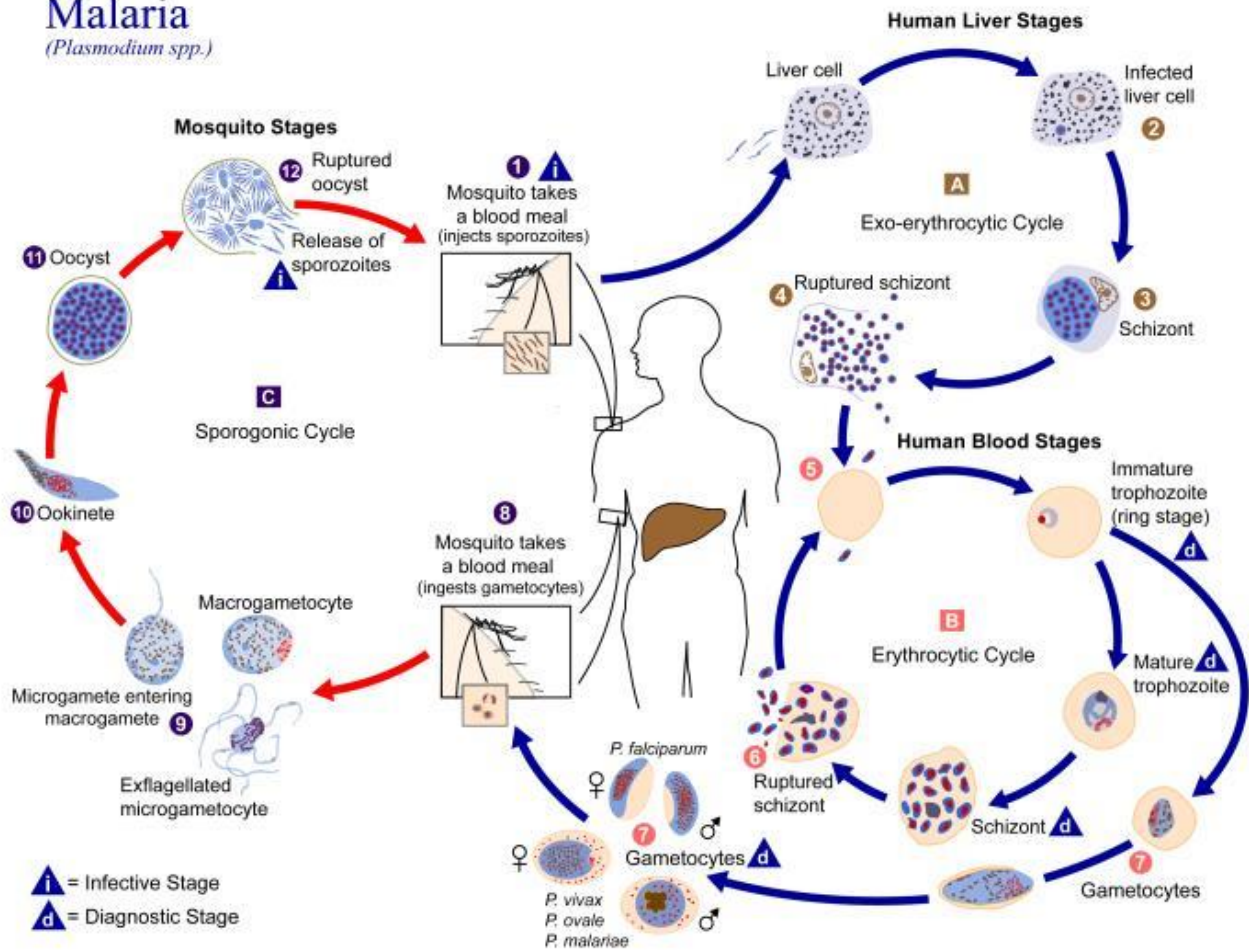
Merotsoiitit pystyvät lisääntymään punasoluissa ja kulkeutumaan myös toisiin punasoluihin. Kukin merotsoiitti kykenee 48–72 tunnin kuluessa tuottamaan noin 16–24 uutta itiötä. Niiden vapautuminen punasoluista aiheuttaa myrkyllisten aineenvaihduntatuotteiden vapautumisen verenkiertoon ja malarialle tyypilliset oireet. Lisääntynyt sytokiinituotanto johtaa kuumeen, päänsärkyyn, vilunväristysten, hikoilun ja oksentelun kliinisiin oireisiin. Punasoluissa tapahtuvaa vaihetta kutsutaan punasolukierroksi ja se on osa verivaihetta. Punasoluissa kypsyttämistä trofotsoiiteista kehittyy kypsiä trofotsoiitteja tai ne erikoistuvat gametosyyteiksi. Kypsät trofotsoiitit kehittyvät edelleen schizonteiksi, jotka edelleen vapauttavat merotsoiitteja verenkiertoon. Kypsyttämistä trofotsoiiteista muodostuneet gametosyytit siirtyvät ihmisestä *Anopheles*-hyttysiin, kun hyttynen imee verta ihmisestä. Hyttysessä tapahtuvaa vaihetta

kutsutaan sporogoniseksi kierroksi. (CDC, 2020.) Hyttyseen siirtyneet naaraspuoliset gametosyytit, makrogametosyytit, ja koiraspuoliset gametosyytit, mikrogametosyytit, yhdistyvät ja muodostavat tsygootteja. Suvullinen lisääntyminen sukusolujen avulla saa aikaan homologista rekombinaatiota ja tuottaa jälkeläisiin merkittävää geneettistä vaihtelua. Tsygootit kypsyvät liikkumiskykyisiksi ja pitkän muotoisiksi ookineeteiksi. Ookineetit kehittyvät hyttysen suolen seinämässä ookysteiksi. Ookystien repeytyessä vapautuu sporotsoiitteja, jotka kulkeutuvat hyttysen sylkirauhasiin. Hyttysen imiessä verta ihmisestä, sporotsoiitit pääsevät jälleen kulkeutumaan ihmiseen ja loision elinkierto alkaa uudestaan. Kuvassa 1 on esitelty malarialoision elinkierto. (Cowman *et al.* 2017.)

Sukusolujen avulla tapahtuvan lisääntymisen seurauksena ilmenevä korkea geneettinen polymorfismi antaa *P. falciparum* -loiselle edun tuhoutumista vastaan, sillä Ihmisen tuottamat immuunivasteet kohdistuvat usein loisen muuttuviin antigeeneihin kohtiin. Geneettinen vaihtelu saa aikaan myös sen, että yksilöt ovat alttiita toistuville, samankaltaisille infektioille, myös malariaa vastaan rokotetut henkilöt. (Laurens, 2019.)

Malaria

(*Plasmodium spp.*)



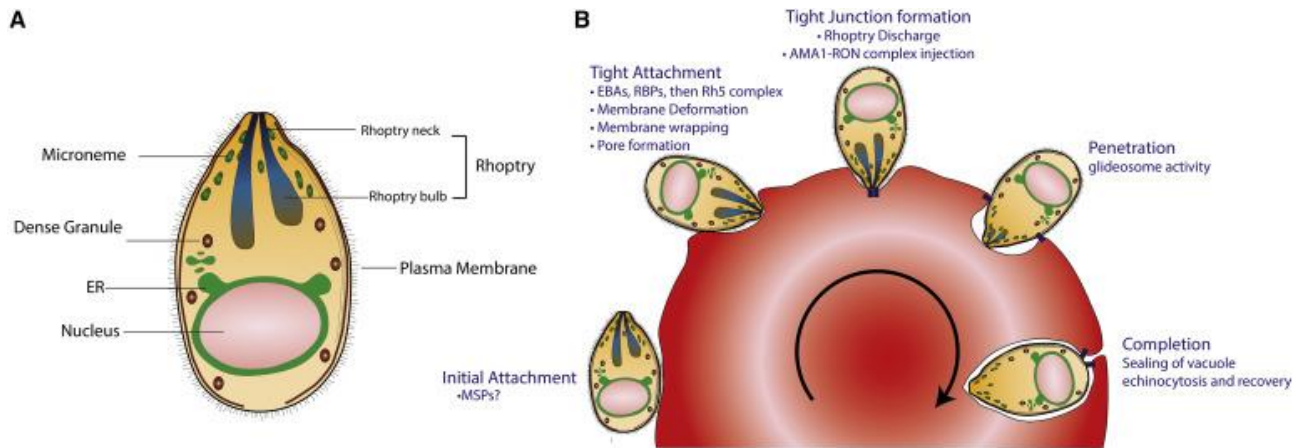
Kuva 1. Malerialoision elinkierto. Malariaa aiheuttavat sporotsoiitit pääsevät kulkeutumaan ihmisen verenkiertoon hyttysen piston seurauksena. Sporotsoiitit siirtyvät ensin maksaan, jossa tapahtuu maksakierto. Maksakierrosta vapautuneet merotsoiitit infektoivat veren punasoluja ja aiheuttavat malarian oireet hajottaessaan punasoluja. Punasolukierron aikana syntyneet gametosyytit kulkeutuvat hyttysen sen imiessä gametosyyttejä sisältävää verta. Hyttysessä gametosyytit muodostavat tsygootteja, joista kehittyy edelleen kypsiä sporotsoiitteja. Sporotsoiitit voivat siirtyä ihmiseen hyttysen syljen mukana. Sporotsoiitit ovat osa pre-erytsoryyttistä vaihetta, merotsoiitit kuuluvat puolestaan verivaiheeseen. (Cowman *et al.* 2017.) (Kuva lähteestä: Photo Credit:Content Providers(s): CDC/Alexander J. da Silva, PhD/Melanie Moser, Public domain, via Wikimedia Commons).

3.2.1 Merotsoiittien tunkeutuminen punasoluihin

*Plasmodium falciparum*in verivaiheen merotsoiitti on suhteellisen pieni. Sen pituus ja leveys ovat vain noin 1–2 µm. Merotsoiitti-vaiheen loisilla on vain yksi tehtävä; tunkeutua punasoluun, ja pieni koko on hyödyksi tässä tehtävässä. Merotsoiitin apikaalinen pää on polarisoitunut ja sisältää organelleja ja rakenteita, jotka helpottavat punasoluihin tunkeutumista. Näitä rakenteita ovat muun muassa mikronemit ja rhoptriat. Mikroneeni-rakenteet sisältävät adhesiineja, jotka

ovat osallisena punasoluun sitoutumisessa. Rhopriat puolestaan vapautuvat vasta punasoluun sitoutumisen jälkeen, ja ne helpottavat tunkeutumista sisälle punasoluun sekä parasiittofoorisen vakuolin muodostuksessa. Vakuolissa tapahtuu merotsoiittien replikoituminen ja tytärsolujen muodostuminen. Viimeaikaiset tutkimukset ovat antaneet viittaa siitä, että mikronemejä voi olla useita erilaisia, riippuen siitä minkälaisia adheiineja ne sisältävät. Lisäksi dense granule-solurakenteilla voi olla erilliset alaryhmät, ja on joukko organismeja, joita kutsutaan eksoneemeiksi. Eksoneemit sisältävät proteaasi-subtilisiiniä ja vapauttavat sitä parasitoforiseen vakuoliin, jossa se kykenee prosessoimaan proteolyttisesti useita loisproteiineja ja helpottaa näin merotsoiittien poistumista vakuolista. Dense granule-rakenteet fuusioituvat solukalvon kanssa parasiitin aseksuaalisen syklin eri vaiheissa mm. tunkeutumisen aikana ja juuri sen jälkeen. Näiden rakenteiden fuusioitumisella on ajateltu olevan kriittisiä vasteita spesifisten ligandien vapautumisessa tunkeutumisen eri vaiheissa. (Cowman *et al.* 2017.)

Tunkeutuminen punasoluun alkaa loisen kiinnittymisellä. Tapahtumassa voi olla osallisena MSP-proteiineja, mutta liittyminen voi tapahtua myös suoraan EBA- ja PfRh-proteiinien kautta. Apikaalinen uudelleensuuntautuminen edellyttää loisen solukalvon käärimistä niin, että apikaalinen pää tulee erytrosyytin viereen. Tällöin tiukka kiinnittyminen mahdollistuu. Todisteet ovat antaneet näyttöä siitä, että merotsoiitin ja erytrosyytin välille muodostuu aukko, joka on valmistettu joko suoraan tai epäsuorasti PfRh5/PfRipr/CyRPA-kompleksilla. Tähän tapahtumaan liittyy RON-kompleksin liikkuminen isäntäsolun solukalvolla. Lopputuloksena muodostuu tiukka liitos, johon liittyy korkean affiniteetin ligandi-reseptori-vuorovaikutuksia merotsoiittien pinnalla olevien AMA1- ja punasolujen solukalvon RON2-rakenteiden välillä. Syntynyt liitos siirtyy apikaaliselta puolelta posterioriselle puolelle aktinomyosiinimoottorin energian liikuttamana. Tätä seuraa pintakerroksen irtoaminen seriiniproteaasin toimesta. Kun liitos saapuu posterioriselle puolelle myös adhesiiviset proteiinit poistetaan paikallisilla proteaaseilla, jotka ovat todennäköisesti romboideja. Tämä helpottaa kalvon uudelleensulkemista. Tällä prosessilla loinen ei itse asiassa vain tunkeudu kalvoon, vaan tekee sen tavalla, jolla saa luotua itselleen parasitoforisen vakuolin. Merotsoiitin tunkeutuminen punasoluun on näytetty kuvassa 2. (Cowman *et al.* 2017.)



Kuva 2. A) *P.falciparum* merotsoiitti vaiheisen loisen rakenne. Mikronemi- ja rhoptry-rakenteet on merkitty loisen apikaaliseen päähän. Nämä rakenteet helpottavat merotsoiitin tunkeutumista punasoluun. Mikronemit sisältävät adheineja, jotka ovat osallisena punasolun sitoutumisessa. Rhoptriat puolestaan vapautuvat vasta punasolun sitoutumisen jälkeen, ja ne helpottavat tunkeutumista sisälle punasolun sekä parasiittofoorisen vakuolin muodostuksessa. B) Merotsoiitin tunkeutuminen punasoluun. Kuvassa on näytetty loisen kiinnittymisen ja tunkeutumisen eri vaiheet. (Cowman *et al.* 2017.) (Kuva lähteestä: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S193131281730286X>).

3.3 Malariaa aiheuttavat parasiitit

Malarialoiset ovat *Plasmodium*-sukuun kuuluvia eliöitä. Ne ovat yksisoluisia eukaryootteja, jotka ovat välttämättömiä loisia useille hyönteisille sekä selkäjännteislajeille. Luonnossa elää yli 100 *Plasmodium*-lajia. *Plasmodium*-loisten elinkaari on monimutkainen. Ihmisen tartunta alkaa tartunnan saaneen, naaraspuolisen, *Anopheles*-hyttysen puremasta. Hyttysen sylkirauhasissa sijainneet itiöt pääsevät kulkeutumaan laskimoverenkiertoon ja tunkeutumaan maksasoluihin. *P. falciparumin* tapauksessa, seuraavan 14. päivän aikana tapahtuu loisten erilaistumista ja lisääntymistä aseksuaalisesti. Tämä johtaa kymmeneen tuhansiin merotsoiitteihin, jotka puhkeavat maksasoluista verenkiertoon. Merotsoiitit tunkeutuvat erytrosyytteihin ja käyvät läpi ylimääräisen lisääntymiskierroksen. Tämä verivaiheen pituus on riippuvainen loisilajista; *P. falciparumilla* pituus on epäsäännöllinen, *P. vivaxilla* ja *P. ovalella* 48 tuntia ja *P. malariaella* 72 tuntia. Jotkin merotsoiitit erottuvat gametosyyteiksi. Gametosyytit siirtyvät hyttysiin veriaterian aikana, ja gametosyyteistä kehittyy uusia valmiita itiöitä, jotka kulkeutuvat hyttysen sylkirauhasiin ja ovat valmiina siirtymään seuraavaan ihmiseen. (Laurens, 2019.)

Malariaa aiheuttavia ja ihmisiä tartuttavia *Plasmodium*-suvun lajeja on löydetty viisi kappaletta; *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* ja *Plasmodium knowlesi*. *P. falciparum* on vastuussa 90 % kaikista malarian aiheuttamista kuolemista. *P. vivax* on *P. falciparumin* jälkeen seuraavaksi haitallisim ja eniten

tartuntoja aiheuttava malarialoisio. *P. vivax* -loisio on harvinainen Saharan eteläpuolisilla alueilla mutta sitä esiintyy endeemisenä monissa osissa Aasiaa, Oseaniaa sekä Keski- ja Etelä-Amerikkaa. *P. vivax* vastaa noin 50 % malariatartunnoista Afrikan alkupuolisilla alueilla. *P. falciparumin* ja *P. vivaxin* yleisyydestä johtuen, useiden rokotteiden kehittämistoimet ovat keskittyneet näitä malarialoisiota vastaan. (WHO, 2020.)

Malarialoisiolla on lajista riippuen erilainen kyky infektoida punasoluja. *P. vivaxin* ja *P. ovalen* on havaittu tunkeutuvan lähinnä vain retikulosyytteihin, kun taas *P. malariae* infektoi vanhoja punasoluja. *P. vivax*-, *P. ovale*- ja *P. malariae* -lajien loisiot aiheuttavat tästä syystä malarioita, joissa yleensä vain 1–2 % punasoluista voi infektoitua. Tämän seurauksena taudissa ei normaalisti esiinny vakavia komplikaatioita. *P. falciparumin* kyky infektoida kaiken ikäisiä punasoluja tekee loisesta vaarallisemman kuin muut. Malariaa aiheuttavat parasiitit kykenevät muuttamaan punasoluja siten, että ne synnyttävät hiussuoniin tukoksia. Tukokset aiheuttavat oireita, jotka johtavat elinvaurioihin ja komplikaatioihin erityisesti aivoissa, munuaisissa, suolen limakalvoilla, keuhkoissa ja munuaisissa. (Kyrönseppä ja Siikamäki, 2001.) Nykyään tiedetään, että *P. falciparum* on kulkeutunut ihmiseen alun perin gorillasta, kun taas *P. vivax* on lähtöisin kantamuodosta, joka infektoi simpansseja, gorilloja ja ihmisiä Afrikassa (Hahn *et al*, 2017).

3.3.1 *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum on yksi malariaa aiheuttavista alkueläimistä, jonka vektorina toimii *Anopheles*-suvun naaraspuolinen hyttynen. *P. falciparumin* aiheuttama malaria on malarian muodoista vaarallisin, ja sillä on korkeimmat komplikaatio- ja kuolleisuustilastot. *P. falciparumia* esiintyy eniten Saharan eteläpuolisessa Afrikassa, ja Afrikan maissa tapahtuvista malariainfektioista 75 % on kyseisen loisen aiheuttama. Lähes jokainen malariakuolema on peräsin *P. falciparumin* aiheuttamasta tartunnasta. *Plasmodium falciparum* -loisilla on kyky aiheuttaa vakavaa malariaa spesifisen ominaisuuden kautta, jota ei ole muilla malariaa aiheuttavilla loisilla. 48-tunnin aseksuaalisen verivaiheen aikana loisen kypsät muodot pystyvät muuttamaan tartunnan saaneiden punasolujen pintaominaisuuksia siten, että ne tarttuvat verisuoniin. Tästä seuraa tukkeutumia mikroverenkiertoon, mikä puolestaan johtaa useiden elinten, tyypillisesti aivojen, toimintahäiriöön malarian yhteydessä. (WHO, 2015.)

3.4 Immunitetti ja immuunireaktio malariaa vastaan

Luonnollisella tai synnynnäisellä immunitetilla tarkoitetaan henkilön luontaista suojaa infektion muodostumista vastaan. Synnynnäinen immunitetti ei vaadi aikaisempaa infektiota. Synnynnäinen immunitetti malariaa kohtaan on havaittu henkilöillä, joilla hemoglobiinin tai tiettyjen entsyymien rakenteen muutos on tuottanut suojan infektiota tai sen vakavia ilmenemismuotoja vastaan. Esimerkiksi punasolujen duffy-negatiivisuus suojaa *P. vivax* -infektiolta. Glukoosi6-fosfaattidehydrogenaasin puute ja sirppisoluhemoglobiini tarjoavat suojan vakavaa malariaa ja malariakuolleisuutta vastaan. Tutkimuksista saatujen tulosten perusteella lukoosi6-fosfaattidehydrogenaasin puuttumisen aiheuttaman suojan tehokkuuden on todettu olevan 50 %. Sirppisoluhemoglobiinin antama suojan tehokkuudeksi on puolestaan saatu 90 %. (Baird *et al*, 2009.)

Akuutti malarian aiheuttama infektio saa aikaan myös välittömän, epäspesifisen immuunivasteen aktivoitumisen. Se pyrkimyksinä on rajoittaa taudin etenemistä. Luonnollisia tappajasoluja (NK) on veressä, sekundaarisissa lymfaattisissa elimissä sekä perifeerisissä ei-lymfoidisissa kudoksissa. Tutkimukset ovat osoittaneet, että NK-solut kykenevät hajottamaan *P. falciparumin* infektoineet punasolut *in vitro* -olosuhteissa. *Plasmodium*-loisten infektoimat punasolut saavat aikaan NK-solujen aktivaation. NK-solut alkavat tuottaa gamma-interferonia, mikä johtaa loisia tappavien makrofagien aktivoitumiseen. Näillä soluilla on tärkeä merkitys myös adaptiivisen immuunivasteen aloittamisessa ja kehityksessä. NK-solut indusoivat proinflammatorisen kemokiinin, interleukiini-8:n, tuotannon. Interleukiini-8 erittyminen saa aikaan muiden solujen rekrytoinnin ja aktivaation malariainfektion aikana. Dendriittisolut, makrofagit, gamma-delta-T-solut ja NKT-solut ovat myös osallisena immuunivasteessa. Hiirillä tehdyissä kokeissa NKT-solujen on todettu olevan voimakkaita maksavaiheen loisten replikaation estäjiä. Hiiren NK1.1-CD4-T-solujen on raportoitu säätelevän IgG vasta-aineiden toimintaa *P. falciparumia* vastaan. (Baird *et al*, 2009.)

Hankittu immunitetti malariaa vastaan kehittyy malariainfektion jälkeen. Immunitetin suojaava teho vaihtelee isännän ominaisuuksien, oleskelupaikan ja kärsittyjen infektioiden lukumäärän mukaan. Hankittu immunitetti voidaan luokitella tautien vastaiseksi immunitetiksi, parasiittiseksi immunitetiksi sekä steriloiivaksi immunitetiksi. Tautien vastainen immunitetti suojaa kliinisiä sairauksia vastaan, parasiittinen immunitetti suojaa korkeaa parasitemiaa vastaan ja steriloiiva immunitetti suojaa uusilta infektiolta. Kaikkien kolmen kategorian välillä on huomattavaa päällekkäisyyttä. Malariainfektio aiheuttaa akuutin kliinisen sairauden henkilölle, jolla ei ole hankittua immunitettia sairautta vastaan. Infektio

voi edetä vakavaksi taudiksi ja aiheuttaa kuoleman. Muutaman infektion jälkeen tautia vastaan kehittyi immuniteetti. (Baird *et al*, 2009.)

3.5 Malariarokotteet

Viimeisen 20 vuoden aikana malariarokotuskokeita on rekisteröity viralliseen rekisteriin noin 10 kappaletta jokaisen vuoden aikana. Rekisteröintien määrä on pysynyt tasaisena vuodesta toiseen mutta prioriteetin muutosta on ollut havaittavissa ajan myötä. RTS,S-rokotteen tutkimukset ovat pysyneet samalla tasolla, vaikkakin näyttekokoja on suurennettu. Kokeet, joissa testataan kokonaisten sporotsoiittirokotteiden tehokkuutta ja turvallisuutta *P.falciparum*-loisen aiheuttamien infektioiden vähentämiseksi, ovat lisääntyneet viimeisen vuosikymmenen aikana. Myös malarialoision leviämistä hyttysiin estävien, loisen seksuaalisiin vaiheisiin kohdistuvien rokotteiden kokeet ovat lisääntyneet. Raskaana oleville naisille tarkoitettut rokotteet, jotka suojelevat istukan malariaa vastaan, ovat tulleet käyttöön viimeisen 5 vuoden aikana. Taulukossa I on esitetty kliinisessä tutkimuksessa olevat malariarokotteet, jotka ovat rekisteröity osoitteessa Clinicaltrials.gov vuodesta 2000 lähtien vuoteen 2020. (Duffy ja Gorres, 2020.)

Erittäin tehokkaan malariarokotteen kehittämisen vaikeus on saanut aikaan sen, että tutkimuksissa on kokeiltu hyvin monenlaisia uusia lähestymistapoja ja arviointia. Sen lisäksi, että tutkimukset sisältävät erilaisia lähestymistapoja malariainfektioiden ja tautien torjumiseksi, tehdään samalla myös monien muiden uusien rokotetekniikoiden varhaista arviointia. (Hill, 2011.)

Taulukko I. Taulukossa on vuodesta 2000 lähtien ClinicalTrials.gov- sivustolle rekisteröidyt malariarokotteiden kliiniset tutkimukset. Vuodesta 2000 lähtien kliinisissä kokeissa on tutkittu pre-erytrosyyttiseen vaiheeseen kohdistettuja rokotekandidaatteja, kuten RTS,S, R21, Full-length CSP, PfSPZ Vaccine, Chemoprophylaxis vaccination (CVac) ja Genetically attenuated parasite (GAP) vaccines. Verivaiheen rokotekandidaateina kliinisissä tutkimuksissa on ollut testissä PfrH5, AMA-1-RON2, PfSEA-1 ja PfGARP. Kokonaisista sporotsoiittirokotteista tutkimuksiin on rekisteröity Chemically attenuated parasite (CAP) vaccines ja *Plasmodium vivaxin* aiheuttamaa malariaa vastaan PvDBP. Hyttysvaiheen rokotteista sivustolle on rekisteröity Pfs25, Pfs230, Pfs48/45 ja Pvs230. (Kuva lähteestä: <https://www.nature.com/articles/s41541-020-0196-3#citeas>).

Vaccine candidate	Immunogen type	Current status
<i>Pre-erythrocytic stage (anti-infection)</i>		
RTS,S	Subunit	Phase 4
R21	Subunit	Phase 1/2
Full-length CSP	Subunit	Phase 1
PfSPZ Vaccine	Whole sporozoite (radiation attenuation)	Phase 2
Chemoprophylaxis vaccination (CVac)	Whole sporozoite (chemical attenuation)	Phase 2
Genetically attenuated parasite (GAP) vaccines	Whole sporozoite (genetic attenuation)	Phase 1
<i>Blood stage</i>		
PfRH5	Subunit	Phase 1
AMA1-RON2	Subunit	Preclinical
PfSEA-1	Subunit	Preclinical
PfGARP	Subunit	Preclinical
Chemically attenuated parasite (CAP) vaccines	Whole blood-stage parasite	Phase 1
VAR2CSA (Placental malaria)	Subunit	Phase 1
PvDBP (<i>Plasmodium vivax</i>)	Subunit	Phase 1
<i>Mosquito stage (Transmission-blocking)</i>		
Pfs25	Subunit	Phase 1
Pfs230	Subunit	Phase 2
Pfs48/45	Subunit	Preclinical
Pvs230 (<i>Plasmodium vivax</i>)	Subunit	Preclinical

3.5.1 Pre-erytrosyyttiset rokotteet

Pre-erytrosyyttiset rokotteet, joista käytetään myös nimeä anti-infektiiviset rokotteet, kohdistuvat pääasiassa *Plasmodium falciparum* itiöihin. Rokotteet indusoivat spesifisiä vasta-aineita, jotka tappavat tartunnan saaneet maksasolut tai häiritsevät malariaparasiittia maksasoluissa tapahtuvan lisääntymisen aikana ja estävät siten merotsoiittien vapautumisen verenkiertoon ja infektion oireiden syntyminen. Pre-erytrosyyttisten rokotteiden suojan *Plasmodium falciparum*ia vastaan on oltava 100 %, jotta todellinen suojavaikutus voidaan saavuttaa. Tällä hetkellä suurin osa pre-erytrosyyttisiä malariarokotteita koskevasta tutkimuksesta painottuu alayksikkörokotteiden kehittämiseen loisen proteiineja vastaan. *Plasmodium falciparum*in CS-proteiini on yksi esimerkki tästä. (Gu *et al*, 2019.)

Pre-erytrosyyttiset rokotteet käyttävät antigeeneinä sporotsoiittien pinnalla olevia rakenteita kuten cirkumsporotsoiittiproteiineja (CSP) sekä infektoituneen hepatosyytin pinnalla olevia rakenteita. Maksakierron aikana sporotsoiitit kulkeutuvat maksaan ja lisääntyvät siellä jakautumalla. Infektoituneella henkilöllä ei vielä tällöin ilmene oireita. Pre-erytrosyyttiset rokotteet on suunniteltu toimimaan niin, että ne indusoivat vasta-aineita pinta-antigeenejä vastaan. Vasta-aineiden toimintakyky perustuu siihen, että ne puhdistavat sporotsoiitteja iholta ja verenkierrosta sekä estävät niiden pääsyn maksan hepatosyytteihin. Vasta-aineet tehostavat myös T-solujen toimintaa infektoituneita hepatosyyttejä vastaan. Pre-erytrosyyttiset rokotteet, jotka omaavat korkean aktiivisuuden, voivat puhdistaa loiset ennen niiden vapautumista verenkiertoon. Sporotsoiitteja sekä infektoituneita hepatosyyttejä vastaan kohdistetut immuunivasteet voivat teoriassa estää taudin kehittymisen verivaiheeseen. (Duffy ja Gorres, 2020.)

CSP on sporotsoiittivaiheen loisilla hallitsevana pinta-antigeeninä. Tutkimuksissa on osoitettu, että vasta-aineet CSP-antigeenejä vastaan ovat estäneet sporotsoiitteja siirtymästä maksan hepatosyytteihin ja tartutamasta niitä. *P. falciparum* -loisen aiheuttamaa malariaa vastaan kehiteillä olevan rokotekandidaatin, RTS,S/AS01:n, toiminta perustuu sporotsoiittien pinnalla oleviin CSP-antigeeneihin. RTS,S/AS01 sisältää ainoastaan malaria-antigeeniä CSP, joten rokote toimii vain pre-erytrosyyttiseen vaiheeseen. CSP-antigeenin ekspressoointia ei tapahdu verivaiheessa, joten rokotteen aiheuttama immuunivaste ei suoranaisesti vaikuta verivaiheessa olevaan loiseen. (WHO, 2020.)

3.5.2 Kokonaiset sporotsoiittirokotteet

Kolme potentiaalista kokonaisen sporotsoiittirokotteen valmistustapaa on kehitteillä; geneettisesti heikennetyt loiset, säteilyllä heikennetyt itiöt ja villityypin itiöt, jotka annetaan yhdessä kemoprofylaksian kanssa (Do *et al*, 2018).

1970-luvulta lähtien on saatu todisteita, että kokonaiset sporotsoiittirokotteet voisivat tarjota steriloivan immuniteetin ihmisen sporotsoiittialtistusta vastaan mutta rokotteiden valmistusta ei ole jatkettu tuotteena, johtuen siitä käsityksestä, että säteilytettyjen sporotsoiittien valmistaminen rokotteeksi on epäkäytännöllistä. Sanaria-yhtiö esitteli vuonna 2010 tekniikan, joka sisältää *Plasmodium falciparum* -sporotsoiittien keräämisen viljellyillä laboratorioloisilla tartunnan saaneiden aseptisten hyttysten sylkirauhasista, niiden puhdistamisen, siirron näytepulloon ja kylmäsäilytyksen nestemäisessä typpihöyryfaasissa. *Plasmodium falciparum* -sporotsoiitit heikennetään erilaisia menetelmiä käyttäen rokotekandidaattien valmistamiseksi; säteilyheikennys, jolloin saatua rokotetta kutsutaan PfSPZ-rokotteeksi, kemoheikennys, joka suoritetaan *in vivo* ja antamalla samanaikaisesti malarialääkkeitä, tällöin rokotetta kutsutaan PfSPZ-CVac-kemoprofylaksirokotteeksi sekä geneettinen heikennys, jossa poistetaan geenit, joita sporotsoiitti tarvitsee täydelliseen maksanvaiheen kehittymiseen. Geneettisellä heikennyksellä valmistettua rokotetta kutsutaan nimellä PfSPZ-GA1. PfSPZ-rokote on edellyttänyt rokottamista suoraan laskimoon steriilin immuniteetin saamiseksi. Kokonaisten sporotsoiittirokotteiden logistisiin ja potentiaalsiin kustannushaasteisiin kuuluvat nestetyypikylmäketju, rokottaminen suoraan laskimoon ja valmistuksen laajentaminen. (Dyffy ja Gorres, 2020.)

3.5.3 Verivaiheen rokotteet

Malarian kliiniset oireet, kuten kuume, ilmaantuvat, kun *Plasmodium*-loiset kiertävät verivaiheen loisina ihmiskehon punasoluissa. Kun merotsoiitit siirtyvät maksasta punasoluihin, voi niiden pintaproteiini jäädä punasolujen solukalvoihin ja altistua näin suoraan isännän immuunipuolustukselle. T- ja B-solut aktivoituvat tuottamaan immuunivasteita törmättyään näihin punasolun pinnalla oleviin, antigeeninä toimiviin rakenteisiin. Tutkimukset ovat antaneet viitteitä, että $\gamma\delta$ - T-solut voivat tuottaa vasta-aineita ja antaa suojaavan immuniteetin malariainfektion verivaiheelle. Siksi verivaiheen malariarokotteiden tutkimus on ollut pitkään rokotteiden ”hot spot”. (Gu *et al*, 2019.)

Verivaiheen rokotteiden toiminta perustuu loisen aseksuaalisiin muotoihin, jotka lisääntyvät syklisesti punasoluissa. Verivaiheessa olevat loiset ovat olleet kiinnostava kohde malariarokotteita kehittäville tutkijoille, sillä verivaiheen aikana ilmenevät sairaudelle tyypilliset oireet. Verivaiheeseen kohdistuvien rokotteiden haasteina on ajan lyhyys; merotsoiitit kulkevat veressä punasolujen välillä vain lyhyen aikaa ja ovat täten vasta-aineiden ulottuvilla ainoastaan hetken. Toisina haasteena ovat antigeenien polymorfismi, redundantit hyökkäysreitit sekä kohteena olevien loisten suuri määrä. Vuosien 2000 ja 2015 välisenä aikana verivaiheen rokotekokeiluja rekisteröitiin yli 30 kappaletta, ja suurin osa kokeiluista kohdistui MSP1- ja AMA1-antigeeneihin. Muita antigeenejä, joita vastaan verivaiheen rokotteita kehitettiin, olivat muun muassa EBA-175 ja MSP3. AMA-1-antigeenia vastaan suunnatut rokote-ehdokkaat indusoivat kokeissa vasta-aineita, jotka olivat toimivia *in vitro*-määrittelyillä mutta eivät kuitenkaan osoittaneet tehokkuutta kontrolloitua infektiota vastaan. (Duffy ja Gorres, 2020.)

Yksi esimerkki verivaiheen rokotteesta on AMA-1 (Apical Membrane Antigen 1). AMA-1 ilmenee sporotsoiitti-, maksa- ja erytrosyyttivaiheessa, jolloin sillä on olennainen rooli loisten selviytymisessä. AMA-1/AS02-rokotteella ei ollut yleistä tehokkuutta, mutta seula-analyysin perusteella on todettu alleelispesifinen teho rokotekantaa vastaan, mikä viittaa siihen, että AMA-1 voisi olla hyödyllinen lisäys monikomponenttiseen rokotteeseen. AMA-1-molekyylirakentuu 16:sta konservatiivisesta kysteiniinihappo- ja seriniinihappo-ryhmästä, jotka jatkavat proteiinin kolmeen alarakenteeseen. Näistä alarakenteista AM-1(III), joka sijaitsee C-terminaalialueella, on geneettisesti konservoitu ja sitä on pidetty komponenttina ehdokasrokotteelle. Tutkimuksissa on havaittu, että *Plasmodium falciparum*in kimeerinen proteiini 2.9 (PfCP-2.9), joka koostuu MSP119- ja AMA-1(III)-sekvensseistä, indusoi loisia estäviä vasta-aineita kaneissa ja apinoissa. (Gu *et al*, 2019.)

3.5.4 Seksuaalisiin ja hyttysvaiheisiin kohdistuvat rokotteet

Seksuaalisiin ja hyttysvaiheisiin kohdistuvat rokotteet on suunniteltu siten, että ne hallitsevat malariaparasitiittien leviämistä ihmisestä hyttysvektoreihin. Rokotteet sisältävät hyttys- ja seksuaalivaiheiden pinta-antigeenejä, jotka indusoivat vasta-ainetuotannon. Vasta-aineet tappavat loisia hyttysen imiessä verta ihmisestä ja keskeyttävät loisen leviämisen vektorin kautta. Kohteena olevat antigeenit tunnistettiin monoklonaalisilla vasta-aineilla, joita kasvatettiin jyrksijöissä sukusoluja vastaan ja estettiin hyttysen tartunta. Neljä johtavaa rokotekandidaattia on ryhmitelty ihmisen veressä olevien loisen gametosyyttien

ekspressoimien sukusolujen pintaproteiinien mukaan, esimerkiksi *P. falciparumin* Pfs230 ja Pfs48/45 sekä tsygootin pinnalla esiintyvien proteiinien mukaan, esimerkiksi Pfs25 ja Pfs28. Nämä antigeenit sisältävät paljon kysteinejä ja niissä on useita 6-cys- tai epidermaalisen kasvutekijän (EGF) kaltaisia domeeneja. Pfs25 oli ensimmäinen rekombinanttiproteiinina valmistettu seksuaalisiin ja hyttysvaiheisiin kohdistuva rokotekandidaatti. Eläintutkimukset ovat osoittaneet, että Pfs25-rokotekandidaatit ovat saaneet aikaan yhtä suuren tehon kuin muut antigeenit tai antigeeniyhdistelmät, ja siksi Pfs25 on ollut tähän mennessä julkaistujen kliinisten tutkimusten painopiste. Nyt käynnissä olevat tutkimukset keskittyvät Pfs230-rokotekandidaatin aktiivisuuden tutkimiseen, ja eläimillä kasvatetut Pfs230-vasta-aineet osoittavat lyyttistä aktiivisuutta *P. falciparumin* gameetteja vastaan komplementin läsnä ollessa. Näiden saatujen tulosten pohjalta voidaan uskoa, että ihmisen Pfs230-antiseerumin aktiivisuutta voidaan myös saada lisättyä. (Duffy ja Gorres, 2020.)

Seksuaalisiin ja hyttysvaiheisiin kohdistuvien rokotteiden kehityksen haasteisiin kuuluu riittävän adaptiivisen vasteen saavuttaminen, jotta riittävän korkean vasta-ainetason ylläpitäminen on mahdollista ajan myötä, sekä riittävän laaja kattavuus laumasuojan saavuttamiseksi. Rokotteella on lisäksi oltava poikkeuksellinen turvallisuusprofiili, koska niistä ei ole suoraa hyötyä yksilölle. Seksuaalisiin ja hyttysvaiheisiin kohdistuvat rokotteet voitaisiin yhdistää pre-erytrosyyttiseen vaiheeseen kohdistuvien rokotteiden kanssa, jolloin ihmisillä tapahtuva infektio ja tarttuminen hyttysiin voitaisiin estää yhden rokotteen avulla. (Duffy ja Gorres, 2020.)

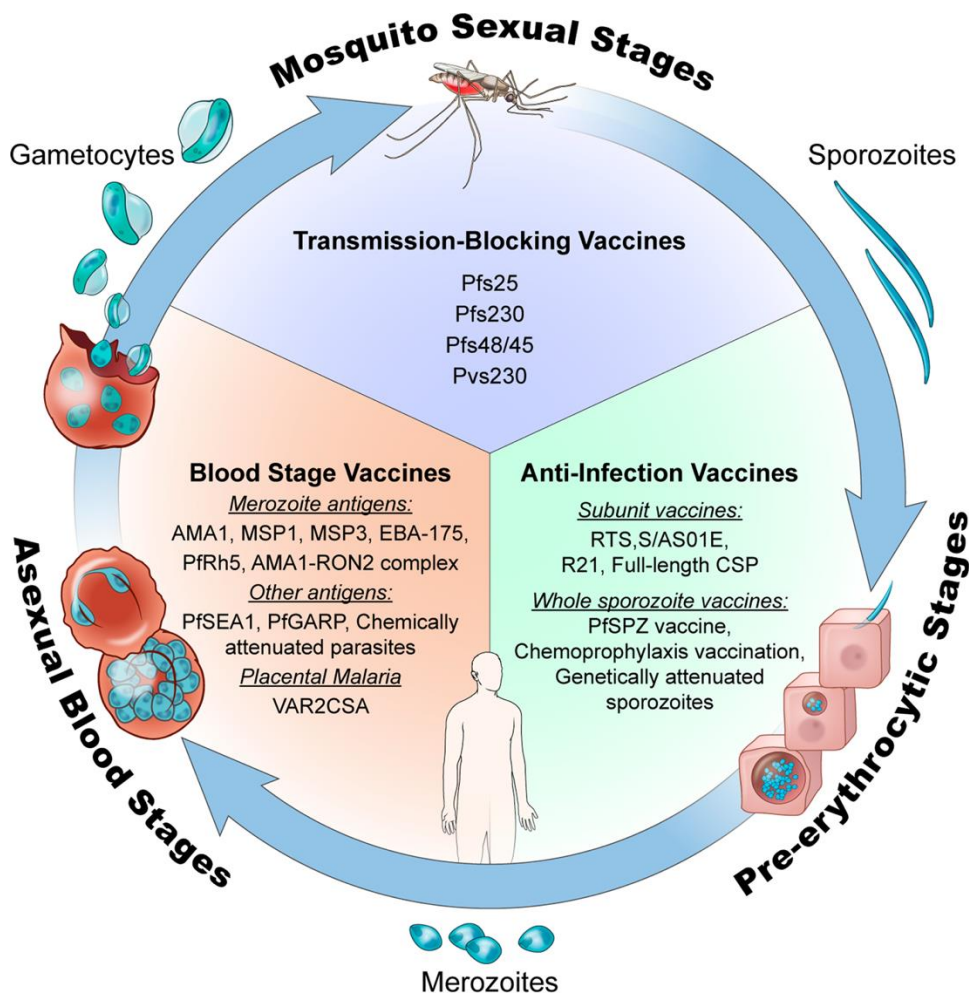
3.5.5 *Vivax*-rokotteet

Plasmodium vivax aiheuttaa arviolta noin 14,3 miljoonaa malariatapausta vuosittain ja on suurin malarian aiheuttaja Aasiassa ja Latinalaisessa Amerikassa. Loinen aiheuttaa 50 % Afrikan ulkopuolella tapahtuvista malariatapauksista. *P. vivax* -loisen aiheuttamaa malariaa on perinteisesti pidetty hyvänlaatuisena tertiäärisenä malariana, mutta nykyään se on katsottu olevan yhä enemmän kansanterveydellinen uhka, joka aiheuttaa vakavaa sairastuvuutta ja kuolleisuutta. Rokotekehitys loista vastaan kärsii resurssien niukkuudesta, sillä suurin osa malariarokotteiden tutkimukseen käytetyistä varoista kohdistuu *P. falciparum* -tutkimukseen. *P. vivax* -rokotteiden kehittäminen onkin yleensä seurannut *P. falciparumia* vastaan kohdistettujen rokotteiden kehittämistä. (Duffy ja Gorres, 2020.)

Plasmodium vivaxia vastaan testatut rokotteet sisältävät pre-erytrosyyttisten rokotekandidaattien ja seksuaalisiin ja hyttysvaiheisiin kohdistuvien rokotekandidaattien

ortologit, jotka ovat olleet suurimmassa käytössä *P. falciparumin* vastaisessa rokotekehityksessä. PvCSP-rokote formuloituna AS01-adjuvantilla ei kuitenkaan tarjonnut steriiliä suojaa *P. vivax* -sporoosioitteja vastaan. *P. falciparumin* aiheuttamaa malariaa vastaan kehitetyn Pfs230D1-EPA:n kliinisen kehityksen perusteella *P. vivax* -ehdokkaas Pvs230D1-EPA:ta valmistetaan parhaillaan kokeita varten, jotka voivat alkaa vuonna 2021. (Duffy ja Gorres, 2020.)

P. vivaxia vastaan suunniteltujen verivaiheen rokotteiden tutkimus on keskittynyt Duffy Binding proteiiniin (PvDBP). PvDBP sitoutuu punasolujen pinnalla olevaan reseptoriin, ja sitä tarvitaan merotsoiittien tunkeutumisessa punasoluihin. Kaksi DBP-rokotekandidaattia, virusvektori101 ja rekombinanttiproteiinikandidaatti102, on suorittanut vaiheen I kokeet. Tulokset osoittivat, että molemmat ehdokkaat indusoivat funktionaalisia vasta-aineita *in vitro*-menetelmällä mitattuna. Rakennetutkimuksissa, joissa ihmisten vasta-ainetuotanto on aktivoitu rokotuksella tai luonnollisella *Plasmodium vivax* -altistuksella, on tunnistettu toiminnallisia ja ei-toiminnallisia epitooppeja, jotka tarjoavat perustan PvDBP-rokotekandidaattien suunnittelulle. Kuvassa 3 on esitetty malarialoisen elinkierto sekä kierron eri vaiheisiin kohdistuvat rokotekandidaatit. (Duffy ja Gorres, 2020.)



Kuva 3. Kuvassa on esitetty malarialoisen elinkiertoon kuuluvat vaiheet havainnollistamaan eri vaiheita, joilla on merkitystä malariarokotteen suunnittelussa ja sen kohdentamisessa. Sporotsoiitti-vaihe on useiden eri rokotteiden kohde, mukaan lukien RTS,S/AS01-rokotten. Pre-erytrocyttiseen vaiheeseen sisältyy myös maksavaihe, johon tavallisesti kohdistetaan vektoroituja rokotteita. Merotsoiitin antigeenit ovat useimmiten sisällytetty verivaiheen rokotteisiin. Gametosyyttejä vastaan kohdistetaan usein rokotteita, jotka estävät loisen leviämisen vektorin ja isännän välillä. Pre-erytrocyttiset rokotteet on tarkoitettu ehkäisemään malarian aiheuttamia infektoita ja sairauksia, kun taas verivaiheen loisia vastaan suunnitellut rokotteet on tarkoitettu ehkäisemään kliinisiä sairauksia ja kuolemia. (Duffy ja Gorres, 2020.) (Kuva lähteestä: <https://www.nature.com/articles/s41541-020-0196-3#citeas>).

4. RTS,S-rokote

Malariarokotteiden kehitys siirtyi uudelle aikakaudelle vuonna 2015, kun Euroopan lääkevirasto arvioi *Plasmodium falciparum* -malarialoisiota vastaan kehitetyn ehdokkaan RTS,S-rokotten. RTS,S otettiin käyttöön kansallisissa pilottihankeohjelmissa, mikä merkitsi sitä, että RTS,S oli ensimmäinen loisia vastaan valmistettu rokote, joka läpäisi valvonnan. Ensimmäiset RTS,S-rokotten testaukset alkoivat vuonna 1997 ja RTS,S-rokotetta on arvioitu

useissa kliinisissä tutkimuksissa. Samaan aikaan myös muiden pre-erytrosyyttisten ehdokkaiden testaus on lisääntynyt. (Dyffy ja Gorres, 2020.)

RTS,S on maailman edistynein malariarokotekandidaatti. Rokotteen tarkoituksena on tarjota suoja Saharan eteläpuolisen Afrikan malariaendeemisten alueiden lapsille ja vastasyntyneille *Plasmodium falciparum* aiheuttamaa malariaa vastaan. RTS,S-rokotekandidaatista on valmistunut Afrikassa äskettäin keskeinen, kolmannen vaiheen tehokkuustutkimus. Tarkoituksena on ollut kehittää rokote, joka on turvallinen ja tehokas. Tavoitteena on ottaa rokote käyttöön laajennettuun immunisaatio-ohjelmaan, jotta malariataudin riskiä voidaan vähentää merkittävästi ensimmäisten elinvuosien aikana. Kuten rokotteet yleensä, myös RTS,S pyrkii käynnistämään kehon oman immuunijärjestelmän taistelussa sairauksia vastaan, RTS,S-rokotteen kohdalla *Plasmodium falciparum* -loisen aiheuttamaa malariaa vastaan. RTS,S on suunniteltu estämään malariaparasitiin kypsyminen ja lisääntyminen maksassa. (Ballou, 2009.)

RTS,S-rokotteesta on tehty tutkimusta yli 4000 koehenkilöllä. Koehenkilöinä on ollut mukana sekä malariaa aikaisemmin sairastuneita henkilöitä, että sairastamattomia henkilöitä kaikista ikäryhmistä. Rokotetutkimukset ovat antaneet tuloksia, jotka ovat osoittaneet, että RTS,S on turvallinen ja hyvin siedetty kaikkien ikäryhmien keskuudessa. Jos rokotetutkimukseen on sisältynyt arviointia, ovat ne antaneet näyttöä suojaavasta tehosta. Vuoteen 2009 mennessä suurin osa rokotteen kliinisistä tutkimuksista on käyttänyt RTS,S/AS02 muunnelmaa, jossa adjuvanttina AS02 koostuu lipidiemulsiosta. Viime aikoina käyttöön on tullut myös RTS,S/AS01- muunnos, jonka on osoitettu indusoivan vielä suurempia vasta-ainemääriä sekä Th1-soluvälitteisiä vasteita *P. falciparum* circumsporotsoiittiproteiinia vastaan. RTS,S/AS01 on nykyisin johtava rokotekandidaatin muoto. (Ballou, 2009.)

RTS,S/AS01- ja RTS,S/AS02-rokotteissa RTS,S on yhdistettynä eri adjuvanttijärjestelmiin; RTS,S/AS01-rokotteessa adjuvanttina toimii AS01, kun taas RTS,S/AS02-rokotteessa adjuvanttina on AS02. Adjuvantit ovat aineita, joita käytetään parantamaan rokotteen immunogeenisuutta ja tehokkuutta. Adjuvantit parantavat antigeenin esittelyä antigeenispesifisille immuunipuolustuksen soluille tavoitteena saada aikaan pitkäaikainen suoja spesifisiä patogeenejä vastaan. On raportoitu, että molemmilla adjuvanttimuunnoksilla, RTS,S/AS01 ja RTS,S/AS02, rokotteen spesifiset immuunivasteet CSP:tä vastaan ovat parempia kuin ilman adjuvanttia toimivalla RTS,S-rokotteella. Tämän takia RTS,S-rokotekandidaatteihin ovat yleensä liitetty mukaan adjuvantti. Eläinkokeissa saadut tutkimukset osoittavat, että anti-CS-vasta-ainevaste RTS,S/AS01:lle oli paljon parempi kuin RTS,S/AS02:lle, mikä voi olla yksi syy siihen, että nykyään RTS,S/AS01 on paljon laajemmin käytetty kuin RTS,S/AS02. (Gu *et al*, 2019.)

4.1 RTS,S-rokotteen kehitys

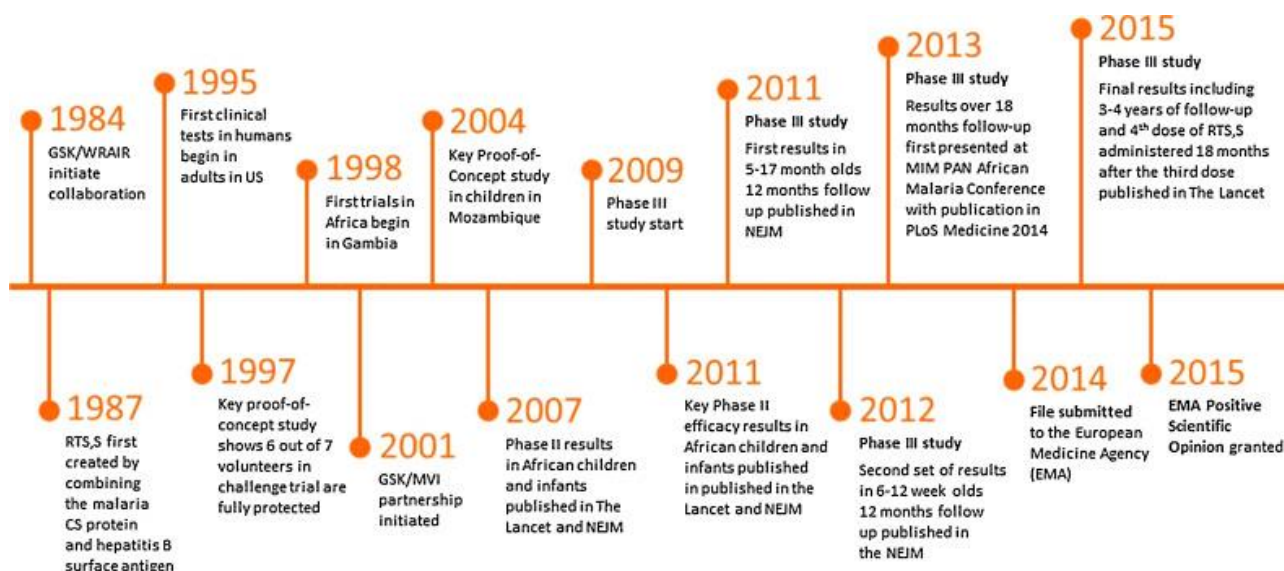
RTS,S-rokotteen kehittäminen oli looginen jatko yli vuosikymmenen kestäneelle tutkimukselle, joka perustui hypoteesiin, jonka mukaan CS-proteiiniin perustuva alayksikkörökote voisi tarjota suojan ihmisille malariainfektioita vastaan. Jo 1970-luvulla muun muassa Nussenzweigin laboratorio sekä useat muut tutkimusryhmät olivat osoittaneet, että säteilyllä heikennetyillä itiöillä aiheutettu immunisaatio voi tarjota täydellisen steriilin suojan malariaa vastaan ihmisillä ja eläimillä. Heikennettyihin itiöihin perustuva rokotteen kehittäminen sisälsi kuitenkin merkittäviä teknisiä, logistisia ja turvallisuushaasteita. (Ballou, 2009.)

Walter Reed Army Institute of Researchin (WRAIR) tutkijat käyttivät rokotteen kehittämisessä alayksikköön perustuvaa lähestymistapaa. Alayksikkörökotteeseen sisältyi yhden tai useamman tärkeän, malariaparasitiitista peräisin olevan suojaavan antigeenin eristäminen. Vuonna 1984 WRAIR ja SmithKline&Frenchin tutkijat työskentelivät yhteistyössä malarian alayksikkörokotteen kehittämiseksi. SmithKline&French on GlaxoSmithKline Biologicals -yrityksen edeltäjä. Yhteistyö on jatkunut tähän päivään saakka. (Ballou, 2009.)

Kehityksen perustana oli rokotekandidaatit, jotka ovat ensisijaisesti suunniteltu indusoimaan vasta-aineita CS:n toistuvia epitooppeja vastaan. Tehokkuustulokset seuraavien vuosien kliinisissä tutkimuksissa osoittivat vain 0–20 % tehokkuustuloksia, joten rokotesuunnitelmat, jotka perustuivat ainoastaan CS-toistoihin tai vaihtoehtoisesti ei-toistuviin reuna-alueisiin, eivät toimineet. (Ballou, 2009.)

RTS,S-rokote luotiin vuonna 1987 osana GlaxoSmithKlinen (GSK) ja Reed Army Institute of Researchin välistä yhteistyötä. Molempien tutkimusryhmien tavoitteena oli kehittää rokote, jonka perustana olivat tutkimukset säteilyn vaimentamien itiöiden estämisestä malariaa vastaan. Circumsporotsoiittiproteiini-antigeeni oli säteilyn vaimentamien itiöiden aikaansaaman immuunivasteen kohde. Proteiini kloonattiin ja sekvensoitiin Yhdysvaltojen Kansallisen Terveystieteiden instituutin ja WRAIR:n toimesta. Täysmittaisen CSP-antigeenin tuottaminen osoittautui tuolloin hankalaksi, joten tutkijat käyttivät GlaxoSmithKlinen Escherichia coli -valmistusjärjestelmää alayksikköantigeenin tuottamiseen. Alayksikköantigeeni perustui keskeiseen toistuvaan alueeseen. Neljän tutkitun antigeeniehdokkaan joukosta, yksi eteni kliinisen vaiheen testeihin. Ehdokasta testattiin ihmisillä, joilla oli kontrolloitu malariainfektio. Testi osoitti suojaa yhdellä vapaaehtoisella. (Laurens, 2019).

Vuonna 1987 tapahtui myös GSK:n malariarokoteohjelman siirtäminen Philadelphiasta rokotealalle Belgiaan. Missään aikaisemmissa CSP-pohjaisten rokotteiden kehityksissä, GSK:ssa tai muissa malariarokotteen kehitysohjelmissa, ei ollut käytetty hiukkasrakennetta. Vuonna 1988 julkaistiin ensimmäinen hiukkasrakenteisen CSP-pohjaisen rakenteen yksityiskohdat. Tätä seurasi myös ensimmäiset kliiniset tutkimukset, joissa käytettiin CSP-hepatiitti B-viruksen pinta-antigeenejä RTS,S-rokotekandidaatissa. Hiukkanen oli merkittävä askel eteenpäin aikaisempiin peptidirakenteisiin verrattuna, mutta myös uudet adjuvantit olivat tärkeässä roolissa. RTS,S-rokotekandidaatit, joissa käytettiin AS02-adjuvanttia, osoittautuivat altistumalleissa toistuvasti tehokkaiksi. RTS,S/AS02 oli GSK:n johtava ehdokas malariaa vastaan kehitetyistä rokotekandidaateista, kunnes vuonna 2009 RTS,S/AS01 valittiin vaiheen III tutkimukseen. RTS,S/AS01-rokotekandidaatti oli osoittanut altistustutkimuksissa parempaa kliinistä tehokkuutta ja parannettua immunogeenisuutta. RTS,S-rokotteen kehitys on toteutettu julkisen ja yksityisen sektorin kumppanuutena GSK:n ja PATH:n Malaria Vaccine Initiativen välillä vuodesta 2001 lähtien. Rokotteen kehitys on johtava esimerkki tämän tyyppisen julkisen ja yksityisen sektorin kumppanuudesta. Euroopan lääkeviraston (EMA) ihmisille tarkoitettuja lääkkeitä käsittelevä komitea (CHMP) antoi 23. heinäkuuta vuonna 2015 myönteisen tieteellisen lausunnon RTS,S-rokotteen käytölle. Kuvassa 4 on esitettyä RTS,S-rokotekehityksen tärkeimmät tapahtumat ja vuosiluvat. (WHO, 2015.)



Kuva 4. RTS,S-rokotteen kehityksen aikajana vuodesta 1984 lähtien, vuoteen 2015. Vuonna 1984 alkanut GlaxoSmithKlinen ja Walter Reed Army Institute of Researchin yhteistyö voidaan ajatella rokotteen kehityksen aloittavaksi tekijäksi. Vuonna 2001 GSK ja PATH Malaria vaccine Initiative aloittivat kumppanuuden. Vaiheen III kliininen tutkimus aloitettiin vuonna 2009 ja saatiin päätökseen vuonna 2014. Vuonna 2014 GSK myös toimitti hakemuksen Euroopan lääkevirastolle tarkistettavaksi ja Euroopan lääkeviraston Ihmisille tarkoitettuja lääkkeitä käsittelevä komitea antoi myönteisen lausunnon heinäkuussa 2015. (Biernaux ja Kaslow, 2015.)

(Kuva lähteestä: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15013377>)

4.1.1 RTS,S-rokotteen kehityksen vaikeudet

Malariarokotteiden kehitykselle on ominaista hitaus ja haastavuus. Malariaparasitiilla on monimutkainen elinkaari, mikä vaikeuttaa rokotteen kohdistamista tiettyyn antigeeniin. Malaria-tautiin johtavia biologisia mekanismeja ei ole vielä täysin ymmärretty, ja adjuvanttijärjestelmää ei ole saatu kehitettyä riittävän tehokkaaksi immunogeenisen vaikutuksen vahvistamiseksi. Biotekniikan, kuten genomiikan, proteomiikan ja bioinformatiikan nykyisin tapahtuva nopea kehitys auttaa malaria-antigeenien tutkimuksessa. Myös virusvektoreiden ja yhdistelmä-DNA-tekniikan käyttö on yleistynyt rokoteteknologiassa. Esimerkiksi hepatiitti B-virus ja simpanssin adeno-virus ovat toimineet vektoreina pre-erytrosyyttivaiheen ja verivaiheen rokotekandidaateissa. RTS,S/AS01-rokote on rekombinantti, hiivassa ilmentyvä alayksikkörokote, joka käyttää hepatiitti B:n pinta-antigeeniä matriisikantajana epitoopeille, jotka ovat peräisin *P. falciparumin* cirkumsporotsoiittiproteiineista. Sen adjuvanttijärjestelmää on muutettu useita kertoja tutkimusten prekliinisissä vaiheissa, ja lopulta identifioitiin muita immunogeenisempi muunnos AS01E, joka saa aikaan sekä soluvälitteisen, että humoraalisen immuniteetin aktivoitumisen.

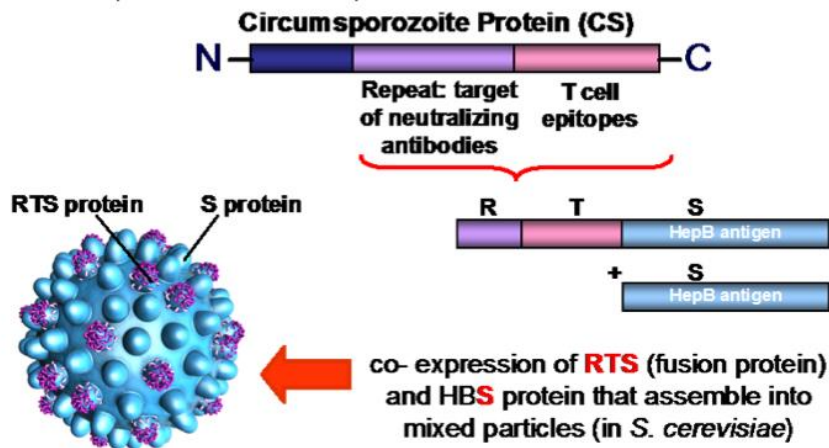
Uusien malariarokotteiden sekä niihin lisättyjen adjuvanttijärjestelmien on noudatettava WHO:n ohjeita. Näitä ohjeita noudattamalla voidaan varmistaa rokotekandidaattien laatu, turvallisuus ja tehokkuus. (Asante *et al*, 2015.)

Malariarokotteiden kehityksen vaikeuksiin liittyy myös kehitysprosessiin liittyvät suuret kustannukset. Tutkijoiden on haasteellista etsiä varoja tutkimusprojekteihin tai houkutella voittoa tuottavat lääkeyritykset investoimaan niihin. Toisen sukupolven rokotteen kehittämisessä rokotteen on osoitettava olevan tehokkaampia ja parempia kuin ensimmäisen sukupolven rokotteet. Rokotteiden erojen todistaminen edellyttää suuria näytekojoja ja kalliita kliinisiä tutkimuksia. (Asante *et al*, 2015.)

4.2 RTS,S:n rakenne

Rokotteelle annettu tieteellinen nimi RTS,S edustaa sen koostumusta. R kuvaa *Plasmodium falciparum* -circumsporotsoiittiproteiinin keskeistä toistuvaa aluetta, T kuvastaa C-terminaalisen alueen sisältämiä T-solun epitooppeja ja S tarkoittaa hepatiitti B:n pinta-antigeenia (HBsAg). RTS:ssä nämä kaikki on yhdistetty yhteen fuusioproteiiniin, joka ilmentyy hiivasoluissa vapaan HBsAg:n kanssa. RTS-fuusioproteiini ja vapaa S-proteiini muodostavat spontaanisti RTS,S-rakenteita lipoproteiinihiukkasiin. RTS,S/AS01- rokotteen AS01 kuvaa adjuvanttijärjestelmää. (Duffy ja Gorres, 2020.)

RTS,S on pre-erytrosyyttisen vaiheen yhdistelmäproteiinirokote. RTS,S koostuu hepatiitti B-pinta-antigeeniin fuusioituneesta *P.falciparum* circumsporotsoiittiproteiinin keskimmäisestä tandemtoistosta ja C-terminaaliosasta, ja se on ilmennetty hiivassa yhdessä fuusioimattoman hepatiitti B -pinta-antigeenin kanssa. RTS,S-partikkelit ovat viruksen kaltaisia partikkeleita ja ne muodostuvat, kun RTS-malaria-hepatiitti-B-fuusioproteiini ilmentyy yhdessä S-antigeenin kanssa yksin *Saccharomyces cerevisiae* -hiivasoluissa. Kuvassa 5 on esitetty viruksen kaltaisten partikkelien muodostuminen. (WHO, 2015.)

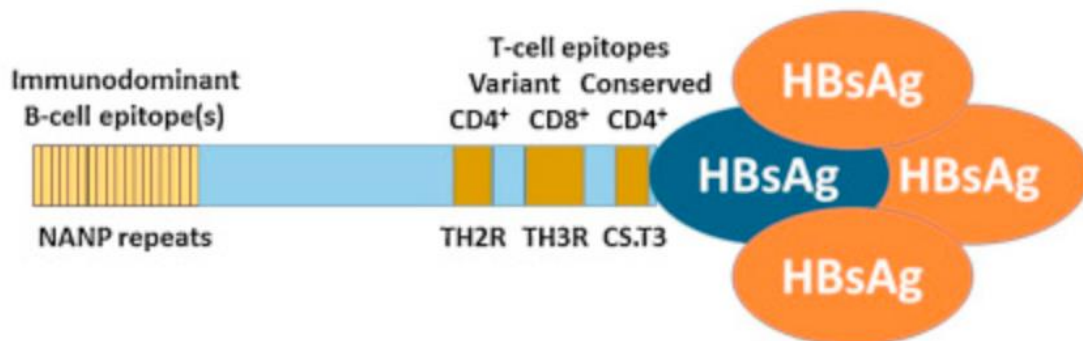


Kuva 5. RTS,S-hiukkaset koostuvat spontaanisti. RTS,S-antigeeni sisältää kaksi proteiinia; RTS,S- ja S-proteiinit, jotka siirtyvät spontaanisti lipoproteiinihiukkasten pinnalle ja muodostavat RTS,S-rakenteen (Duffy ja Gorres, 2020). (Kuva lähteestä: https://www.ema.europa.eu/en/documents/medicine-outside-eu/mosquirix-public-assessment-report_en.pdf).

RTS,S sisältää 189 yhteistä aminohappoa CSP:n kanssa, mukaan lukien viimeiset 18 NANP-toistoa ja C-terminaalisen pään ilman GPI-ankkurin lisäsekvenssiä. Noin 25 % hepatiitti B-viruksen pinta-antigeenin (HBsAg) monomeereista on RTS,S-partikkeleissa fuusioitu geneettisesti katkaistuun CSP:hen ja niiden tehtävä on toimia proteiininkantajina. RTS,S:n CSP-fragmentti sisältää kolme tunnettua T-soluepitooppia; erittäin vaihteleva CD4+T-soluepitooppi ennen TSP:n kaltaista domeenia (TH2R), erittäin vaihteleva CD8+T-soluepitooppi TSP:n kaltaisessa domeenissa (TH3R) ja konservoitunut universaali CD4+T-soluepitooppi (CS.T3) C-terminaalisisessa päässä. Ei-adjvanttinen RTS,S on heikosti immunogeeninen ja vaatii adjvantin CSP:n immuunivasteiden suuruuden ja keston parantamiseksi. Rokotteen kanssa käytetyimmät adjvantit ovat olleet AS01 ja AS02. AS01-adjvanttijärjestelmä koostuu kahdesta immunostimulaattorista, 3-O-desasyyli-4'-monofosforyylilipidi A:sta (MPL) ja QS-21 stimulon -adjvantista (QS-21) liposomiformulaatiossa. Kuvassa 6 on esitetty RTS,S-rokotteen rakenne. CSP:n rakenne on kuvattu tarkemmin kappaleessa 4.1. (Biernaux ja Kaslow, 2015.)

RTS,S-rokotteessa N-terminaalisen alueen puuttuminen ja CSP:n geneettinen monimuotoisuus ovat huomionarvoisia. Immuunivasteet CSP:n N-terminaalisiselle alueelle, joka sisältää kaksi toiminnallista domeenia on tunnistettu potentiaalisiksi kohteiksi suojaaville vasta-aineille. Vielä ei ole kuitenkaan tiedossa, estävätkö vasta-aineet, jotka kohdistuvat erityisesti CSP:n erittäin konservoituneeseen alueeseen I, loisten sitoutumista ja proteolyttistä jakautumista. Tutkimukset ovat osoittaneet että CSP:n N-terminaalisisella alueella näyttää olevan rajallinen

geneettinen monimuotisuus. Keskeisten toistuvien alueiden ja C-terminaalisen pään tiedetään olevan polymorfisia. (Biernaux ja Kaslow, 2015.)



Kuva 6. RTS,S-rokotteen rakenne. RTS,S-rokotteeseen sisältyvä CSP:n alue sisältää viimeiset 18 NANP-toistoa ja C-terminaalisen pään ilman GPI-ankkurin lisäyssekvenssiä. Hepatiitti B-viruksen pinta-antigeenin (HBsAg) monomeerit muodostuvat itsestään viruksen kaltaisiksi hiukkasiksi ja noin 25 % RTS,S:n sisältämistä HBsAg-monomeereista on geneettisesti fuusioitu katkaistuun CSP:hen ja toimii proteiininkantajina. RTS,S:n CSP-fragmentti sisältää kolme tunnettua T-soluepitooppia; erittäin vaihteleva CD4+T-soluepitooppi ennen TSP:n kaltaista domeenia (TH2R), erittäin vaihteleva CD8+T-soluepitooppi TSP:n kaltaisessa domeenissa (TH3R) ja konservoitunut universaali CD4+T-soluepitooppi (CS.T3) C-terminaalisisä päässä. (Biernaux ja Kaslow, 2015.) (Kuva lähteestä: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15013377>).

4.3 RTS,S-rokotteen toiminta

RTS,S-rokotteen toiminta perustuu *P. falciparum* -loisen elinkaaren pre-erytrosyyttiseen vaiheeseen. Tässä vaiheessa itiöt siirtyvät hyttysen pistoksen välityksellä ihmisiin ja ihmisessä laskimoverenkierron välityksellä maksaan. Sporotsoiitin pinta on päällystetty cirkumsporotsoiittiproteiineilla, joita loinen tarvitsee kehittymiseen tartunnan saaneissa hyttysissä sekä tartuttavuuteen ja hepatosyytteihin tunkeutumiseen. CSP:n rakenne koostuu immunogeenisestä keskitetystä alueesta, jota reunustavat kaksi konservoitunutta aluetta; N-terminaalinen domeeni ja C-terminaalinen α -trombospondiinitoisto (α TSR) -domeeni. CSP on ankkuroitu glykosyylifosfatidyli-inositoli (GPI) -ankkurilla sporotsoiittikalvoon. *P. falciparumin* 3D7-kannassa CSP:n toistuva alue koostuu neljästä NVDP- ja 38:sta NANP-toistosta. Tarkka lukumäärä voi vaihdella loisen kannasta riippuen ja myös rakenteen järjestys voi vaihdella. Ensimmäiset kolme NVDP-toistoa ovat siroteltuna kolmen ensimmäisen NANP-toiston välillä, kun taas neljäs NVDP-toistojakso sijaitsee ensimmäisen 20:n NANP-toiston jälkeen. (Emerling *at al*, 2017.)

CSP-rakenteeseen perustuvat rokotteet, mukaan lukien RTS,S-rokote, ovat keskittyneet ensisijaisesti näihin immunogeenisiin toistoihin. RTS,S-rokotteen rakenteessa on 19 NANP-toistoa ja C-terminaalinen α TSR- domeeni, ilman GPI ankkuria. Nämä rakenteet on fuusioitu hepatiitti B -viruksen pintaproteiineihin siten, että on saatu muodostumaan viruksen kaltaisia hiukkasia. Yhdistettynä adjuvanttiin AS01, pian rokotusten jälkeen on mahdollista saada erittäin vankat immuunivasteet toistuvaa aluetta vastaan vasta-ainepitoisuuksilla, jotka ovat yli 100 μ g/ml. Kliiniset tutkimukset ovat osoittaneet, että suoja on mahdollista parantaa muokkaamalla rokotteen annostusta ja antoaikataulua. (Emerling *et al*, 2017.)

5. CSP

Plasmodium falciparum -loisten pinnalla olevalla cirkumsporotsoiittiproteiinilla on tärkeä tehtävä loisten kehityksessä, liikkuvuudessa sekä hyökkäyksessä isäntäsoluun. CSP muodostaa suurimman osan itiön pintaproteiineista, ja saa aikaan tiheän proteiinerakenteen loisen pinnalle. CSP osallistuu useisiin kriittisiin rooleihin loisen kehityksessä naaraspuoleisissa hyttysissä ja nisäkäsissan tartuttamisessa. Vaikka CSP:n primaariset aminohapposekvenssit eroavat *P. falciparum* -kantojen välillä, perusrakenne on kuitenkin samanlainen. (Biernaux ja Kaslow, 2015.)

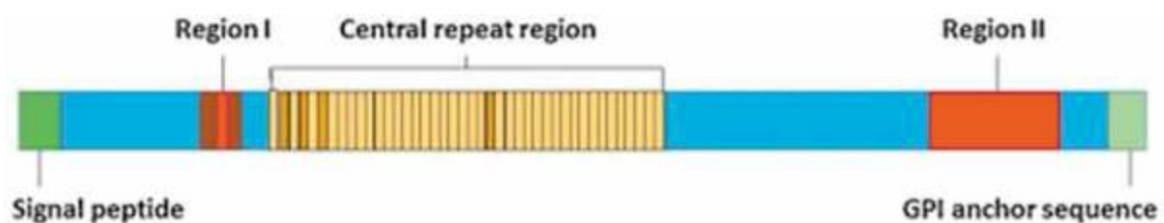
Edistynein malariarokotekandidaatti on CSP-pohjainen GSK:n RTS,S/AS01, joka koostuu 19:sta NANP-toistosta ja C-terminaalista α TSR:sta, jotka on liitetty hepatiitti B-viruksen pintaproteiiniin ja adjuvanttina toimii AS01. Toinen *P. falciparum* aiheuttamaa malariaa vastaan valmistettu rokote on Sanafia PfSPZ, joka sisältää heikennettyjä itiöitä. Molemmat rokotekandidaatit aiheuttavat tehokkaan vasta-aineiden tuoton CSP:tä vastaan. (Emerling *et al*, 2020.)

5.1 CSP:n rakenne

P. falciparum itiöt on päällystetty cirkumsporotsoiittiproteiinilla, joka on välttämätön sporotsoiittien kehittymiselle ja kulkeutumiselle tartunnan saaneissa hyttysissä sekä ihmisessä kulkeutumiseen hepatosyytteihin. CSP koostuu N-terminaalista domeenista, joka sisältää hepariinisulfaatin sitoutumiskohdan hepatosyytteihin tarttumista varten, keskeisen toistoalueen sekä C-terminaalisen α -trombospondiinitoiston, jota seuraa GPI-ankkuri. GPI-ankkurin tehtävänä on kiinnittää CSP sporotsoiitin kalvoon. (Emerling *et al*, 2020.)

N-terminaalinen pää koodaa myös signaalisekvenssin ja sisältää konservoituneen viiden aminohapon, lysiini-leusiini-lysiini-glutamiini-proliini (KLKQP), proteolyyttisen katkaisukohdesekvenssin sekä Pexel-motiivit. Keskimäinen osa sisältää lajispesifisiä aminohappojen toistoja, jotka ovat immunodominantteja B-soluepitooppeja. Ne myös edistävät sporotsoiitin kehittymistä hyttysessä. C-terminaalinen pää sisältää solun tarttuvuusominaisuuteen tarvittavan alueen II, jossa on trombospondiinin kaltaisen tyypin I toistodomeeni, kanonisen glykosyylifosfatidyli-inositolin ankkurin lisäyssekvenssin sekä kolme tunnettua T-soluepitooppia. T-soluepitoopit ovat erittäin vaihteleva CD4+T-soluepitooppi, joka sijaitsee ennen trombospondiinin kaltaista tyypin I domeenia, erittäin vaihteleva CD+8T-soluepitooppi, joka sijaitsee trombospondiinin kaltaisessa tyypin I domeenissa sekä litteä CD4+T-soluepitooppi, joka on erittäin konservoitunut ja säilynyt kaikkien loiskantojen joukossa. (Biernaux ja Kaslow, 2015.)

Plasmodium falciparum CSP:n rakenteessa oleva keskeinen toistoalue on erittäin immunogeeninen. Kaikissa *P. falciparum* -kannoissa CSP:n toistoalue koostuu yhdestä NPDP-toistosta, 3-5:stä NVDP-toistosta ja 35-41:stä NANP-toistosta. Esimerkiksi *P. falciparum* kannassa 3D7 toistojaksot esiintyvät suhteessa 1/3/38 NPDP/NVDP/NANP, mikä tarkoittaa, että keskeisellä toistojaksolla on yksi NPDP-toisto, kolme NVDP-toistoa ja 38 NANP-toistoa. Keskeinen toistuva alue alkaa liitännäisellä NPDP-sekvenssillä, jota seuraa tyypillisesti kolme NANP- ja NVDP-sekvenssien vuorottelu. Alue jatkuu jäljellä olevilla NANP-toistoilla. Useimmilla *P. falciparum* -kannoilla yksi NVDP on leikattu pitkän NANP-toistoalueen keskelle. Kuvassa 7 on näytetty circumsporotsoiittiproteiinin rakenne. (Emerling *et al*, 2020.)



Kuva 7. Circumsporotsoiittiproteiini (CSP) käsittää N-terminaalisen alueen, joka sisältää signaaliptidisekvenssin, sekä alueen I, joka sitoo hepariinisulfaattiproteoglykaaneja. Alueelle I on sisällytetty myös konservoituneen viiden aminohapon (KLKQP) proteolyyttisen pilkkoutumiskohdan sekvenssin sekä Pexel-motiivit. Keskellä oleva toistoalue sisältää neljän aminohapon (NANP/NVDP) toistoja. C-terminaalinen alue sisältää alueen II, joka on α -trombospondiinin kaltainen domeeni sekä kanonisen glykosyylifosfatidyli-inositolin (GPI) ankkurin lisäyssekvenssin. (Biernaux ja Kaslow, 2015.) (Kuva kohteesta: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15013377>).

5.1.1 NANP-vasta-aineet

Rakenteellisia ja biofysikaalisia tutkimuksia on viime aikoina käytetty CSP:n NANP-toistojaksoa vastaan suunnattujen vasta-aineiden tunnistamiseen ja molekyyliopohjan tutkimiseen. Vasta-aineet on saatu tutkimuksia varten yhdysvaltalaisilta vapaaehtoisilta, jotka on rokotettu RTS/S/AS01-rokotteella II:n vaiheen kliinisissä tutkimuksissa. Suojaavimmat vasta-aineet, jotka ovat tähän mennessä tunnistettu, ovat mAb317 ja mAb311. Muita suojaavia vasta-aineita ovat muun muassa mAbCIS43, mAb1210, mAb1450 ja mAbMGG4. Nämä vasta-aineet on löydetty tutkimuksissa, jotka on tehty PfSPZ-rokotteella yhdysvaltalaisien, saksalaisten ja afrikkalaisten vapaaehtoisten kanssa. MAbCIS43, mAbMGG4 ja mAb311 eivät ainoastaan sitoudu toistuviin NANP-peptideihin vaan pystyvät tunnistamaan myös ristireaktiot liitosepitoopin kanssa. Liitosepitooppi on N-terminaalisen domeenin ja keskeisen toistuvan alueen NANP:n välinen jakso, joka sisältää ainoan NPDP-sekvenssin. Useimpien näiden vasta-aineiden epitoopeilla on NPNA-motiivi, jossa on tyyppin I β -käännös. Tämä havaitaan myös vapaan NANP-peptidin kiderakenteessa ja sille on tunnusomaista proliinin (i+1) ϕ - ja ψ -kulmat asteilla -60° ja -30° ja asparagiinin (i+2) ϕ - ja ψ -kulmat asteilla -90° ja 0° vastaavasti. Poikkeuksena on mAb1450:n epitooppi, jossa ei ole erillisiä β -käännöksiä. Toinen käännös, joka usein havaitaan anti-CSP-vasta-aineiden NPNA-jaksoissa, on Asn-pseudo 310. Käännös tunnistettiin ensin mAb311-vasta-aineeseen sitoutuneessa NANP-toistojaksossa, ja se määriteltiin ensimmäisen Asn-tähteen 310-helix N-capin samankaltaisuuden perusteella. (Emerling *et al*, 2020.)

6. RTS,S/AS01

Ensimmäinen malariarokote, jossa käytettiin adjuvanttijärjestelmää, oli RTS,S/AS02-rokotecandidaatti, ja se sisälsi MPL-molekyyliä ja QS-21-molekyyliä yhdistettynä öljy-vesi-emulsiossa. Adjuvantin valintaa harkittiin kuitenkin uudelleen, kun vapaaehtoisilla aikuisilla ja lapsilla tehdyissä laajemmissa tutkimuksissa käytettiin AS02:n sijaan AS01-adjuvanttijärjestelmää, ja saatujen tulosten perusteella CD4⁺-T-soluvasteiden ja tehon huomattiin paranevan huomattavasti. (Collingnon *et al*, 2016.)

RTS,S/AS01-rokote, kaupalliselta nimeltä MosquirixTM, on nykyinen johtava rekombinanttikandidaattirokote *Plasmodium falciparum* aiheuttamaa malariaa vastaan. RTS,S on rokote, jossa on B- ja T-solujen epitoopeja R ja T, jotka on yhdistetty CSP:n C-

terminaaliseen päähän, hepatiitti B-viruksen kalvoproteiinia S ja vapaa proteiini S:ää. AS01 on adjuvanttisysteemi, joka tehostaa immuunisysteemin tuottamaa vastetta. Suojaavat immuunivasteet RTS,S/AS01-rokotteen jälkeen ovat ensisijaisesti riippuvaisia vasta-ainevasteista keskeistä toistuvaa aluetta vastaan. RTS,S/AS01-rokotetta, jonka on todettu antavan suojaa afrikkalaisille lapsille kliinistä ja vakavaa malariaa vastaan, on testattu vaiheen III tutkimuksessa ja se on saanut positiivisen arvosanan Euroopan lääkevirastolta. Rokotteen heikkoutuna on se, että se ei ole välttämättä tehokas *Plasmodium falciparum* eri muunnelmia vastaan. C-terminaalinen alue sisältää joitakin tärkeitä T-soluepitooppeja, jotka liittyvät CD4+T-soluvasteisiin. *P. falciparum* CSP-molekyylin (PfCSP) korkea geneettinen monimuotoisuus C-terminaalisisella alueella voi johtaa yleisen tehon puutteeseen. PfCSP:n C-terminaalisen alueen geneettisen monimuotoisuuden huomioiminen on tärkeää RTS,S/AS01-rokotteen kehittämisessä. (Gu *et al*, 2019.)

RTS,S/AS01 on ensimmäinen malariarokote, jota on testattu vaiheen III kliinisissä tutkimuksissa, ja ensimmäinen, joka on arvioitu rutiininomaisissa immunisointiohjelmissa malariaendeemisillä alueilla. Vaiheen III kliinisten tutkimusten antamat tulokset osoittavat, että 5-17-kuukauden ikäisille lapsille, joille annettiin neljä RTS,S/AS01-rokoteannosta, syntyi 36 % suojaa malariaa vastaan 4 vuoden ajalle. RTS,S/AS01-rokotteen on osoitettu tuottavan eniten hyötyä alueilla, joilla malarian tarttuminen on voimakasta. Ghanassa, Keniassa ja Malawissa on käynnissä RTS,S/AS01-pilottitutkimuksia, joissa käsitellään rokotteen kansanterveyden käyttöön liittyviä kysymyksiä. (Laurens, 2019.)

6.1 RTS,S/AS01-rokotteen rakenne

RTS,S/AS01-rokote koostuu RTS,S-osasta sekä AS01-adjuvantista. RTS,S sisältää 189 yhteistä aminohappoa CSP:n kanssa, mukaan lukien viimeiset 18 NANP-toistoa ja C-terminaalisen pään ilman GPI-ankkurin lisäyssekvenssiä. Noin 25 % hepatiitti B-viruksen pinta-antigeenin (HBsAg) monomeereista RTS,S-partikkeleissa on fuusioitu geneettisesti katkaistuun CSP:hen ja niiden tehtävä on toimia proteiininkantajina. Ei-adjuvanttinen RTS,S on heikosti immunogeeninen ja vaatii adjuvantin CSP:n immuunivasteiden suuruuden ja keston parantamiseksi. AS01-adjuvanttijärjestelmä koostuu kahdesta immunostimulaattorista, 3-O-desasyyli-4'-monofosoryylilipidi A:sta (MPL) ja QS-21 Stimulon-adjuvantista (QS-21) liposomiformulaatiossa. Viimeaikaiset tutkimukset viittaavat siihen, että yksi AS01:n toimintamekanismeista on stimuloida väliaikaisesti synnynnäisiä immuunijärjestelmää ja

aktivoida suuri määrä tehokkaita antigeeniä esitteleviä dendriittisoluja imusolmukkeissa. (Biernaux ja Kaslow, 2015.)

6.1.1 AS01-adjuvantti

Adjuvantit ovat aineita, joita käytetään parantamaan rokotteen immunogeenisuutta ja tehokkuutta. Adjuvantit parantavat antigeenin esittelyä antigeenispesifisille immuunipuolustuksen soluille tavoitteena saada aikaan pitkäaikainen suoja spesifisiä patogeenejä vastaan. Adjuvantteja on käytetty rokotteissa jo yli 90 vuotta. Adjuvanttiaineissa, kuten AS01:ssä, immnostimulaattoristen molekyylien yhdistelmät ovat mahdollistaneet uusien tehokkaampien rokotteiden kehittämisen. (Collingnon *et al*, 2016.)

AS01-adjuvantti on liposomipohjainen rokotteen adjuvanttijärjestelmä, joka sisältää kaksi immunostimulaattorina toimivaa molekyyliä, 3-O-desasyyli-4'-monofosforyylilipidi A:n (MPL) ja saponiini QS-21:n. AS01:n vaikutusten on tutkittu olevan nopeita ja ohimeneviä, ja ne lokalisoituvat injektoituun lihakseen. AS01 on tehokas CD4+T-soluvälitteisten immuunivasteiden edistämässä, ja tutkimukset ovat osoittaneet adjuvantin olevan sopiva kandidaattiehdokas viruksia tai solun sisäisiä patogeeneja vastaan kohdistuviin rokotteisiin. (Collingnon *et al*, 2016.)

MPL on *Salmonella minnesotasta* peräisin oleva lipopolysakkaridin detoksifioitu johdannainen, ja se stimuloi synnynnäisen immunitietin aktivaatiota toll-like-reseptorien (TLR4) kautta. MPL stimuloi suoraan antigeeniä esitteleviä soluja, joiden pinnalla on ekspressoitu TLR4-molekyylejä. Nämä solut stimuloivat sytokiinien sekä rinnakkaisstimulaattorimolekyylien tuotantoa. Hiirillä tehdyistä kokeista on selvinnyt, että MPL suosii antigeenispesifisten T-solujen induktiota tuottamaan interferoni (INF)- gammaa sekä vasta-aineisotyyppien siirtymistä kohti IgG2a/C-vasta-aineita. (Collingnon *et al*, 2016.)

QS-21 on saponiinimolekyyli, joka saadaan Etelä-Amerikasta, Quillaja Molina-puun kuoresta. QS-21 toimintaan kuuluu antigeenispesifisten vasta-aineiden tehokkuuden edistäminen, mutta se stimuloi myös sytotoksisia CD8+T-soluja, erityisesti muissa kuin ihmislajeissa. Toisin kuin MPL:n, QS-21:n laukaisemia signaalintireittejä ei vielä täysin ymmärretä. QS-21-molekyyli on vesiliukoinen triterpeeniglykosidi, jolla on amfifiilinen luonne, ja joka tunnetaan hemolyyttisestä aktiivisuudestaan. Hemolyyttinen aktiivisuus voidaan poistaa liposomeissa tapahtuvassa formuloinnissa, kun kolesterolia on läsnä. Hemolyyttinen aktiivisuus on poistettu tällä tavoin adjuvantista AS01. Äskettäiset tutkimukset ovat antaneet viitteitä siitä, että QS-21

aktivoi spesifisiä synnynnäisiä reittejä monosyyteissä, mutta tämän reitin kokeellinen määrittäminen *in vivo* on vielä kesken. (Collingnon *et al*, 2016.)

6.2 RTS,S/AS01-rokotteen toimintamekanismi

Useista tutkimuksista saatavilla oleva näyttö RTS,S/AS01-rokotteen suojausmekanismista tukee IgG:n kriittistä roolia CSP:n toistosekvenssiä vastaan infektion torjunnassa. Näitä tutkimuksia ovat muun muassa kliiniset altistustutkimukset Yhdysvalloissa sekä aikuisten ja lasten pediatriiset kenttätutkimukset ikäryhmittäin Gambian, Kenian, Tansanian ja Mosambikin alueilla. Kun malarialoisoita kantava hyttynen imee verta ihmisestä, itiöt kerrostuvat ihonsisälle ja kulkeutuvat useita tunteja ennen ihon verisuonistoon tai imukudokseen pääsemistä. Jotkin itiöt saattavat kulkeutua suoraan verisuonistoon hyttysenpiston aikana. Anti-CSP-vasta-aineiden on osoitettu vähentävän sporotsoiittien määrää, jotka pääsevät tunkeutumaan ihon verisuonistoon. Tällöin myös maksaan kulkeutuvien itiöiden määrä vähenee. Millään vasta-ainearvolla ei ole todistettu saavutettavan täydellistä suojaa infektiota vastaan mutta tutkimusten tulokset osoittavat, että korkeammilla IgG-pitoisuuksilla malaraiinfektion riski pienenee. Huomioitavaa on, että vasta-ainepitoisuudet neljännen rokoteannoksen jälkeen eivät saavuta kolmen ensimmäisen annoksen jälkeen havaittuja pitoisuuksia, mikä huomataan myös rokotteen antaman tehon yhteydessä; rokotteen teho ei ole yhtä korkea neljännen rokoteannoksen jälkeen, kuin kolmen ensimmäisen rokoteannoksen seurauksena. Syytä tähän ei ole kuitenkaan täysin ymmärretty. Yhden hypoteesin mukaan kolmen ensimmäisen rokoteannoksen indusoimat korkeat vasta-ainepitoisuudet häiritsevät anti-CS-immunogeenisuuden myöhempää induktiota. Toinen hypoteesi, jota pidetään todennäköisempänä on se, että lisääntyvä altistuminen CS-antigeenille, joko toistuvien malaraiinfektioiden tai rokotusten kautta, johtaa B-solujen hyporesposiivisuuteen. Tämä ilmiö on huomattu myös meningokokki- ja pneumokokkipolysakkaridirokotteille, ja se heijastaa sitä, että toistuvaan antigeenialtistukseen reagoidaan pienemmällä määrällä antigeenispesifisten B-solujen rekrytointia ja erilaistumista haluttujen vasteiden saavuttamiseksi. (WHO, 2015.)

6.3 RTS,S/AS01-rokotteen immunogeenisuus

RTS,S-rokotteen immunogeenisuusprofiilia on tutkittu laajasti. Tutkimuksien tavoitteena on ollut korreloida rokotteen immunogeenisuus sen antaman suojan kanssa. Anti-CSP-vasta-aineet NANP-toistuvaa aluetta vastaan, ja niiden suurentuneet konsentraatiot ja vasteet ovat korreloineet kliinisen malarian pienentyneen riskin kanssa, mutta sellaista kynnyksarvoa, joka määrittää suojan ei ole vielä vahvistettu. CD4+T-soluvasteiden on tutkittu lisääntyvän myös RTS,S/SA01-rokotteen aiheuttaman immunisaation jälkeen. Tämä on mahdollisesti liitettävissä suojaukseen. Immunogeenisuuden tutkimusta on laajennettu myös haavoittuviin ryhmiin, kuten lapsiin, joilla on HIV-tartunta. Keniassa tehdyssä RTS,S/AS01-rokotteen tutkimuksessa oli osana myös WHO:n luokittelussa tason 1 ja 2 HIV:tä sairastavia lapsia. Anti-CSP-vasta-aineiden pitoisuus oli keskimäärin suurempi rokotetulla ryhmällä kuin kontrolliryhmällä kuukausi rokotteen antamisen jälkeen; 329,2 EU/ml vs. 0,3 EU/ml. HIV:tä sairastaville lapsille tehdyssä tutkimuksessa RTS,S-rokotteen saaneissa ryhmissä esiintyi vähemmän kliinistä malariaa, vakavaa malariaa, sairaalahoitoa tarvitsevaa malariaa sekä anemiaa kuin kontrolliryhmällä, mutta erot eivät olleet niin merkittäviä, että tutkimuksessa olisi katsottu olevan vaikutusta näihin lopputuloksiin. (Laurens, 2019.)

Rokotteen vaiheen III kliinisessä tutkimuksessa saatiin osoitus siitä, että rokote aiheutti suuremman immunogeenisuuden vanhemmilla lapsilla verrattuna vastasyntyneisiin. 5–17 kuukauden ikäisten lasten ryhmässä, jolle annettiin rokotteen tehosteannos, vasta-ainepitoisuudeksi mitattiin 318,2 EU/ml kuukauden kuluttua tehosteannoksen antamisesta. Saman ikäryhmän lapsilla, joille ei annettu tehosteannosta, vasta-ainepitoisuudet olivat vain 34,2 EU/ml samalla aikavälillä mitattuna. Vuosi viimeisen annoksen antamisen jälkeen suoritettussa mittauksessa vasta-ainepitoisuudet olivat laskeneet tehosteannoksen saaneella ryhmällä arvoon 52,4 EU/ml ja verrokkiryhmällä arvoon 19,3 EU/ml. 6–12 viikon ikäisten ryhmässä anti-CSP-vasta-ainepitoisuudet nousivat arvoon 169,9 EU/ml kuukauden kuluttua tehosterokotuksesta, ja saman ikäisten ryhmällä, joille ei annettu tehosterokotetta arvo oli 6,2 EU/ml. Vuoden päästä suoritettussa mittauksessa vasta-ainepitoisuudet laskivat arvoihin 15,9 EU/ml ja 3,7 EU/ml. (Laurens, 2019.)

6.4 RTS,S/AS01-rokotteen valmistus

RTS,S-antigeenin tuottajan toimii GSK Biologicals SA. GlaxoSmithKline Biologicals SA tutkii, kehittää ja valmistaa lääketuotteita. Puhdistetun antigeenin tuotanto on jatkuva prosessi, joka alkaa rekombinanttisen *Saccharomyces cerevisiae* RIX4397 -hiivakannan fermentaatiolla solupankkijärjestelmästä. Tätä seuraa hiivasolujen kerääminen, hajottaminen, uutto ja puhdistus. Puhdistusprosessiin sisältyy erityyppisiä kromatografisia menetelmiä, ultrasentrifugointia sekä suodatusta. RTS,S:n varastointi tapahtuu steriileissä astioissa, joissa lämpötila on -70 celsius astetta. Yhdellä fermentaatiolla tuotetaan yksi ainut käymisliemi, josta suoritetaan yksi ainoa uutto. Lopputuloksena saadaan yksi puhdistettu RTS,S-antigeenierä, jota ei sekoiteta muihin eriin missään tuotannon vaiheissa. Valmistusprosessiin liittyy valvontaa tuotteen puhtauden, saannon ja eheyden seuraamiseksi. Prosessin validointiin sisältyy kriittisten valmistusparametrien tunnistus ja validointi sekä prosessin johdonmukaisuuden osoitus vähintään 3:lle peräkkäiselle valmistuserälle. Julkaistut tiedot sisältävät visuaalisen ulkonäön, pH:n, identiteetin, antigeenien aktiivisuuden, puhtauden ja proteiinipitoisuuden S:n ja RTS:n suhteen, endotoksiinien steriiliyden, koon jakautumisprofiilin, lipidipitoisuuden sekä polysakkaridipitoisuuden. RTS,S-teho mitataan sieppausvasta-aineella, ELISA:lla, joka on suunnattu viruksen kaltaisten partikkelien CS (RT)- osaa vastaan sekä määrittämällä vasta-aineiden nousu S-proteiinia vastaan. (Laurens, 2019.)

AS01- adjuvanttijärjestelmä on muodostettu GSK Biologicalsissa. Valmistusprosessi sisältää konsentroidun liposomimassan välituotteen ja PO₄/NaCl-puskurin sekoittamisen keskenään. Tämän jälkeen lisätään nestemäinen QS-21-massa. Lisäysten jälkeen suoritetaan pH:n tarkastus sekä steriili suodatus ja adjuvantti täytetään lopullisiin astioihin. (Laurens, 2019.)

Käyttövalmis RTS,S/AS01-rokote on säilöntäaineeton injektioneste, joka väriltään opaalinhohtoinen, väritön tai vaaleanruskea. Rokote koostuu kahdesta osasta. Ensimmäinen osa on jauhe tai lyosifilisoitu muoto, joka sisältää RTS,S-valmistetta. Tuote on esitetty 3 ml:n lasipullossa, joka on suljettu kumitulpilla sekä alumiinikorkilla. 3 ml:n lasipullo sisältää 2 annosta RTS,S-antigeeniä. Toinen osa rokotetta on nestesuspensio AS01-adjuvanttijärjestelmää. Kuten RTS,S- valmiste, myös AS01 on pakattu 3 ml lasipulloon, joka on suljettu kumitulpilla ja alumiinikorkilla. 3 ml:n pullo sisältää 2 annosta AS01-adjuvanttijärjestelmää. Yksi pullo rokotetta tuottaa 2 annosta valmista rokotetta lihaksensisäiseen injektioon. (Laurens, 2019.)

7. RTS,S/AS01-rokotteen vaiheen III tutkimus

Vaiheen 3 tehokkuus- ja turvallisuustutkimus tehtiin 11 tutkimuskohteessa, 7:ssä eri Afrikan valtiossa, joissa oli erilaiset malarian leviämisesiteetit ja -mallit. Kohteet olivat Burkina Fasossa, Gabonissa, Ghanassa, Keniassa, Malawissa, Mosambikissa ja Tansaniassa. Tutkimukseen osallistujat olivat 5–17 kuukauden ikäisiä lapsia sekä 6–12 viikon ikäisiä vastasyntyneitä ensimmäisen rokotuksen aikaan. Tutkimuksen toteuttivat johtavat afrikkalaiset tutkimuskeskukset sekä joissain tapauksissa myös heidän pohjoismaiset kumppaninsa yhdessä GSK:n ja PATH Malaria Vaccine Initiativen kanssa. Tutkimuskeskusten valinta perustui keskusten kliinisten tutkimusten tuloksiin, vahvoihin yhteisösuhteisiin sekä sitoutumiseen korkeimpien kansainvälisten eettisten, lääketieteellisten, kliinisten ja säätelystandardien noudattamiseen. (MVI, 2016.)

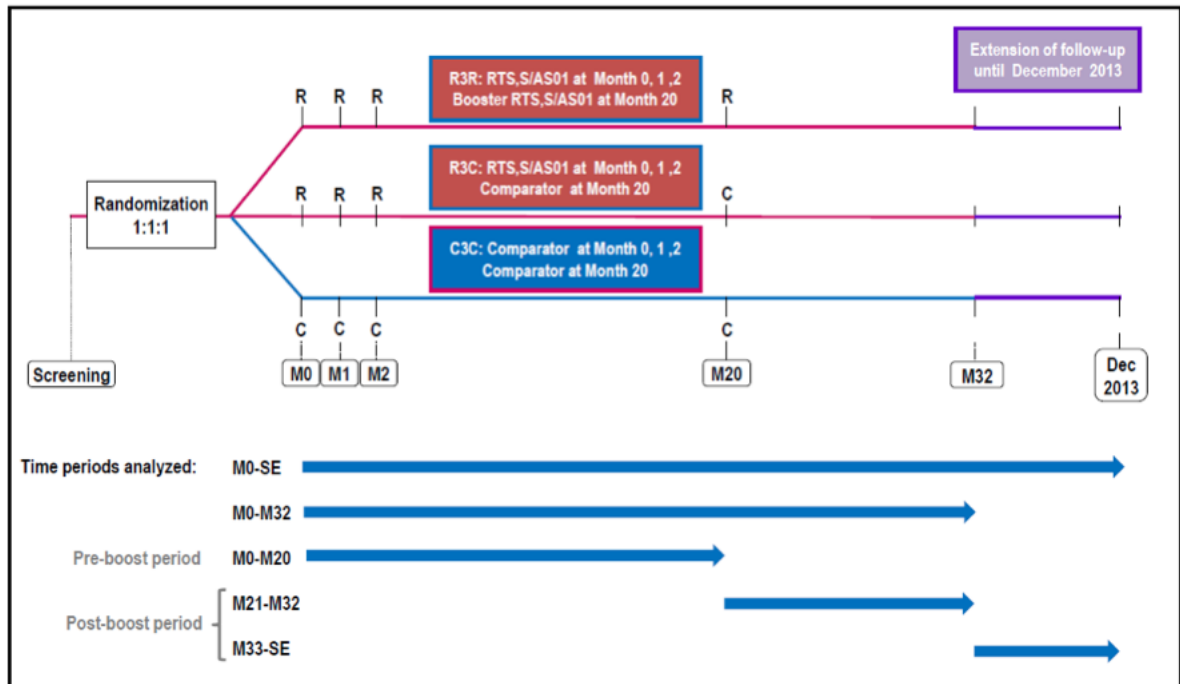
P. falciparum -loisen aiheuttamia malariatapauksia ja -kuolemia todetaan eniten Saharan eteläpuolisessa Afrikassa alle viiden vuoden ikäisten lasten keskuudessa. Tästä johtuen vastasyntyneille ja pikkulapsille kehitettävän RTS,S-rokotekandidaatin tutkimus painottuu näille alueille. Rokotteen tarjoaman tehon tutkimista varten on tarpeen rokottaa lapset, jotka ovat vaarassa altistua malariainfektiolle ja seurata heitä, jotta nähdään, kehittykö sairautta. (MVI, 2016.)

Tutkimuksen lopputulokset näyttivät, että kliiniset malariainfektiot vähenivät noin 36 % pienillä lapsilla ja 26 % vastasyntyneillä, jotka saivat 4 rokoteannosta. RTS,S/AS01-rokotteen tehon todettiin heikkenevän ajan myötä (Duffy ja Gorres, 2020).

7.1 Tutkimuksen toteutus

RTS,S/AS01-rokote eteni vaiheen III testaukseen vuosina 2009-2014 seitsemässä Saharan eteläpuolisen Afrikan valtiossa. 11 kohdetta osallistui tutkimukseen seitsemässä eri valtiossa; Burkina Faso (Nanoro), Gabon (Lambarene), Ghana (Kintampo ja Agogo), Kenia (Kilifi, Kombewa ja Siaya), Malawi (Lilongwe), Mosambik (Manhica) ja Tansania (Bagamoyo ja Korogwe). Tutkimukseen osallistui 15459 osallistujaa, joista 8922 oli 5–17 kuukauden ikäisiä lapsia ja 6537 6–12 viikon ikäisiä vastasyntyneitä. Osallistujat valittiin toukokuun 2009 ja helmikuun 2011 välisenä aikana. Kokeeseen pyrittiin valitsemaan henkilöitä, jotka edustivat kohderyhmää mahdollisimman kattavasti. Mukaan otettiin alhaisen syntymäpainon omaavia lapsia, aliravittuja lapsia sekä HIV-tartunnan saaneita lapsia, joiden tila ei ollut kliinisesti huono. Kaikkia kokeeseen osallistuneita henkilöitä ei tutkittu järjestelmällisesti HIV-infektion

varalta, mutta jotkin tutkimuskohteista sijaitsivat alueilla, joilla HIV oli hyvin yleistä. Valitut koehenkilöt jaettiin kolmeen ryhmään satunnaisesti ensimmäisen rokotuksen yhteydessä suhteessa 1:1:1. Ensimmäisen ryhmän jäsenet saivat kontrollirokotteen (C3C), toisen ryhmän jäsenet saivat kolme annosta RTS,S/AS01-rokotetta sekä kontrollirokotteen (R3C) 20 kuukauden kohdalla ja kolmannen ryhmän jäsenet saivat kolme annosta RTS,S/AS01-rokotetta sekä neljännen annoksen 20 kuukauden kohdalla. Kontrollirokotteinä toimivat solukkoviljelmän vesikauhurokote, joka annettiin 5–17 kuukauden ikäisille ensimmäisen kolmen annoksen kohdalla sekä meningokokki-seroryhmän C konjugaattirokote, joka annettiin 6–12 viikon ikäisille kolmen ensimmäisen annoksen yhteydessä ja molemmille ikäryhmille neljännen annoksen yhteydessä. 6-12 viikon ikäisille koehenkilöille annettiin kolmen ensimmäisen RTS,S- ja kontrollirokotteen yhteydessä DTPwHepB/Hib + OPV rokotteen ja neljännen annoksen aikana ainoastaan OPV rokote RTS,S- ja kontrollirokotteen sijaan. Kuvassa 8 on esitetty vaiheen III kokeen eteneminen kaavion avulla. (WHO, 2015.) Tutkimuksen toteutus tapahtui kaksoissokkoutetulla tavalla niin, että kokeeseen osallistujilla, eikä ensisijaisesti koetta toteuttavilla henkilöillä ollut tietoa ryhmien jaottelusta. Rokote annettiin lihaksensisäisenä injektiona. Tutkimus- ja kontrollirokotteen erosiivä ulkonäöltään, joten rokotteen antanut tutkimushenkilö oli tietoinen hoidon kohdentamisesta mutta sokkoutumattomilla rokotajilla ei ollut muuta osaa tutkimuksessa. Tutkimuksen toteutus tapahtui kahdessa vaiheessa; Kaksoissokkoutettu vaihe kuukausina 0–32 sekä jatkovaihe kuukaudesta 33 lähtien tutkimuksen päättymiseen. Koe oli alun perin suunniteltu siten, että osallistujia tullaan seuraamaan 32 kuukauden ajan, mutta sitä muutettiin myöhemmin siten, että kaikkia osallistujia seurattiin vuoden 2013 joulukuun 31. päivään asti. 6–12 viikon ikäisiä lapsien seuranta tapahtui 38 kuukauden välein ja 5–17 kuukauden ikäisillä lapsia 48 kuukauden välein. Kolmannen vaiheen tutkimuksen tavoitteena oli ensisijaisesti arvioida RTS,S/AS01-rokotteen tehoa seurantajakson aikana kahdessa eri ikäluokassa. Toissijaisena tavoitteena tutkimuksessa oli RTS,S/AS01:n tehosteannoksen toimivuuden arviointi 12 kuukauden seurantajakson aikana. Lisäanalyysit, joita tehtiin tutkimuksen jatkovaiheen lopussa, sisälsivät tehokkuuden tarkastelua kliinistä malariaa vastaan koko seuranta-ajan loppuun saakka. (Laurens, 2019.)



Kuva 8. Vaiheen III kokeen malli. Ensimmäisessä rokotuksen aikana tapahtui koehenkilöiden jakaminen satunnaisesti kolmeen ryhmään suhteessa 1:1:1. Ensimmäisen ryhmän jäsenet saivat kontrollirokotteen (C3C), toisen ryhmän jäsenet saivat kolme annosta RTS,S/AS01-rokotetta sekä kontrollirokotteen (R3C) 20 kuukauden kohdalla ja kolmannen ryhmän jäsenet saivat kolme annosta RTS,S/AS01-rokotetta sekä neljännen annoksen 20 kuukauden kohdalla. Kuvan alaosassa on esitetty tutkimuksen seuranta-ajat. (Laurens, 2019.) (Kuva lähteestä: https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2015/october/1_Final_malaria_vaccine_background_paper_v2015_09_30.pdf?ua=1).

7.2 Tutkimuksen tulokset

Vaiheen III tutkimus tehtiin kahdessa vaiheessa; kaksoissokkoutettu vaihe 0–32 kuukauden aikana ja jatkovaihe kuukaudesta 33 tutkimuksen loppuun. Tutkimuksen ensisijaisena tavoitteena oli arvioida RTS,S/AS01-rokotteen kolmen annoksen tehoa kliinistä malariaa vastaan 12 kuukauden seurannassa ja kahdessa eri ikäluokassa. Tutkimuksen toissijainen tavoite oli kuvata rokotteen turvallisuutta ja immunogeenisuutta, arvioida rokotekandidaatin tehokkuutta muihin julkisen terveydenhuollon kannalta tärkeisiin tapahtumiin esimerkiksi malarian sairaalahoitoon, ja arvioida 20. kuukauden kohdalla annettua tehosteannosta 12 kuukauden seurantajaksolla. Seuranta-aikaan pidennettiin, ja tämän ajan lopussa tehtiin lisäanalyysi, joka sisälsi turvallisuuden ja tehon arvioinnin kliinistä malariaa, vakavaa malariaa ja yleistä parasitemiaa kohtaan. (Biernaux ja Kaslow, 2015.)

Vaiheen III tutkimuksen ensisijainen tavoite protokollakohtaisessa populaatiossa, kuukausien 2,5-14 seurantajakson aikana, saadaan käyttämällä negatiivista binomiregressiomallia, ja määrittämällä sen avulla RTS,S/AS01-rokotteen teho suhteessa ensimmäiseen tai ainoaan malariajaksoon, joka täyttää kliinisen malarian tapauksen määritelmän. 5–17 kuukauden ikäisten lasten ryhmälle laskettu arvo oli 55,8 %. 97,5 %:n luottamusväli vaihteli välillä 50,6 % (alaraja) ja 60,4 % (yläraja) ja p-arvo oli >0,0001. 6-12 viikon ikäisten vastasyntyneiden ryhmässä RTS,S/AS01-rokotteen teho laskettiin samalla tavalla käyttäen negatiivista binomiregressiomallia, ja RTS,S/AS01-rokotteen tehoksi suhteessa ensimmäiseen tai ainoaan malariajaksoon, joka täyttää kliinisen malarian tapauksen määritelmän, saatiin 31,3 %. 97,5 %:n luottamusväli vaihteli välillä 23,6 % (alaraja) ja 38,3 % (yläraja) ja p-arvoksi määritettiin <0,0001. Kuvassa 9 on esitetty rokotteen teho ja vaikutus kliinistä malariaa vastaan tutkimuksen lopussa. (Biernaux ja Kaslow, 2015.)

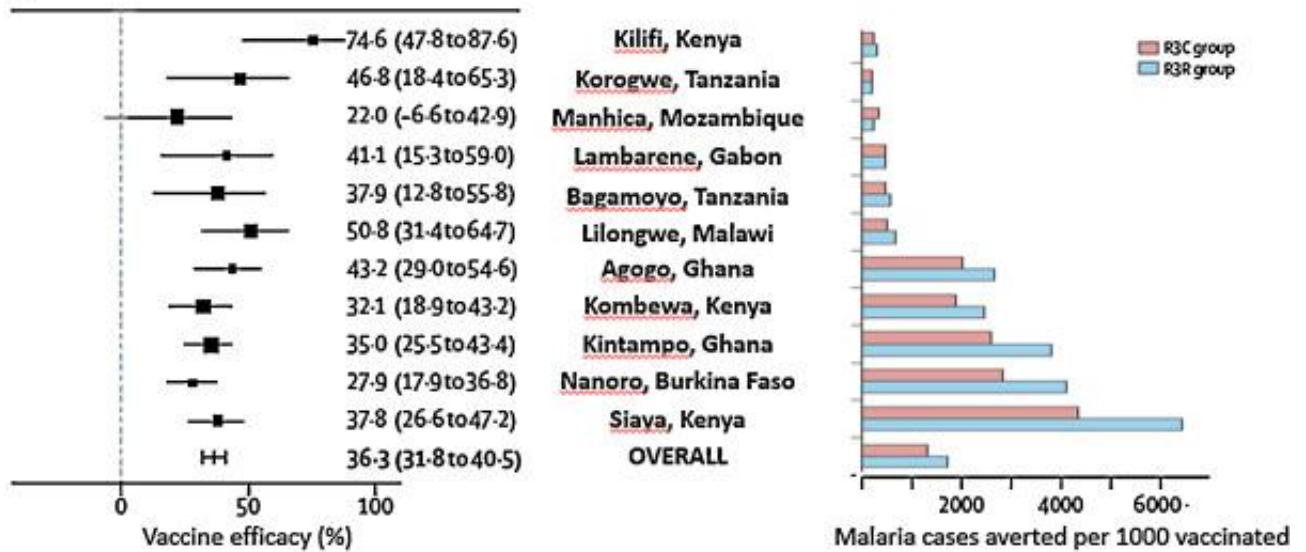
Kun otettiin huomioon vaiheen III tutkimuksen toissijaiset tavoitteet ennen neljättä eli tehosterokoteannosta, huomattiin useita tuloksia; rokotteen tehokkuus ja immunogeenisuus olivat pienempiä vastasyntyneillä kuin lapsilla, rokotteiden tehokkuudessa havaittiin heikkenemistä ajan myötä kummassakin ikäluokassa, mutta siitä huolimatta, että rokotteiden teho heikkeni, kansanterveysvaikutukset, jotka ilmoitettiin kliinisen malarian, vakavan malarian ja kaikkien sairaalahoitotapausten määrinä tuhatta rokotettua henkilöä kohden, olivat merkittäviä erityisesti vanhemmassa ikäryhmässä ja korkean tautitaakan yhteydessä. Kuumeikouristusten riski lisääntyi 7 päivän kuluessa RTS,S/AS01-rokotteen antamisesta yli 5 kuukauden ikäisillä lapsilla ja aivokalvontulehduksen raportoitiin lisääntyvän merkittävästi RTS,S-rokotteella rokotettujen ryhmien keskuudessa verrattuna kontrollirokotteen saaneisiin ryhmiin. (Biernaux ja Kaslow, 2015.)

Lopulliset tulokset, jotka sisältävät myös RTS,S/AS01-rokotteen tehosteannoksen, RTS,S/AS01:n tehon vaikutuksen, immunogeenisuuden ja turvallisuuden ensimmäisestä rokotuksesta tutkimuksen loppuun saakka, sisältävät useita havaintoja. Neljäs annos näytti palauttavan ja ylläpitävän rokotteen tehoa; rokotteen teho oli kuukaudesta 0 tutkimuksen loppuun 36,3 % (95 %:n luottamusväli vaihteli välillä 31,8 % - 40,5 %) kaikkia kliinisen malarian tapauksia kohtaan ja 32,2 % (95 %:n luottamusväli vaihteli välillä 13,7 % - 46,9 %) kaikkia vaikean malarian tapauksia vastaan. Vastaavasti vanhemmassa ikäluokassa rokotteen teho oli 25,9 % (95 %:n luottamusväli vaihteli välillä 19,9 % - 31,5 %) ja nuoremmissa ikäluokassa 17,3 % (95 %:n luottamusväli vaihteli välillä 9,4 % - 37,5 %). Ilman tehosteannosta, rokotteen teho kliinistä malariaa vastaan heikkeni molemmissa ikäryhmissä, ja vanhemmissa ikäluokissa rokotteen teho vakavaa malariaa vastaan oli merkityksetön koko tutkimusjakson

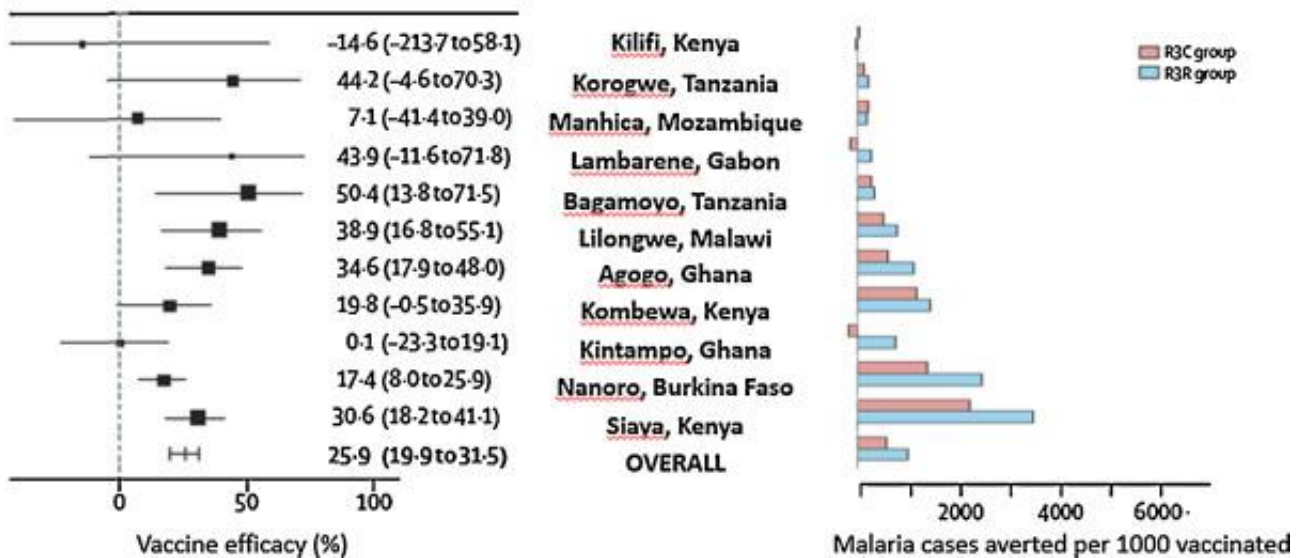
ajan. Itse asiassa vakavan malarian ilmaantuvuus kuukaudesta 21 tutkimuksen loppuun oli merkittävästi korkeampi kuin kontrolliryhmällä. Rokotteen teho vakavaa malariaa vastaan oli 1,1 % (95 %:n luottamusväli vaihteli -23,0 % - 20,5 % välillä). Tehokkuuden heikkenemisestä huolimatta vältettyjen kliinisten malariatapausten määrä kasvoi edelleen sekä vanhemmissa, että nuoremmissa ikäryhmissä, jolle annettiin neljäs annos rokotetta. Vaikutus oli suurempi paikoissa, joissa malariaesiintyvyys oli suurempaa. Vaikka RTS,S/AS01-rokotteen tehosteannoksen antaminen johti lisääntyneisiin immuunivasteisiin sekä nuorilla, että vastasyntyneillä, vaste oli alhaisempi kuin ensisijaisten rokotteiden jälkeiset pitoisuudet ja tehoste oli ohimenevä. Haittavaikutusten kokonaismäärä oli tasapainossa ryhmien välillä. Vanhemmassa ikäryhmässä aivokalvontulehdusta raportoitiin kuitenkin sivuvaikutuksena koko tutkimusjakson ajan. Nuoremmissa ikäryhmässä sen sijaan ei raportoitu aivokalvontulehdusta. Kouristuskohtausten yleistyminen havaittiin molemmissa ikäryhmissä seitsemän päivän kuluessa RTS,S/AS01-rokotteen tehosteannoksen antamisesta. Ajallisen yhteyden ja biologisen uskottavuuden perusteella pääteltiin, että RTS,S- rokotteen ja kuumeisten kouristusten välillä oli kohtuullinen mahdollisuus 7 päivän kuluessa rokotuksesta. (Biernaux ja Kaslow, 2015.)

Tässä tutkimuksessa ei identifioitu rokotiuksen vaikutusta kuolleisuuteen. Kokeissa oli suhteellisen vähän kuolemantapauksia, vähemmän kuin mitä olisi voitu odottaa ilman tutkimusta (WHO, 2015).

A



B



Kuva 9. Rokotteen teho ja vaikutus kliinistä malariaa vastaan tutkimuksen lopussa. Vasemmanpuoleiset kuvaajat kuvaavat rokotteen tehokkuutta 95 %:n luottamusväleillä ryhmälle, joka sai neljä RTS,S/AS01-annosta (R3R) ja vasemman puoleiset kuvaajat kuvaavat malariatapausten lukumääriä, jotka estettiin kolmen rokoteannoksen (R3C) ja neljän rokoteannoksen (R3R) ryhmissä. Kuvaajat A kuvaavat 5–17 kuukauden ikäisten ikäryhmää ja kuvaajat B kuvaavat 6–12 viikon ikäisten vastasyntyneiden ikäryhmää. (Biernaux ja Kaslow, 2015.) (Kuva lähteestä: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15013377>).

7.3 RTS,S/AS01-rokotteen turvallisuus

Yleisesti ottaen RTS,S/AS01-rokotteen on todettu olevan turvallinen. Vaiheen II tutkimuksesta saaduissa turvallisuustiedoissa tuli ilmi ylempien hengitysteiden infektiota ja vaippaihottumaa suuremmalla määrällä lapsia rokotteen saaneissa ryhmissä kuin kontrolliryhmissä, mutta oireet eivät olleet liitoksissa rokotteeseen. Kyseisiä tuloksia ei havaittu vaiheen III tutkimusten yhteydessä. Rokotusten jälkeen seuranneiden kuumeisteisten kouristusten ilmaantuvuus oli samanlainen sekä rokotteen saaneissa ryhmissä, että kontrolliryhmissä. Aivokalvon tulehdus oli yleisempää RTS,S-rokotteen saaneilla lapsilla mutta se ei ollut yhteydessä rokotukseen. (Asante *et al*, 2015.)

RTS,S/AS01 on uusi rokote, eikä adjuvanttia AS01 ole käytetty vielä muissa lisensoiduissa rokotteissa. AS01:stä on kliinisiä kokemuksia useista muista ei-malaria-kokeellisista tuotteista, mm. kolmannen vaiheen *varicella-zoster*-viruksen glykoproteiini E:n ja AS01:n tutkimus yli 7000 aikuisella. Lähes 12 500 vastasyntynyttä ja lasta on saanut RTS,S/AS01-rokotteen kliinisissä kokeissa. WHO:n rokoteturvallisuuden maailmanlaajuinen neuvoa-antava komitea (GACVS) on tarkastellut RTS,S/AS01-rokotteen turvallisuustietoja vuosina 2009, 2014 ja 2015 ja vahvistanut, että rokotteella on hyväksyttävä turvallisuusprofiili. (WHO, 2015.)

Vuonna 2015 EMA:n ihmisille lääkkeitä käsittelevä komitea antoi myönteisen lausunnon RTS,S/AS01-rokotteen käytöstä Euroopan unionin ulkopuolisilla alueilla, joilla malariaa esiintyy säännöllisesti, 6 viikon – 17 kuukauden ikäisten lasten aktiiviseen immunisointiin *Plasmodium falciparum* -parasiitin aiheuttamaa malariaa ja hepatiitti B:tä vastaan. Vuonna 2019 aloitettiin RTS,S/AS01-rokotteen pilottihankeohjelma Malawissa, Ghanassa ja Keniassa, jonka tarkoituksena on suojaavien hyötyjen ja turvallisuuden arviointi rutiinikäytössä tosielämässä. Hankkeessa tullaan tutkimaan yli miljoona lasta kolmen vuoden aikana alueilla, joilla on keskisuuri tai suuri malariailmaantuvuus. Lapset satunnaistetaan ryhmiin, joista toiset rokotetaan neljällä annoksella RTS,S/AS01-rokotetta ja toiset jätetään rokottamatta. (Duffy ja Gorres, 2020.)

8. RTS,S/AS01-rokoteen tulevaisuus

Käynnissä olevat RTS,S/AS01-rokotteen tutkimukset tarjoavat käytännön tietoa neljän rokoteannoksen antamisen toteutettavuudesta lapsille sekä rokotteen yleisestä teho- ja turvallisuusprofiilista. Tutkimukset antavat tietoa WHO:lle RTS,S/AS01-rokotteen laajasta

käytöstä. Rokotteen käyttö malarian torjunnassa kohtalaisen ja suuren riskin malaria-alueilla on antanut erittäin lupaava näyttöä. RTS,S-rokotteen vaihtoehtoisia adjuvantteja tulisi harkita, sillä antigeeni on voimakkaasti riippuvainen vahvasta adjuvantista, ja tällöin vasta-ainevasteen pituuden kesto saataisiin parannettua. Toisaalta adjuvanttien tuottama tehostettu immunogeenisuus on myös otettava huomioon mahdollisten sivuvaikutuksien yhteydessä, ja vaihtoehtoinen adjuvantti, joka ei lisää lasten kuumeisten kohtausten riskiä tarjoaisi etua. (Laurens, 2019.)

RTS,S/AS01:sta, tähän mennessä lupaavimmasta malariaa vastaan valmistetusta rokotteesta valmistunut kliinisen vaiheen III tutkimus osoitti, että rokotteesta saatu teho oli rajallinen ja sen vaikutus oli maantieteellisesti tutkittuna vain alueellinen. Malariaa vastaan valmistettävien rokotteiden kehittämiseen tarvitaan lisää tutkimusta. Uusien työkalujen käyttö uusien kohdeantigeenien tunnistamiseksi on yksi tärkeimmistä tavoitteista tulevaisuudessa. Lisäksi immuunijärjestelmän aikaansaaman vasteen tehostamiseksi ja lisäämiseksi on kehitettävä erityyppisiä adjuvanttijärjestelmiä, jotta uuden sukupolven malariarokotteen kehittäminen nopeutuisi. (Gu *et al*, 2019).

RTS,S/AS01-rokotteen kanssa tapahtunut edistyminen on historiallinen virstanpylväs, mutta sen osittainen tehokkuus jättää vielä parantamisen varaa. Rokotteen etuna on se, että se annetaan lapsille heidän ikänsä mukaan, joten se sopisi yhteen muiden rutiininomaisten rokotteiden kanssa. Rokotteen heikkoutena on se, että sillä aikaansaatu vastainepitoisuuksien huippu, ja täten maksimaalinen suoja, ei useinkaan ole sama kuin malariaparasiitin siirtymäkausi. Länsi-Afrikassa on meneillään tutkimus, jossa RTS,S/AS01-rokotetta käytetään kausirokotuksena vuotuisilla tehosteannoksilla, jotka on suunniteltu maksimoimaan vasta-aineiden tuotanto malariaparasiittien huippukausien aikana. Muissa kenttäkokeissa on meneillään tutkimuksia, joissa tutkitaan osittaisia annosteluohjelmia. Viimeisen rokotteen aikana annetaan vain viidesosa aiempien annosten määrästä. Tulokset ovat antaneet näyttöä, että strategia on lisännyt tehoa homologista CHMI:tä vastaan sekä vasta-aineiden somaattisia hypermutaatioita. (Duffy ja Gorres, 2020.)

CSP-pohjaisten rokotteiden immunogeenisuutta yritetään kehittää jatkuvasti. Oxfordin Jenner instituutissa kehitetään seuraavan sukupolven RTS,S-rokotetta, R21, jossa hiukkaset koostuvat yksinomaan CSP-HBsAg-fuusioproteiineista. Hiirillä tehdyssä kokeessa H21 oli immunogeeninen pieninä annoksina, kun käytettiin ihmisen käyttämiä adjuvantteja ja toisin kuin RTS,S, se indusoi minimaalisia vasta-ainevasteita HBsAg-fuusiokumppanille. (Duffy ja Gorres, 2020.)

Rakenteellisia lähestymistapoja sovelletaan parannettujen CSP-pohjaisten rokotteiden suunnitteluun määrittämällä ihmisen funktionaalisten monoklonaalisten vasta-aineiden epitoopit. CSP:lle valmistetut monoklonaaliset vasta-aineet on valmistettu ihmisistä saaduista vasta-aineista pre-erytrosyyttisten rokotteiden antamisen jälkeen tai malaria-altistumisen jälkeen. Useimmat CSP:tä vastaan tuotetut ihmisen vasta-aineet reagoivat toistuvaan alueeseen ja tunnistavat epitoopin N-terminaalisen ja toistuvan alueen risteyksessä. C-terminaalista aluetta kohtaan valmistetut vasta-aineet ovat olleet harvinaisia. 215:sta monoklonaalisesta vasta-aineesta, jotka ovat peräisin *Plasmodium falciparumin* CSP-spesifisistä B-soluista kokonaisen sportsoiittirokotuksen jälkeen, vain 4 sitoutui C-terminaaliseen alueeseen. Vaikka RTS,S-seulontatutkimuksen tulokset osoittivat erilaista tehoa loisia vastaan, joiden C-terminaaliset alueet vastasivat tai eivät vastanneet rokotetta, muutamat testatut C-terminaalispesifiset ihmisen vasta-aineet eivät osoittaneet toiminnallista aktiivisuutta hiirissä *in vitro* tai *in vivo* passiivisen siirron jälkeen homologista CSP-sekvenssiä kantavia loisia vastaan. Muiden C-terminaaliseen päähän aktiivisten ihmisten vasta-aineiden toiminnallinen arviointi voi olla hyödyllistä, jotta RTS,S-rokotteen tehokkuutta voidaan parantaa. (Duffy ja Gorres, 2020.)

GSK jatkaa rokotteiden valmistamista nykyisiä tutkimuksia varten mutta pitkäaikainen rokotetarjonta on epävarmaa. Rokotevalmistajat joutuvat suunnittelemaan tuotannon jo hyvissä ajoin kysynnän tyydyttämiseksi, ja maat eivät vielä tiedä suositteleeko WHO RTS,S:n käyttöä. Tämä saattaa johtaa siihen, että rokotteen tuotannossa ja toimittamisessa voi esiintyä viivästyksiä, jos tutkimustulokset ovat suotuisia rokotteiden käytölle. Rokotteiden kuljetus ja varastointikysymyksiin sekä terveydenhoitohenkilökunnan koulutukseen on kiinnitettävä huomiota kansallisella, alueellisella ja paikallisella tasolla. Nämä haasteet voidaan ratkaista kumppanuuksien avulla. (Laurens, 2019.)

8.1 Vaiheen IV tutkimus

GSK suunnittelee parhaillaan vaiheen IV rokotetutkimuksia Saharan eteläpuolisissa Afrikan valtioissa. Tutkimuksen tarkoituksena olisi rekisteröidä useita tuhansia lapsia rokotukseen liittyvien mahdollisten harvinaisten sivuvaikutusten tunnistamiseksi. Vaiheen IV tutkimukset on toteutettava sellaisten harvinaisten sivuvaikutusten tunnistamiseksi, joita ei pystytty toteamaan vaiheen III tutkimuksessa. Vaiheen IV tutkimukset ovat laajoja tutkimuksia ja niihin voi mahdollisesti sisältyä 10000:n osallistujan seuranta tehokkaan lääketurvajärjestelmän avulla. Lääketurvajärjestelmä, joka on käytössä Saharan eteläpuolisessa Afrikassa, jossa

tapahtuu suurin osa malarialääkkeen käytöstä, on heikko. Järjestelmien parantamiseksi näillä Afrikan alueilla on tehty useita toimia. Niihin sisältyy mm. WHO:n kanssa yhteistyössä toimivat lääketurvatoiminnan osaamiskeskukset joissakin maissa kuten Ghanassa, ja INDEPTH-verkosto, joka on valtiosta riippumaton järjestö, ja joka koostuu terveydenhuollon ja väestön tarkkailemiseen suunnatuista tutkimuslaitoksista. Vaiheen IV tutkimuksen suurin haaste on se, että harvinaisista sairauksista puuttuvat perustason profiilit monissa Saharan eteläpuolisen Afrikan terveyslaitoksissa. (Asante et al, 2015.)

9. Kirjallisuusviitteet

Asante KP, Adjei G, Enuameh Y, Owusu-Agyei S. RTS,S malaria vaccine development: progress and considerations for postapproval introduction. *Vaccine: Development and Therapy*. 2016;6:25-32

<https://doi.org/10.2147/VDT.S53028>

Borkens, Y. (2020). Is a malaria vaccine feasible? - A review about the different vaccine types and their use against Plasmodium parasites. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*, 43(8), 317-321. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85090093677&partnerID=40&md5=a35bb521bddf3192058aa71600243dfd>

Cotton, M. (2020). The mosquirix (RTS.S) malaria vaccine. *Tropical Doctor*, 50(2), 107. doi:10.1177/0049475520916978

Cowman, A. F., Tonkin, C. J., Tham, W., & Duraisingh, M. T. (2017). The molecular basis of erythrocyte invasion by malaria parasites. *Cell Host & Microbe*, 22(2), 232-245. doi:<https://doi.org/pc124152.oulu.fi:9443/10.1016/j.chom.2017.07.003>

Denise L. Doolan, Carlota Dobaño, J. Kevin Baird. Acquired Immunity to Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*. Jan 2009;22(1):13-36. Full text at <http://cmr.asm.org/cgi/reprint/22/1/13>

Didierlaurent, A. M., Laupèze, B., Di Pasquale, A., Hergli, N., Collignon, C., & Garçon, N. (2017a). Adjuvant system AS01: Helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Null*, 16(1), 55-63. doi:10.1080/14760584.2016.1213632

Duffy, P. E., & Patrick Gorres, J. (2020). Malaria vaccines since 2000: Progress, priorities, products. *Npj Vaccines*, 5(1) doi:10.1038/s41541-020-0196-3

European Medicines Agency Science Medicines Health (2015). Assessment report Mosquirix™. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 23 July 2015, Procedure No.EMA/H/W/002300/0000. Full text at https://www.ema.europa.eu/en/documents/medicine-outside-eu/mosquirix-public-assessment-report_en.pdf

Hoffman, S. L., Campbell, C. C. (., & White, N. J. (2011). CHAPTER 96 - malaria. In R. L. Guerrant, D. H. Walker & P. F. Weller (Eds.), *Tropical infectious diseases: Principles, pathogens and practice (third edition)* (pp. 646-675). Edinburgh: W.B. Saunders. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3935-5.00096-3> Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702039355000963>

Itsara, L. S., Zhou, Y., Do, J., Grieser, A. M., Vaughan, A. M., & Ghosh, A. K. (2018). The development of whole sporozoite vaccines for plasmodium falciparum malaria. *Frontiers in Immunology*, 9, 2748. doi:10.3389/fimmu.2018.02748/full

Kainulainen K. & Siikamäki H. (2016). Malarian tartunta, taudinkuva ja diagnoosi. 16.12.2016 Terveyskirjasto Duodecim. Full text at https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=mat00029

Kaslow, D. C., & Biernaux, S. (2015). RTS,S: Toward a first landmark on the malaria vaccine technology roadmap. *Vaccine*, 33(52), 7425-7432. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.061>

Kyrönseppä H. & Siikamäki H.(2001). Malaria. Lääkärilehti Duodecim. 117(9):929-938 <https://www.duodecimlehti.fi/duo92231>

Laurens MB. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. *Hum Vaccin Immunother*. 2020;16(3):480-489. doi:10.1080/21645515.2019.1669415

Long CA, Zavala F. Immune Responses in Malaria. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(8):a025577. Published 2017 Aug 1. doi:10.1101/cshperspect.a025577

Loy, D. E., Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Plenderleith, L. J., Sundararaman, S. A., . . . Hahn, B. H. (2017). Out of africa: Origins and evolution of the human malaria parasites plasmodium falciparum and plasmodium vivax. *International Journal for Parasitology*, 47(2), 87-97. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.05.008>

Malaria Vaccine Initiative (2020). RTS,S. MVI Malaria Vaccine Initiative PATH 2020. Full text at <https://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/rtss>

Milner, D. A., Jr. (2018). Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(1), a025569. doi: 10.1101/cshperspect.a025569. doi:10.1101/cshperspect.a025569 [doi]

Olotu, A., Fegan, G., Wambua, J., Nyangweso, G., Leach, A., Lievens, M., . . . Bejon, P. (2016). Seven-year efficacy of RTS,S/AS01 malaria vaccine among young african children. *The New England Journal of Medicine*, 374(26), 2519-2529. doi:10.1056/NEJMoa1515257 [doi]

Oyen, D., Torres, J. L., Wille-Reece, U., Ockenhouse, C. F., Emerling, D., Glanville, J., . . . Wilson, I. A. (2017). Structural basis for antibody recognition of the NANP repeats in plasmodium falciparum circumsporozoite protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 114(48), E10438-E10445. doi:10.1073/pnas.1715812114

Pholcharee, T., Oyen, D., Torres, J. L., Flores-Garcia, Y., Martin, G. M., González-Páez, G. E., . . . Wilson, I. A. (2020). Diverse antibody responses to conserved structural motifs in plasmodium falciparum circumsporozoite protein. *Journal of Molecular Biology*, 432(4), 1048-1063. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.029>

Richard Carter, Kamini N. Mendis. Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*. October 2002;15(4):564-594. Full text at <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/15/4/564>

RTS, S Clinical Trials Partnership. (2015). Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in africa: Final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet (London, England)*, 386(9988), 31-45. doi:S0140-6736(15)60721-8 [pii]

RTS,S/AS01E malaria vaccine (MoSQUIRIX*) children living in malaria-endemic regions: Little efficacy, poorly documented harms. (2017). *Prescrire International*, 26(178), 5-8.

Sanchez, L., Vidal, M., Jairoce, C., Aguilar, R., Ubillos, I., Cuamba, I., . . . Dobaño, C. (2020). Antibody responses to the RTS,S/AS01E vaccine and plasmodium falciparum antigens after a booster dose within the phase 3 trial in mozambique. *Npj Vaccines*, 5(1) doi:10.1038/s41541-020-0192-7

Schuerman, L. (2019). RTS,S malaria vaccine could provide major public health benefits. *The Lancet*, 394(10200), 735-736. doi:10.1016/S0140-6736(19)31567-3

Technical Expert Group on Malaria Vaccines (JTEG) and WHO Secretariat (2015). Background Paper On The RTS,S/AS01 Malaria Vaccine. September 2015. Full text at https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2015/october/1_Final_malaria_vaccine_background_paper_v2015_09_30.pdf?ua=1

U.S. Department of Health & Human Services (2020). Malaria. Center for Disease Control and Prevention 2020. Full text at <https://www.cdc.gov/parasites/malaria/index.html>

Vandoolaeghe, P., & Schuerman, L. (2016). The RTS,S/AS01 malaria vaccine in children 5 to 17 months of age at first vaccination. *Expert Review of Vaccines*, 15(12), 1481-1493. doi:10.1080/14760584.2016.1236689

Wardemann, H., & Murugan, R. (2018). From human antibody structure and function towards the design of a novel plasmodium falciparum circumsporozoite protein malaria vaccine. *Current Opinion in Immunology*, 53, 119-123. doi:<https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.04.023>

Zheng, J., Pan, H., Gu, Y., Zuo, X., Ran, N., Yuan, Y., . . . Wang, F. (2019). Prospects for malaria vaccines: Pre-erythrocytic stages, blood stages, and transmission-blocking stages. *BioMed Research International*, 2019, 1-9. doi:10.1155/2019/9751471