



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 1 755 647 B1**

(51) Int. Cl.
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI
 PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number: E004651	(73) Patendiomanikud:
(11) Patendikirjelduse tõlke number: EE-EP 1 755 647	VIB, vzw Rijvisschestraat 120, 9052 Zwijnaarde, BE
(30) Prioriteediandmed: 27.05.2004 EP 04102334	Life Sciences Research Partners VZW. Onderwijs & Navorsing, Campus Gasthuisberg, K.U. Leuven, Herestraat 49, box 913, 3000 Leuven, BE
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev: 27.05.2005	(72) Leiutise autor:
(96) Euroopa patendi-taotluse number: 05747975.0	CARMELIET, Peter Sappellenbos 10, B-3052 Blanden, BE
(97) Euroopa patendi väljaandmisest teatamise kuupäev: 25.08.2010	(74) Patendivolinik:
(97) Euroopa patendi number: EP 1 755 647	Arno Anijalg Patendibüroo Ustervall OÜ Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev: 25.10.2010	
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev: 15.12.2010	

(54) **Amüotroofse lateraalskleroosi ravi**

AMÜOTROOFSE LATERAALSKLEROOSI RAVI

TEHNIKAVALDKOND

- 5 Leiutis käsitleb VEGF₁₆₅ kasutamist motoneuronite haiguste raviks, mille korral manustatakse VEGF₁₆₅ pidevalt kuni 4 nädala jooksul haiguse avaldumiskohas annuste vahemikus 0,01 µg/kg/päev kuni 0,6 µg/kg/päev. Täpsemalt öeldes käsitleb leiutis amüotroofse lateraalskleroosi (ALS) ravi. Leiti, et väikeste koguste vaskulaarse endoteliaalse kasvufaktori intratserebroventrikulaarne manustamine prekliinilise ALS
- 10 loomumudeli korral indutseerib loomal märkimisväärse lokomotoorse aktiivsuse ja pikendab eluiga.

TEHNIKA TASE

- Amüotroofne lateraalskleroos (ALS) on laastava toimega paralüüsiv haigus, mille korral
- 15 patsiendid surevad 3 kuni 5 aasta jooksul pärast haigestumist¹⁻⁴. Kliinilised sümptomid on esmajoonel põhjustatud seljaaju ja ajutüve motoneuronite progresseeruvast degeneratsioonist, mis kahjustab olulisel määral kognitiivsust. Haigestuvad peamiselt terved keskealised juhuslikud isikud, > 90% juhtudest ei ole seda haigust perekonnas varem esinenud. Kuigi alla 60-aastaste haigestunute hulgas on mehi rohkem kui naisi,
- 20 on haigestumise sagedus vanemas eas mõlema soo korral lähedane⁵. Elanikkonna vananedes kannatab järjest suurem hulk isikuid ALS-i all, mis on sageduselt kolmandal kohal kõige levinumate neurodegeneratiivsete haiguste hulgas⁶. Paljud ALS-i haigestunud patsiendid täheldavad alul jäsemelihaste nõrkust („ALS-i jäsemeline algus“). Ligikaudu 25% ALS-i haigestunud patsientidel degenerereeruvad esmalt ajutüve
- 25 motoorses keskuses olevad motoorsete närvirakkude kogumikud („ALS-i bulbaarne algus“), mis põhjustab düsartriad, düsfaagiat ja hingamisega seonduvaid probleeme. ALS-i bulbaarse algusega patsientide korral on iseloomulik haiguse kiirem ja ägedam algus võrreldes jäsemelise algusega, kuid ka viimasel juhul kujunevad lõpuks välja bulbaarsele kulule omased sümptomid. Motoneuronite degenerereerumise täpne põhjus
- 30 jääb valdavatel juhtudel suures osas mõistatuslikuks^{2, 4, 7}. SOD1 mutatsioonid põhjustavad motoneuronite degeneratsiooni inimestel ja üleekspresseerimise korral ka transgeensetel hiirtel. SOD1^{G93A} hiired on muutunud loomumudelites „kullastandardiks“ uudsete kandidaatravimite terapeutilise potentsiaali hindamisel⁸. SOD1^{G93A} rottidel kujuneb välja ALS-i agressiivne vorm, kuid neid ei ole siiani

kasutatud uudsete ravimeetodite hindamisel ^{9, 10}. Siiani ei ole olemas LAS-i raviks tunnustatud ja efektiivset ravi. Mõnedes, kuid mitte kõikides riikides on ainsaks tunnustatud ravimiks rilusool, kuid sellel on tühine mõju elueale, see on kallid, ei ole vaba kõrvaltoimetest ja mis kõige olulisem, see ei avalda toimet bulbaarsete sümptomite korral ¹⁶. Kuna ALS on motoneuronite degenerereerumise tagajärg, siis on juba kaua aega vaadeldud ALS-i korral terapeutiliste kandidaatidena neurotroofseid kasvufaktoreid nagu tserebraalne neurotroofne faktor (BDNF), tsiliaarne neurotroofne faktor (CNTF), insuliinisarnane kasvufaktor (IGF)-I, leukotsüüte inhibeeriv faktor (LIF), kardiotrofiin (CT)-1 ja hepatotsüütide kasvufaktor (HGF). On näidatud, et GDNF-i, kuid eelkõige IGF-1 geeni ülekanne retrograadselt aksoni kaudu edasiantava viirusvektori abil pikendab SOD1^{G93A} hiirte eluiga ^{17, 18}. Kuigi kliinilised katsetused juba käivad, tuleb geeniteraapia kliiniline kasutamine ALS-i ravis veel välja töötada ja lahendamist ootavad ikka veel pöördumatu loomuse, kahjulike kromosomaalsete toimete, transgeense ekspressiooni halva kontrollitavuse ja suure tootmismahuga seonduvad probleemid. Seevastu on selle asemel rekombinantsete neurotroofsete kasvufaktorite manustamine ahvatlev terapeutiline strateegia, sest see võimaldab manustatava valgu annuse ja kestuse paindlikku kontrolli. Siiski ei ole BDNF-i intratekaalne infusioon, GDNF-i intratserebroventrikulaarne manustamine või BDNF-i või CNTF-i ²⁰ süsteemne manustamine siiani kaasa toonud ALS-patsientide korral olulist kliinilist paranemist, erandiks on haiguse väljakujunemise 26% aeglustumine pärast IGF-1 manustamist, mis leidis aset ühes uuringus, kuid mitte teises ^{21, 22}. Ebaõnnestumisest võib vähemalt osa olla põhjustatud nende valkude lühikesest poolväärtusajast, immunogeensusest, annusest sõltuvast kaksipidisest toimest neuronite elulemusele ja apoptoosile, soovimatusest mürgisusest ja piiratud võimest läbida hematoentsefaalset barjääri pärast süsteemset manustamist ²³⁻²⁵. Teiseks võimalikuks põhjuseks võib olla asjaolu, et kuigi mitmed nendest faktoritest võivad soodustada eksogeense manustamise korral akuutselt kahjustatud motoneuronite elulemust, ei pruugi need olla kriitilise tähtsusega täiskasvanute motoneuronite elulemuse endogeenses kontrollis sellise kroonilise haiguse nagu ALS korral. Hiljuti avastasime, et VEGF väikesed sisaldused ei ole motoneuronite arengu seisukohalt olulised, kuid põhjustavad ALS-taolise motoneuronite degenerereerumise väljakujunemist täiskasvanud geneetiliselt modifitseeritud hiirtel (WO 0176620) ja sporaadilise ja perekondliku ALS-i suuremat riski ka inimestel ¹³⁻¹⁵. VEGF on angiogeense faktori prototüüp, mis osaleb veresoonte

arengus nii tervete kui ka haigete isikute korral^{11, 12}. Immuunsuse ja süsteemsete kõrvaltoimetega seotud probleemide vältimiseks, jagu saamiseks VEGF-i piiratud võimest läbida hematoentsefaalset barjääri ja seljaaju parenhüümis VEGF valgu maksimaalse sisalduse saamiseks töötasime välja strateegia, mida ei ole varem kasutatud rekombinantse valgu terapeutilise potentsiaali uurimiseks prekliinilistes ALS-i uuringutes, see tähendab, kuidas kohale toimetada pikema aja jooksul intratserebroventrikulaarselt rekombinantset VEGF-i, selleks kasutasime ALS-i transgeense SOD1^{G93A} roti mudelit. Üllataval kombel leidsime, et VEGF₁₆₅ erakordselt väikesed kontsentratsioonid mitte üksnes ei suurenda lokomotoorset aktiivsust, vaid pikendavad ka roti prekliinilise ALS mudeli korral eluiga ootamatult suures ulatuses. Tulemused näitavad, et VEGF₁₆₅ väikesed kontsentratsioonid võivad pärssida haiguse progresseerumist ALS-i alla kannatavatel patsientidel intratserebroventrikulaarse manustamise korral.

15 LEIUTISE ÜKSIKASJALIK KIRJELDUS

Leiutises näidatakse, et VEGF-i väikeste koguste intratserebroventrikulaarne (ICV) manustamine ALS-i agressiivse vormi all kannatavate rottide liinile lükkab edasi haiguse ilmumist, suurendab lokomotoorset aktiivsust ja pikendab eluiga. See on esimene uuring, milles näidatakse rekombinantse kasvufaktori olulist terapeutilist toimet haigusnähtudele prekliinilise ALS-i mudeli korral. LAS-patsientide või SOD1^{G93A} hiirte korral on hinnatud tuntud neurotroofse aktiivsusega mitme rekombinantse kasvufaktori mõju, sealhulgas BDNF, IGF-1, CNTF, LIF ja GDNF, kuid ükski kasvufaktor eraldi ei taganud järjekindlalt olulist kasu^{19-22, 35}, seetõttu on rekombinantsete kasvufaktorite manustamine eelnevate kliiniliste katsetuste¹⁹⁻²² ebaõnnestumise valguses kaotanud palju oma atraktiivsusest. Me näitame siin, et VEGF₁₆₅ avaldab *in vivo* otsest mõju motoneuronitele. Kuigi VEGF korral on teada mõju mitmetele neuronaalsetele protsessidele *in vivo*¹⁵, ei ole kunagi kindlaks tehtud, kas VEGF-i toime avaldub neuronitele vahetult või kaudselt muud tüüpi rakkude või muude molekulaarsete vaheühendite kaudu. Seega on VEGF₁₆₅-l pleiotroopne toimespekter, mis võib osaleda leiutisekohases märkimisväärses terapeutilises kasulikkuses.

Leiutises pakutakse välja VEGF₁₆₅ isovormi kasutamiseks motoneuronite haiguste korra, täpsemalt öeldes amüotroofse lateraalskleroosi amüotroofse lateraalskleroosi taoliste

haiguste ravis, kusjuures VEGF-i manustatakse pidevalt haiguse avaldumiskoha läheduses kuni vähemalt 4 nädala jooksul annuste vahemikus 0,01 µg/kg/päev kuni 0,6 µg/kg/päev. VEGF₁₆₅ on 165 aminohappest koosnev valk, mis on erialases kirjanduses tuntud kui humaanne VEGF (hVEGF). VEGF ekspresseeritakse paljudes kudedes mitmete homodimeersete vormidena (121, 145, 165, 189 ja 206 aminohapet monomeerii kohta), mis saadakse RNA alternatiivse splaissimisel. VEGF₁₂₁ on lahustuv mitogeen, mis ei seonu hepariiniga; VEGF-i pikemad vormid seonduvad hepariiniga järjest suureneva afiinsusega. Hepariiniga seonduvaid VEGF-i vorme saab karboksüülotsas lõhustada plasmiiniga, seejuures vabaneb/vabanevad VEGF-i difundeeruv(ad) vorm(id). Lisaks on hiljuti kindlaks tehtud mitmed VEGF-ile struktuuriliselt lähedased molekulid, sealhulgas platsenta kasvufaktor (PIGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ja VEGF-E. Ferrara and Davis-Smyth (1997) *Endocr. Rev.*, Ogawa *et al.* (1998) *J. Biological Chem.* 273: 31273–31281; Meyer *et al.* (1999) *EMBO J.*, 18: 363–374. Ühel juhul on avalikustamine suunatud terminitele „farmatseutiline kompositsioon“ või „ravim“ või „kasutamine ravimi valmistamiseks, mis on mõeldud aviks“ ja puudutavad ülaltoodud kirjeldusele vastavat VEGF₁₆₅ hõlmavat koostist ja farmatseutiliselt vastuvõetavat kandeainet või abiainet (mõlemaid termineid kasutatakse võrdväärse tähenduses), mis on mõeldud motoneuronite ülaltoodud haiguste raviks. Spetsialistile tuntud sobivad kandeained või abiained on soolalahus, Ringeri soolalahus, dekstroosilahus, Hanki lahus, mittelenduvad õlid, etüüloleaat, dekstroosi 5% lahus soolalahuses, isotoonilisust ja keemilist püsivust parandavad ained, puhvrid ja säilitusained. Muud sobivad kandeained hõlmavad ükskõik millist kandeainet, mis ise ei indutseeri koostist saavale indiviidile kahjulike antikehade tootmist, näideteks on valgud, polüsahhariidid, polüpiimhapped, polüglükoolhapped, polümeersed aminohapped ja aminohapete kopolümeerid. Konkreetse teostuse korral võib „ravimit“ manustada haiguse avaldumiskoha lähedal sobival meetodil. Tõepoolest, VEGF₁₆₅ kontsentratsiooni ruumiline gradient ja terapeutiline kasulikkus näitavad, et vaatamata märgatavale muundumisele CSF-is, ladestub VEGF₁₆₅ annus süstimiskoha vahetus läheduses. See võib avada uudsed võimalused VEGF-ravi kohandamiseks seda vajavatele patsientidele. Tõepoolest võivad ALS-i bulbaarse alguse all kannatavad patsiendid saada suuremat kasu VEGF-i manustamisest ICV või intratekaalselt tservikaalpiirkonnas, samal ajal on ALS-i lumbaalse algusega patsientidele kasulikum VEGF-i intratekaalne infusioon lumbaalpiirkonnas. Konkreetset juhul manustatakse

VEGF₁₆₅, annuses, mis vahemikus 0,01 µg/kg/päev kuni 1,5 µg/kg/päev, eelistatavamalt vahemikus 0,05 µg/kg/päev kuni 1 µg/kg/päev, kõige eelistatavamalt vahemikus 0,2 µg/kg/päev kuni 0,8 µg/kg/päev. Eelistatavalt kasutatakse pidevinfusiooni ja see hõlmab pidevat subkutaanset manustamist osmootse minipumba kaudu. Järgmisel juhul manustakse VEGF₁₆₅ pidevalt haiguse avaldumiskohas annuses, mis on vahemikus 0,05 µg/kg/päev kuni 1 µg/kg/päev.

Järgmisel juhul manustakse VEGF₁₆₅ pidevalt haiguse avaldumiskohas annuses, mis on vahemikus 0,2 µg/kg/päev kuni 0,8 µg/kg/päev. Ühe teostuse korral manustatakse annus avaldumiskohta intratekaalselt. Järgmise teostuse korral manustatakse annus avaldumiskohta intratserebroventrikolaarselt. Samuti on mõistetav, et ühel juhul manustatakse VEGF₁₆₅ pidevalt avaldumiskohas annuses, mis on vahemikus 0,01 µg/kg/päev – 1,4 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 1,3 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 1,2 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 1,1 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 1 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,9 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,8 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,7 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,6 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,5 µg/kg/päev või 0,01 – 0,4 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,3 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,2 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,1 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,09 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,08 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,07 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,06 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,05 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,04 µg/kg/päev või 0,01 µg/kg/päev – 0,03 µg/kg/päev. Teisel juhul manustatakse VEGF₁₆₅ pidevalt avaldumiskohas annuses, mis on vahemikus 0,02 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,03 µg/kg/päev – µg/kg/päev või 0,04 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,05 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,06 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,07 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,08 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,09 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,1 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,2 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,3 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,4 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,5 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,6 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,7 µg/kg/päev – µg/kg/päev või 0,8 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 0,9 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 1 µg/kg/päev 1,5 µg/kg/päev või 1,1 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 1,2 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev või 1,3 µg/kg/päev – 1,5 µg/kg/päev.

Seega on VEGF₁₆₅ hõlmava koostise infusiooni konkreetseks teostuseks intratekaalne manustamine. Intratekaalset manustamist võib teha näiteks nii, et kirurgiliselt

implanteeritakse pump ja sellest juhitakse kateeter selja piirkonda.

Leiutise paremaks mõistmiseks selgitatakse alljärgnevalt terminit „motoneuroni haigus“.

Motoneuronite haigus kuulub haiguste rühma, mis hõlmab eesmise sarve rakkude degenerereerumist, lihaste aktiivsust kontrollivates kesknärvisüsteemi närvides. Selle

5 tagajärjeks on lihaskonna järk-järguline nõrgenemine ja kõhetumine (atroofia).

Motoneuronite haigusi klassifitseeritakse vastavalt sellele, kes need hõlmavad ülemisi motoneuroneid (UMN) ja/või alumisi motoneuroneid (LMN). Ülemised motoneuronid

paiknevad ajus, eelkõige motoorses ajukoos ja nende sünapsid on suunatud kas otseselt või kaudselt alumistesse motoneuronitesse. Ülemisi motoneuroneid nimetatakse

10 täpsemalt premotoneuroniteks ja need vastutavad liikumisega seotud käskluste edastamise eest. Alumised motoneuronid kuuluvad kahte kategooriasse: vistseraalsed ja

somaatilised motoneuronid. Vistseraalsed motoneuronid on iseseisvad preganglionaaalsed neuronid, mis reguleerivad ganglionaarsete neuronite aktiivsust, mis

innerveeruvad näärmetes, veresoontes ja silelihastes. Somaatilised motoneuronid

15 innerveeruvad skeletilihastes ja hõlmavad esiteks eesmise sarve rakke, mis vastavalt oma nimetusele paiknevad seljaaju eesmises sarves, ning teiseks, alumisi

motoneuroneid, mis paiknevad kraniaalnärvi rakkude kogumikes. Amütroofne lateraalskleroos või ALS on motoneuroni haiguste kõige sagedamini esinevaks vormiks

(süü kuulub ümmarguselt 80% kõikidest juhtudest). ALS on tuntud ka kui Lou Gehringi

20 tõbi, mis on nime saanud kuulsa Põhja-Ameerika pesapallimängija järgi. ALS-i

esimesteks sümptomiteks on käte ja jalgade nõrkus ning sageli ka kahjustatud lihaste tõmblused. Olenemata sellest, milline jäse kahjustub esimesena, tabab haigus kindlasti

kõiki nelja jäset. Ülemiste motoneuronite kahjustuse tagajärjeks on lihaste nõrkus, spastilisus ja hüperaktiivsed süvakõõlusrefleksid. Alumiste motoneuronite kahjustuste

25 tagajärjeks on lihaste nõrkus, millega kaasneb atroofia, tõmblused, lõtvus ja vähenenud süvakõõlusrefleksid. ALS ilmneb kraniaalnärvide ülemiste ja alumiste motoneuronite

korral, seetõttu on eristatakse pea- ja kaelapiirkonna sümptomeid. Mõnede patsientide korral esineb ka kraniaalnärvide UMN hõlmatus ja kui see on ainsaks ilminguks, siis

nimetatakse seda pseudobulbaarseks impulsiks. Seljalihaste atroofia või progresseeruv

30 lihasatroofia on motoneuronite haigus, mis ei hõlma kraniaalnärve ja on põhjustatud alumiste motoneuronite degenerereerumisest. Shy-Drageri sündroomile on iseloomulik

posturaalne hüpertensioon, kusepidamatus, higistamine, lihaste jäikus ja treemor ning neuronite hävimine seljaaju rindkereõõnepoolsetes närvirakkude kogumikes, millest

lähtuvad sümpaatilised närvikiud. Seljaaju destruktiivsete kahjustuste tulemuseks on eesmise sarve rakkude hävimine. See avaldub müelomeningotseele ja süringomüeeliana, mille korral moodustuvad seljaaju tservikaalosas keskel suured vedelikuga täidetud tsüstid.

5 VEGF₁₆₅ kasulik toime on seotud asjaoluga, et leiutisekohaselt toimetatakse see rekombinantne kasvufaktor kohale pidevalt ja vahetult peaaju-seljaajuvedelikku (CSF) – ALS-i korral oli suurema SOD1^{G93A} rotimudelite korral saadavus instrumentaalne. Biojaotumise andmed näitavad, et VEGF₁₆₅ difundeerub pärast ICV manustamist kiiresti CSF-ist seljaaju parenhüümi ja on seetõttu võimeline jõudma seljaaju
10 alumistesse motoneuronitesse, kuigi ei saa välistada, et mõningane kasu tuleneb ka toimest ülemistesse motoneuronitesse. Tugev korrelatsioon VEGF₁₆₅ biojaotumise (ajutüves suurem kogus kui seljaaju lumbaalpiirkonnas) ja selle terapeutiline toime näitavad, et VEGF indutseerib suurima toime nendes suurima kontsentratsiooniga kohtades. Kuna VEGF₁₆₅ puhastub kesknärvisüsteemist ligikaudu 3 tunni jooksul
15 (analoogiliselt muude neurotrofiinidega³⁸), siis on kasulikus toimes tõenäoliselt oma osa ka VEGF₁₆₅ pidevas kohaletoimetamises. Muud põhjused võivad olla seotud VEGF₁₆₅ ICV manustamise üldise ohutusprofiili (me ei täheldanud mingeid silmatorkavaid kõrvaltoimeid sellise terapeutilise annuse kasutamisel, mis oli 10 korda madalam toksilisuse lävest) ja immuunreaktsiooni puudumisega (mis võiks vastasel
20 juhul indutseerida neutraliseerivaid antikehi). Immuunreaktsioon esines VEGF₁₆₅ süsteemse kohaletoimetamise korral ja tõenäoliselt on VEGF tühise sissetungimisega läbi hematoentsefaalse barjääri seonduv probleem ületatav üksnes süsteemselt massiivsete – tõenäoliselt toksiliste – VEGF₁₆₅ koguste korral.

ICV kohaletoimetamine võib esmapilgul tunduda kummaline, kuid see on tehniliselt
25 võimalik ja seda on juba tehtud muude krooniliste neuroloogiliste näidustuste korral⁴³. Pumba kohalepanekuga seotud ühekordse kirurgilise sekkumisega seonduvad ebamugavused võivad tõepoolest oma tähtsusest ületada selle manustuse eeliseid (süsteemsete kõrvaltoimete ja immuunreaktsiooni puudumine; kontrollitav manustamine). Meie eelmised geneetilised andmed näitavad, et VEGF mõjutab nii
30 sporaadilist kui ka perekondlikku ALS-i¹⁷. Kuigi me võisime leiutises kasutada üksnes perekondliku ALS-i loommudelit, on olemas head võimalused selleks, et VEGF on efektiivne ka ALS-i sporaadilise ALS-i juhtudel. Lõppude lõpuks avaldab VEGF mõju erinevat tüüpi neuronite elulemusele stressi tüübist (hüpoksia, ökotoksilisus, seerumi

kaotus, mutantse SOD1 seonduv toksilisus jms) ja on seega ahvatlevaks kandidaadiks¹⁵. Ravi VEGF-iga tundub olevat ohutu ja hästi talutav pikemat aega, seejuures ei põhjusta see veresoontes kõrvaltoimeid. Meie leiud täiendavad eelmisi tähelepanekuid, et VEGF-ile on iseloomulik kvalitatiivselt erinev bioloogiline toime (veresoonte läbilaskvus, angiogenees) erinevate kontsentratsioonide korral⁵⁷. Lisaks avaldavad VEGF väikesed kogused angiogeneesile isheemilise/kahjustatud aju korral üksnes stimuleerivat toimet siis, kui see toimetatakse vahetult aju parenhüümi, mitte aga CSF-i^{48, 58}.

10 KÄESOLEVA LEIUTISEGA SEOTUD NÄITED

1. Rekombinantse VEGF-i süsteemse ja intratserebroventrikulaarse kohalettoimetamise võrdlus

Esmalt hindasime seda, milline manustamistee, see tähendab süsteemne või intratserebroventrikulaarne, on VEGF-i korral parim. LAS-i ohutu ja efektiivse ravimise korral kasvufaktoriga on nõutav, et valk ei tohi tekitada immuunreaktsiooni ega indutseerida süsteemseid kõrvaltoimeid, kuid seejuures on vajalik tagada seljaaju parenhüümis piisavalt kõrge, see tähendab terapeutiliselt toimiv sisaldus. Esialgsed uuringud näitavad, et kõik müügilolevad inimese, roti või hiire rekombinantse VEGF preparaadid põhjustavad 2 nädala jooksul tugeva immuunreaktsiooni siis, kui neid manustada intraperitoneaalselt hiirele üle päeva koguses 1 µg (angiogeneesi stimuleerimiseks vajalik terapeutiliselt toimiv annus³⁷). Parimad tulemused saadi siis, kui kasutati *E. coli* abil toodetud hiire VEGF-i, kuid isegi see preparaat põhjustas 4 nädala pärast immuunreaktsiooni, mistõttu on võimatu kasutada VEGF-i pidevat süsteemset kohalettoimetamist. Lisaks on VEGF hüdrofiilne ja selle molekulmass on 44 kDa ja seetõttu ei ole tõenäoline, et see läbib hematoentsefaalset või hematolikkoriaalset barjääri kogustes, mis ületavad 1% süstitud annusest³⁸. Seljaaju parenhüümis VEGF-i piisava sisalduse saamiseks on seetõttu vajalik VEGF-i ülemääraste koguste manustamine, mis tõenäoliselt põhjustab toksilisi süsteemseid kõrvaltoimeid. Lisaks jääb VEGF püsima mitte ainult kudede heparaansulfaadi poolest rikkas ekstratsellulaarses maatriksis, vaid ka plasmas lahustuva Flt1 (sFlt1) tõttu, see tähendab VEGF retseptori 1 (mida nimetatakse ka Flt1)^{39, 40} ekstratsellulaarse ligandi seondava domeeni tõttu. Siiski me tegime kindlaks, et lahustuva Flt1 sisaldus on hiire seerumis 5 korda suurem kui peaju-seljaajuvedelikus (vastavalt 3,800 ± 594 pg/ml ja 810 ± 66

pg/ml; $M = 3$; $p < 0.05$). Seega jääb süsteemse manustamise korral suurem osa VEGF-ist seotuks sFLt1 ja heparaansulfaadirikka maatriksiga kui see on intratserebroventrikulaarse manustamise korral. Lõpuks, kuigi VEGF-i sisaldust ei õnnestu määrata CSF-is ⁴¹, on ajuvatsakese soonpõimik organismis üks nendest vähestest kohtadest, kus VEGF jääb olemuslikult ekspresseerituks ka täiskasvanutel ⁴². Kõigi nende põhjuste tõttu me hindasime, kas VEGF-i intratserebroventrikulaarne (ICV) kohaletoimetamine pakub alternatiivset võimalust ja optimeerisime vajalikke meetodeid kasvufaktorite pikaajaliseks ICV kohaletoimetamiseks. Nagu me juba varem märkisime, omab VEGF₁₆₄ isovorm (mille ekvivalendiks inimese korral on VEGF₁₆₅) optimaalseid bioloogilisi omadusi motoneuronite elulemuse stimuleerimiseks ¹³ (WO 01/76620) ja seetõttu kasutasime ülejäänud uuringutes seda isovormi. Kuna kõikides kohaletoimetamise seotud eksperimentides (vaadake allpool) kasutati rotte, siis kloonisime ja ekspresseerisime roti VEGF₁₆₄ valgu preparaati, mille puhtusaste oli > 99% ja mis ei sisaldanud endotoksiine.

15

2. VEGF-i biojaotumine pärast intratserebroventrikulaarset kohaletoimetamist

Midagi ei ole teada VEGF-i farmakokineetika kohta kesknärvisüsteemis pärast selle ICV kohaletoimetamist ³⁸. Ei ole teada isegi seda, kas CSF-i manustatud VEGF on võimeline difundeeruma seljaaju parenhüümi läbi endümaalse barjääri. Seepärast me määrasime esmalt kindlaks ¹²⁵I-VEGF-i jaotumise tervetel rottidel pärast selle ICV kohaletoimetamist. Üks tund pärast ICV boolussüsti oli CSF-is veel üksnes 12% süstitud ¹²⁵I-VEGF-i kogusest, samal ajal oli peaaju ja seljaaju parenhüümis vastavalt 70% ja 12%, mis näitab, et ¹²⁵I-VEGF difundeerub kergesti CSF-ist parenhüümi. Seega nagu NGF-i korral, kuid erinevalt BDNF-ist, ei kujuta endümaalkiht barjääri VEGF-i difusioonil parenhüümi ³⁸. Kui avaldada ¹²⁵I-VEGF-i sisaldus ühe grammi koe kohta, siis on ¹²⁵I-VEGF-i sisaldus suurim süstimiskoha vahetus läheduses ja see väheneb pidevalt rostrakaudaalse gradiendina piki seljaaju. ¹²⁵I-VEGF-i sisaldused seljaaju bulbaar-/tservikaal-, torakaal- ja lumbaalpiirkonnas moodustasid sisaldusest ajus vastavalt 80%, 50% ja 16%. 3 tundi pärast süstimist oli süstitud ¹²⁵I-VEGF-i kogusest pea- ja seljaaju üksnes 30%, samal ajal leiti 24 tunni pärast tühiseid koguseid ja ¹²⁵I-VEGF leidis eritistes, mis viitab sellele, et VEGF puhastus venoossetesse ja lümfaatilistesse süsteemides nagu see on kindlaks tehtud ka teiste kasvufaktorite korral ³⁸. Nendest eksperimentidest saab teha kaks järeldust. Esiteks, ICV kohaletoimetatud

VEGF difundeerub kiiresti CSF-ist parenhüümi neuronite juurde, kuid puhastub CSF-ist 24 tunni jooksul. Kuna motoneuronid nõuavad ALS-i korral pidevalt elulemussignaale, siis on vajalik VEGF-i pidev kohaletoimetamine. Teiseks, pärast ICV kohaletoimetamist jaotub VEGF rostrokaudaalse gradiendi tekkega – see võib
5 avaldada motoneuronite elulemusele samasuguse ruumilise toimega mõju.

3. Rekombinantse VEGF-i pikaajaline intratserebroventrikulaarne kohaletoimetamine

Kuigi inimeste korral on saavutatud muude neurodegeneratiivsete haiguste korral ⁴³ GDNF-i prolungeeritud ICV kohaletoimetamine kuni 8 kuu jooksul, ei ole seda teed
10 kasutatud ALS-i prekliinilises mudelis rekombinantsete kasvufaktorite terapeutilise potentsiaali hindamiseks. Rekombinantse VEGF-i pikaajalise pideva ja konstantse kohaletoimetamise saavutamiseks implanteerisime loomade seljapiirkonda osmootsed minipumbad ja ühendasime need kateetriga, mille paigaldasime stereotaktiliselt aju lateraalventriikulisse. Kuigi hiirte korral oli lateraalventriikuli kateteriseerimine
15 tehniliselt võimalik, ei õnnestunud kateetreid ajus fikseerida ja need irdusid paari nädala pärast, sest hiired püüdsid neid eemaldada oma pea kratsimisega. Lisaks välistasid pumba suured mõõtmed kehaga võrreldes (peaaegu 30% keha mõõtmetest) lokomotoorse aktiivsuse usaldusväärse määramise. Seetõttu valisime rekombinantse VEGF valgu ICV kohaletoimetamise terapeutilise potentsiaali hindamiseks SOD1^{G93A}
20 roti ALS mudeli korral implanteerimiseks pumbad, mis toimetasid ühendeid kohale kuni 4 nädala jooksul. Pumpade asendamisega iga 4 nädala tagant õnnestus meil VEGF valku kohale toimetada reprodutseeritavalt enam kui 100 päeva jooksul ilma igasuguste kõrvaltoimeteta (vt allpool). Kateetrite korrektset asukohta ja avatust kontrolliti iga roti korral lahkamise ajal. Oluline oli see, et VEGF omas pärast loomadesse paigaldatud
25 osmootsetesse minipumpadesse viimist ikka veel mitme nädala jooksul bioloogilist aktiivsust seondumisel oma retseptoritega VEGF retseptoriga 1 (nimetatakse ka Flt1) VEGF retseptoriga 2 (Flk1). Tõepoolest, kui me eemaldasime selle pumpadest kolme nädala pärast, siis seondus pumba jäänud VEGF-i jääkkogusest veel 89% ja 68% vastavalt Flt1 ja Flk1-ga, mis näitas seda, et suurem osa pumbas olevast rVEGF₁₆₄-st
30 omas veel aktiivsust. Kuna VEGF-i ei manustatud kunagi kesknärvisüsteemi pidevalt (pikim kestus oli üks nädal) ning VEGF-i lühiajalise ja pideva manustamise mõju võib olla erinev, siis olime ettevaatlikud hinnangu andmisel selle kohta, kas VEGF-i konkreetne annus stimuleerib motoneuroni elulemust ilma veresoonte ülemäärast kasvu

või leket põhjustamata isegi pärast pikemat, mitme kuu pikkust kohaletoimetamist. Esialgsetest eksperimentidest selgus, et rotid, kes said intratserebroventrikulaarselt VEGF-i suure annuse (näiteks 20 µg/kg/päev), surid mõne päeva jooksul. Annuse 2 µg/kg/päev korral haigestus 66% rottidest 3 kuni 4 nädala pärast. Kuigi nad ei olnud
 5 halvatud (loomad hakkasid tõukamisel normaalselt liikuma), olid nad üldjuhul apaatsed. Pea- ja seljaaju makroskoopilise vaatluse ja histoloogilise analüüsi tulemusena selgus, et pea- ja seljaaju esines veresoonte täiendav kasv, vatsakeste laienemine punetus ning turse. Rotid talusid hästi annuseid vahemikus 0,2 µg/kg/päev kuni 0,6 µg/kg/päev, need ei indutseerinud turset, leket või veresoonte kasvu isegi siis, kui manustamine toimus
 10 pidevalt enam kui 100 päeva jooksul. Sellise annuse korral ei õnnestunud CSF-is kindlaks teha VEGF-i sisaldust. SOD1^{G93A/LSd} rottidele (Sprague-Dawley päritoluga SOD1^{G93A} rotid, kellel on SOD1^{G93A} madal ekspressioon; vt näide 4) anti 0,6 µg VEGF/kg/päev. Selle annuse korral ei õnnestunud CSF-is kindlaks teha VEGF-i sisaldust, eeldatavalt seetõttu, et VEGF difundeerus kiiresti seljaaju parenhüümi. See on
 15 oluline, sest patoloogiaga seostati üksnes VEGF-i tuvastavat sisaldust⁴¹. Seetõttu kasutasime SOD1^{G93A} rottide ravimisel annust 0,6 µg VEGF/kg/päev. See annus oli isegi pärast korrigeerimist kogu organismi ja peaju/seljaaju vahelise suhtelise jaotusruumala alusel veel 5 korda väiksem terapeutilise angiogeneesi korral kasutatavast annusest³⁷. Kontrollkatses infundeeritud tehislükku peaju-seljaajuvedelikku (aCSF)
 20 taluti samuti pikema ajavahemiku jooksul hästi, mis näitas kirurgilise protseduuri ohutust. VEGF-i sellise väikese annuse järgmiseks eeliseks oli see, et see ei indutseerinud immuunreaktsiooni. Tõepoolest, rottide perifeerses veres või CSF-is ei õnnestunud leida antikehi isegi pärast VEGF-i annuste 0,2 µg/kg/päev kuni 0,6 µg/kg/päev kohaletoimetamist 100 päeva jooksul.

25

4. VEGF toime ALS-i rotimudeli korral

Eelnevalt ei ole SOD1^{G93A} rotte kasutatud ALS-i uudse ravi paradigma hindamisel. Me kasutasime Nagai *et al.* poolt aretatud Sprague-Dawley päritoluga (Sd) SOD1^{G93A/LSd} rotte¹⁰ („L“ vastab väikesele, näiteks SOD1^{G93A} 2 korda suurenenud sisaldusele selle
 30 mudeli korral). Selle mudeli korral progresseerub haigus väga agressiivselt, loomad hukuvad 10 päeva jooksul pärast haigestumist¹⁰. SOD1^{G93A/LSd} rottidel ilmnes suur pesakondadevaheline varieeruvus haiguse alguse suhtes, mis oli vahemikus 95 kuni 145 päeva. Selle varieeruvuse vähendamiseks kasutasime SOD1^{G93A/LSd} ühe pesakonna

liikmeid ja analüüsisime tulemusi paarikaupa (N = 17 rott, analüüsi 6 pesakonn paarina; üksikasju vt meetoditest). Võrdlemisel tehiskku CSF-i (aCSF) saanud kontrollrühmaga oli 0,6 µg EGF/kg/päev 60 päeva vanustel SOD1^{G93A/LSd} rottidel haiguse algus märgatavalt hilisem ning suurem lokomotoorne aktiivsus ja paremad üldised kliinilised tulemused hindamismeetodist olenemata. Näiteks jäid VEGF-iga ravitud SOD1^{G93A/LSd} rotid üldiselt aktiivsemateks, liikuvamateks, tähelepanelikumateks ja nad hoolitsesid oma karvastiku eest, samal ajal ilmnes CSF-loomadel juba halvatuse tunnuseid ja nad muutusid üha enam liikumatuteks ja kahhektilisteks. Kontroll-loomadel oli tugevam lihasatroofia kui VEGF-iga ravitud rottidel. VEGF-i kohaletoimetamisel ICV teel hilistus jäsemete halvatuse algus 10 päeva, seda hinnati tagakäpa lohistamise või liikumisel või suuna muutmisel esikäpa kasutamisetähtsuse kaudu. Laserikiirte põhineva detekteerimissüsteemi¹⁰ abil tegime kindlaks vanuse, mille korral ei olnud rotid enam võimelised läbima "aktiivsuspuuris" võrdse vahemaa taga olevaid laserikiiri vähemalt 1000 korda tunnis – see oli spontaanset liikumiskäitumise mõõduks. Pärast VEGF-i kohaletoimetamist jäid rotid spontaanselt aktiivseks vanemas eas (135 ± 5 päeva, aCSF-i korral 146 ± 8 päeva, VEGF; p < 0,05). Samuti võtsime rottide liikumise videolindile ja määrasime aja, mille vältel rotid uurisid oma puuri ja määrasime täiendava spontaanset aktiivsuse määrana rottide tagakäppadele tõusmise sageduse. Enne haiguse algust, see tähendab 110. päeval, uurisid mõlemad rühmad oma puuri aktiivselt ja tõusid tagakäppadele sama sagedusega (p = NS). Viie päeva pärast ilmnesid aCSF-rottidel esimesed jäsemete halvatuse tunnused, VEGF raviga saanud rotid uurisid oma puuri pikema aja jooksul ja tõusid tagakäppadele sagedamini kui aCSF-i saanud rotid (p < 0,05). Lõpuks pikendas VEGF selliste ALS rottide elulemust 10 päeva võrra (p < 0,01). Seega vaatamata haiguse väga kiirele progresseerumisele ja pesakondadevahelisele suurele varieeruvusele haiguse alguse suhtes algas SOD1^{G93A/LSd} rottide ravimisel VEGF-iga haigus hiljem, lokomotoorne aktiivsus parem ja elulemus suurem, seejuures ei ilmnunud kõrvaltoimeid.

5. VEGF-i neuroprotektiivse toime molekulaarne mehhanism

Seejärel uurisime mehhanisme, mille kaudu pikendas VEGF motoneuronite elulemust *in vivo*. *In vitro* uuringud näitasid, et VEGF kaitseb motoneuroneid stressi poolt indutseeritud rakusurma eest seondumisel VEGF retseptoriga 2 (mida nimetatakse ka Flk1)¹³, kuid VEGF-i otsest neurotroofset aktiivsust *in vivo* ei olnud kunagi näidatud.

Selleks saadi transgeensed hiired, milleks kasutati Thy1.2 ekspressioonikassetti, et saada hiire Flk1 ekspressioon postnataalses neuronites. Võrreldes mittetransgeensete pesakondade liikmetega ekspresseerisid Thy-Flk1 hiired suuremal arvul Flk1 mRNA transkripte (Flk1 koopiad / 10^3 HPRT koopiat: 470 ± 45 versus 50 ± 5 ; $N = 3$; $p < 0,05$) ja valku. Flk1 ekspressioon mittetransgeensete pesakondade liikmetes oli tuvastatav veresoontes ja väiksemates kogustes suurtes motoneuronites. Seevastu Thy-Flk1 hiirtes oli Flk1 suurem sisaldus ventraalsarve suurtes motoneuronites lisaks foonile vastavas ekspressioonis endoteelirakkudes. Thy-Flk1 hiired olid terved ja fertiilsed ning neid ristati SOD1^{G93A} hiirtega. On tähelepanuväärne, et Flk1 neuronaalne üleekspressioon SOD1^{G93A} hiirtes lükkas lokomotoorse aktiivsuse halvenemist edasi 23 päeva ($N = 8$; $p < 0,001$) ja Thy1-Flk1 : SOD1^{G93A} hiirte aktiivsus oli SOD1^{G93A} hiirte omast parem 26 päeva ($N = 8$; $p < 0,01$). Lisaks elasid Thy1-Flk1 : SOD1^{G93A} hiired 10 päeva kauem kui nende SOD1^{G93A} pesakonnaliikmed ($N = 8$, $p < 0,05$). Seega näitavad need geneetilised leiud, et Flk1 edastab motoneuronites endogeense VEGF-i olulisi elulemussignaale ja lükkab seetõttu edasi motoneuronite enneaegset degenerereerumist ALS-i korral. Flk1 neuroprotektiivse toime järgmine tõestus saadi transgeensete hiirte saamisega, milleks kasutati VEGF signaali halvendava dominant-negatiivse Flk1 (Flk1^{DN}) neuronalse ekspressiooni saamiseks sama Thy1.2 ekspressioonikassetti. Ka Thy-Flk1^{DN} hiired ekspresseerisid motoneuronites suuremas koguses Flk1^{DN} transgeene. 3 kuu vanused Thy-Flk1^{DN} hiired olid terved ja fertiilsed ning tavalise lihastoonuse, lokomotoorse aktiivsuse ja motoneuronite arvuga (SMI32⁺ motoneuronid/ventraalsarv: $31 \pm 4,4$, metsik-tüüpi hiired versus $29 \pm 1,2$, Thy-Flk1^{DN} hiired; $N = 4$; $p = \text{NS}$). Motoneuronite viimiseks stressiseisundisse pandi hiired 30 päeva jooksul üle päeva kambrisse, mis sisaldas 10% O₂. Krooniline vahelduv hüpoksia reguleeris VEGF-i sisalduse seljaajus üles (pg VEGF / µg valk: $12 \pm 0,5$, normoksia versus $22 \pm 1,4$, hüpoksia; $N = 5$; $p < 0,05$). Metsik-tüüpi hiired talusid hüpoksiat probleemideta ning nende haarde tugevus isegi suurenes mõnevõrra. Vastupidiselt sellele kaotasid Thy-Flk1^{DN} hiired ühe nädala jooksul pärast hüpoksia tingimustes olemist oma haarde tugevusest 25% ja see jäi nõrgemaks kogu ülejäänud eksperimendiaja vältel. Histoloogilisel analüüsil ilmnas Thy-Flk1^{DN} hiirtel hallaine märgatav gliosis, kuid see puudus metsik-tüüpi hiirtel (GFAP⁺ pindala / hallaine pindala ventraalsarves: $0,13 \pm 0,45\%$, metsik-tüüp versus $2,7 \pm 0,45\%$, Thy-Flk1^{DN}; $N = 3-5$; $p < 0,05$). Lisaks akumulatsioonid Thy-Flk1^{DN} hiirte

motoneuronid erinevalt metsik-tüüpi hiirtest fosforüülitud neurofilamente (SMI31⁺ neuronid / 10 ventraalsarve sektsiooni: metsik-tüüpi hiirtel mitte ühtki *versus* $15,3 \pm 7,2$ Thy-Flk1^{DN} korral; N = 3–5; p < 0,05). Need leiud näitavad, et Flk1 mängib määravat kaitsvat osa täiskasvanute motoneuronite säilimisel hüpoksilise stressi tingimustes.

5

Materjalid ja meetodid

1. Rekombinantse VEGF₁₆₄ (VEGF₁₆₄) roti saamine

- 10 Roti cDNA teegist amplifitseeritud VEGF₁₆₄ cDNA klooniti pZICZocA sekretsioonivektorisse ja ekspresseeriti pärmiseene *Pichia pastoris* ekspressioonisüsteemis vastavalt tootjapoolsetele (Invitrogen, Carlsbad, CA) juhistele. Pärast pärmiseentega konditsioneeritud söötme öö läbi kestnud dialüüsi 10 mM äädikhappe suhtes (pH 5,5) puhastati VEGF järjestikulise kromatografeerimisega
- 15 fenüülsefaroosi 6 Phastflow ja hepariin-agaroos kolonnides (mõlemad saadi firmast Amersham Pharmacia Biotech). VEGF-i kontsentratsioon määrati roti Duoset ELISA (R&D Systems, Abingdon, Ühendkuningriik) abil. Seejärel elektroforeesiti puhastatud VEGF₁₆₄ ja üksikud 45 kDa ja 22 kDa ribad, mis olid värvitud vastavalt mitteredutseerivates ja redutseerivates tingimustes, visualiseeriti geelide värvimisel
- 20 *coomassie blue* ja hõbedaga. Riba vastavus roti rekombinantsele VEGF₁₆₄-le leidis kinnitust immunoblottimisel rVEGF₁₆₄ suhtes spetsiifilise monoklonaalse antikehaga (R&D Systems) ja N-otsa järjestamisel pärast lõhustamist Edmani degradatsiooni protokoll järgi. Pärast silmapaistva 45 kDa riba lõhustamist trüpsiiniga, millele järgnes lõhustatud peptiidide eraldamine denatureeriva HPLC (dHPLC) meetodil, valiti 3
- 25 sisemist peptiidi ja nende N-otsad järjestati Edmani degradatsiooni protokoll järgi. Kõigi kolme peptiidi korral saadi täpne vastavus VEGF₁₆₄ publitseeritud aminohappelisele järjestusega.

2. VEGF₁₆₄ funktsionaalne iseloomustus

- 30 Meie VEGF₁₆₄ preparaadi seondumist immobiliseeritud rhFc-FLT1 ja rhFc-FLK1 (R&D Systems) retseptoritega võrreldi müügiloleva roti VEGF₁₆₄ seondumisega. Seondunud VEGF tuvastati biotinüülitud anti-roti VEGF antikehade (R&D Systems, 200 ng/ml), ABC vektori värvimiskomplekti ja fotospektromeetrite mõõtmistega.

Omavalmistatud VEGF₁₆₄ oli suurema afiinsusega rhFc-FLK1 suhtes ja samasuguse seondumisafiinsusega rhFc-FLT1 suhtes. Endotoksiinide sisaldus määrati limuluse amöbotsüüdi lüsaadi (LAL) komplekti abil (Bio-Whittaker, Walkersville, USA) ja selleks saadi 1 endotoksiini ühik 350 µg VEGF₁₆₄ kohta (või 3 E10-3 endotoksiini ühikut 1 µg VEGF₁₆₄ kohta).

3. Eksperimendid radiomärgise kasutamisega

Radiomärgistatud inimese ¹²⁵I-VEGF osteti firmast Amersham Pharmacia, selle eriaktiivsus oli 25 µCi / µg VEGF₁₆₅. 100 ng seda preparaati lahustati 10 µl ja süstiti stereotaktiliselt terve emase Wistar-liini roti vasakpoolsesse lateraalventriikulisse suurusega 33 Hamiltoni nõela abil – stereotaktilised koordinaadid olid samad osmootse pumba implanteerimisel kasutatutega (vt allpool). Pärast ICV süstimist lahati rotid 1, 3 ja 24 tunni möödumisel ja peaju, seljaaju (jagatud seljaaju tservikaal-, torakaal- ja lumbaalpiirkonnaks), veri ja ülejäänud organid (maks, sooled, süda jne) kaaluti ja gammakiirguse loenduri abil määrati lugemite arv minutis (cpm). ¹²⁵I-hVEGF₁₆₅ jaotust peaju parenhüümis hinnati mikroautoradiograafiliselt. Esmalt kasteti pea- ja seljaaju külmutatud lõigud, mis sisaldasid ¹²⁵I-märgisega VEGF₁₆₅, fotoemulsiooni (Kodak, Cedex, Prantsusmaa). Pärast kahepäevast kiirguse toimet ilmutati emulsiooniga kaetud lõigud ja hõbedaterade valgusmikroskoopiliselt määratud asukohti kasutati ¹²⁵I-märgisega VEGF₁₆₅ jaotuse määramiseks kudedes.

4. Transgeensete hiirte saamine ja iseloomustus

Transgeensed hiired, kes ekspresseerisid Flk1 spetsiifiliselt täiskasvanud loomade neuronites, saadi hiire Thy1.2 ekspressioonikasseti abil vastavalt eelnevalt toodud kirjeldusele ⁵⁹. Hiire Flk1 cDNA klooniti Thy1.2 ekspressioonikassetti ja lineariseeritud konstrukt mikrosüstiti FvB hiire embrüosse mikrosüstimise standardse meetodi abil. Seda kandvad loomad identifitseeriti PCR abil ja transgeeni ekspressioon määrati RT-PCR, *western bloti* ja immunovärvimise meetoditega vastavalt eelnevalt kirjeldatule ^{13, 37}.

5. Loomad

Inimese SOD1^{G93A} transgeeni (SOD1^{G93A}-L) ekspresseerivad Sprague-Dawley rotid saadi vastutuleku korras dr Itoyamalt ¹⁰, seejuures ristati inimese SAD1^{G93A} transgeeni

ekspresseerivad hiired enam kui 10 põlvkonna jooksul FvB alusel ja need saadi vastutuleku korras dr C. Kunstilt⁶⁰. Kõik loomkatsed olid heaks kiidetud kohaliku loomade heaolu ja eetikakomitee poolt.

5 6. Kirurgilised protseduurid

Roti rekombinantse VEGF₁₆₄ infundeerimiseks rottide peaaju ventriikulitesse kasutati osmootseid pumpi Alzet (mudel 2004), mis olid kateetri abil ühendatud peaajju infundeerimiseks kasutatava kanüüliga. Peaajju infundeerimiseks kasutatav süsteem täideti 200 µl roti rekombinantset VEGF₁₆₄ 5 µg/ml sisaldava lahuse või tehislaku CSF-iga ja konditsioneeriti 48 tundi soolalahuses. Tehislaku CSF-i koostis oli 150 mM Na⁺, 3 mM K⁺, 1,4 mM Ca²⁺, 0,8 mM Mg²⁺, 1 mM PO₄³⁻, 155 mM Cl⁻. Pumpade implanteerimiseks anesteseeriti rotid halotaaniga, tehti veidi silmade tagant algav keskne sagitaalne sisselõige ja paljastati kolju. Roti seljale tehti skapulaarpiirkonnas subkutaanne tasku ja taskusse paigaldati osmootne pump. Koljusse puuriti auk ja kanüül paigaldati kohta, mille stereotaktilised koordinaadid olid: 0,8 mm tagapool pärg- ja noolõmbluse ühinemiskohast, kolju pinna suhtes 1,6 mm lateraalselt ja 4,5 mm ventraalselt. Kui implanteerimisprotseduur oli lõppenud, õmmeldi nahasse tehtud sisselõige kinni ja rotil lasti taastuda. 28 päeva pärast asendati tühjenenud osmootne pump uue, äsja täidetud ja konditsioneeritud osmootse pumbaga. Selleks anesteseeriti rott uuesti ja selja skapulaarpiirkonna keskosas tehti nahasse väike sisselõige. Kateeter lõigati 5 mm kaugusel toitepumbast läbi ja uus pump ühendati kateetri toruga. Selle protseduuri tulemuseks oli VEGF₁₆₄ pidev infusioon CSF-i kiirusega 0,25 µl/h (vastab 1,25 ng VEGF-ile tunnis). Ennetamise uuringus implanteeriti pump 60 päeva vanuselt ning regressiooni uuringus implanteeriti pump 80 päeva vanuselt (haiguse alguse ajal).

25 Hiired allutati vahelduvale kroonilisele hüpoksiale, viies neid 30 päeva jooksul üle päeva hapnikukambrisse, mis sisaldas 12% hapnikku.

7. Käitumise analüüs

30 Rottide lokomotoorset aktiivsust testiti kolm korda nädalas, kasutades pöörlevat silindrit, dünamomeetrit ja spontaanse aktiivsuse määramist. Kasutati rottidele mõeldud pöörlevat silindrit (Ugo Basile, Comerio VA, Itaalia), mis pöörles konstantse kiirusega 815 pööret minutis). Antud päeval tehti keskmiselt 5 katset maksimaalse kestusega 180 sekundit. Kui rott suutis pöörleval silindril püsida keskmiselt alla 120 sekundi, siis loeti

katse ebaõnnestunuks. Dünamomeetrilises testis tehti iga roti korral keskmiselt 5 katset ja kui rott ei olnud võimeline tõmbama keskmiselt 800 mg jõuga, siis loeti katse ebaõnnestunuks. Spontaanse aktiivsuse kvantifitseerimiseks paigutati rotid 3 tunniks aktiivsuse määramiseks kasutatavasse puuri (Ugo Basile) ja arvutati keskmine aktiivsus, see tähendab kordade arv, mil rott katkestas puuri põrandast 10 cm kõrgusel oleva infrapunakiire. Haiguse algusele vastava hinnangulise vanuse kriteeriumina kasutati liikumisel ühe käpa lohistamist. Eelnevates uuringutes hinnati looma võimetust 30 sekundi jooksul end püsti ajada pärast küljele pööramist kui „kliinilist surma“⁹. Siiski näitasid esialgsed eksperimendid, et SOD1^{G93A} rotid võisid siiski elada veel paar päeva pärast seda, kui nad ei olnud võimelised end küliliasendist püsti ajama, see oli eelkõige nii esikäpa kahjustusega rottide korral. Seetõttu lugesime surma ajaks seda päeva, mil rotid olid kaotanud oma viimasele presümptomaatilisele vanusele vastavast keha esialgsest massist 40%, sest eksperimentide alusel hukkusid loomad siis 24–36 tunni pärast. Kirjeldatud kliinilistes testides saadud andmeid ja elulemusandmeid analüüsiti Kaplan-Meieri statistilise analüüsi või ANOVA kordusmõõtmistega (pöörlev silinder, dünamomeeter ja aktiivsus) analüüsi alusel.

8. Histoloogia, immunohistokeemia ja ELISA analüüsid

Nembutaaliga anesteseeritud loomadest voolutati transkardiaalselt läbi 0,9% NaCl lahus ja seejärel 1% fosfaatpuhverdatud paraformaldehüüd. Seljaaju ja peaaju lõigati välja, fikseeriti öö läbi samas fikseerivas segus, dehüdrateeriti ja sisestati parafiini. Peaajust tehti rida 20 µm paksuseid ja seljaajust 7 µm paksuseid lõikeid. Immunohistokeemilises analüüsis kasutati järgmisi primaarseid antikehi: hiire anti-SMI-32 ja hiire anti-SMI-31 (mõlemad 1 : 500, Sternberger Monoclonals); hiire anti-GFAP (1 : 400, Sigma); kitse anti-Glut-1 (1 : 20, Santa Cruz Biotechnology); küüliku anti-ubikvitiin (1/100, Dako) ja küüliku anti-albumiin (1 : 250, ICN/Cappel). Motoneuronite loendamiseks seljaajus loendati bilateraalselt ventraalsarves SMI-32-positiivsed neuronid, mis paiknesid 5 võrdse vahekauguse, 350 µm, taga olevas lõigus. Motoneuronite arvu määramiseks fatsiaalses närvirakkude kogumis värviti iga 10. peaaju lõik ja loendati kõik fatsiaalse närvirakkude kogumi piirkonnas olevad SMI-32-positiivsed neuronid. Fatsiaalses närvirakkude kogumikus olevate

motoneuronite koguarvu hindamiseks korrutati see arv 10-ga.

9. Immuunvastus

VEGF₁₆₄ sisaldus seljaajus ja plasmas oli allpool ELISA avastamispiiri ((32,5 pg/ml; R&D Systems) nii aCSF- kui ka VEGF-saanud hiirte korral (mõlema rühma korral n = 7). Selleks, et leida, kas VEGF-saanud hiirtes tsirkuleerivad anti-VEGF antikehad, kaeti 96süvendiga mikrotiiterplaat üheks ööks 100µl VEGF₁₆₄ 1µl/ml valgu lahusega. Pärast inkubeerimist aCSF- või VEGF-saanud rottidest pärineva plasma või CSF-iga määrati seondunud anti-VEGF₁₆₄ antikehad HRP-märgisega anti-roti immunoglobuliinide (DAKO: 200 ng/ml), ABC vektori värvimiskomplekti ja fotospektromeetriliste mõõtmiste abil.

10. Statistika

Kõikide statistiliste arvutuste tegemiseks kasutati SPSS versiooni 10. Kumulatiivne elulemusstatistika arvutati Kaplan-Meieri statistika alusel. Spontaanse aktiivsuse ja pöörleva silindri korral saadud ja kehamassi vähenemise andmeid analüüsiti kordusmõõtmistega ANOVA alusel. Histoloogilistes uuringutes oluliste erinevuste arvutamiseks kasutati Studenti *t*-testi.

20 Viited

1. Przedborski, S., Mitsumoto, H. & Rowland, L. P. Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis research. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 3, 70–7 (2003).
2. Brown, R. H., Jr. & Robberecht, W. Amyotrophic lateral sclerosis: pathogenesis. *Semin. Neurol.* 21, 131–9 (2001).
- 25 3. Rothstein, J. D. Of mice and men: reconciling pre-clinical ALS mouse studies and human clinical trials. *Ann. Neurol.* 53, 423–6 (2003).
4. Friedlander, R. M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med.* 348, 1365–75 (2003).
5. Andersen, P. M. Genetics of sporadicALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor. Neuron. Disord.* 2 Suppl. 1, S37–41 (2001).
- 30 6. Strong, M. & Rosenfeld, J. Amyotrophic lateral 45 sclerosis: a review of current concepts. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor. Neuron. Disord.* 4, 136–43 (2003).

7. Cleveland, D. W. & Rothstein, J. D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 806–19, (2001).
8. Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y. *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772–5 (1994).
- 5 9. Howland, D. S., Liu, J., She, Y. *et al.* Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1604–9 (2002).
- 10 10. Nagai, M., Aoki, M., Miyoshi, I. *et al.* Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J. Neurosci.* 21, 9246–54 (2001).
11. Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669–76 (2003).
12. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653–60 (2003).
13. Oosthuysen, B., Moons, L., Storkebaum, E. *et al.* Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* 28, 131–8 (2001).
- 15 14. Lambrechts, D., Storkebaum, E., Morimoto, M. *et al.* VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat. Genet.* 34, 383–94 (2003).
- 20 15. Storkebaum, E. & Carmeliet, P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 113, 14–8 (2004).
16. Miller, R. G., Mitchell, J. D., Lyon, M. & Moore, D. H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) / motor neuron disease (MND). *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor. Neuron. Disord.* 4, 191–206 (2003).
- 25 17. Acsadi, G., Anguelov, R. A., Yang, H. *et al.* Increased survival and function of SOD1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 13, 1047–59 (2002).
18. Kaspar, B. K., Llado, J., Sherkat, N., Rothstein, J. D. & Gage, F. H. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 301, 839–42
- 30 (2003).
19. Ochs, G., Penn, R. D., York, M. *et al.* A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor. Neuron.*

- Disord. 1, 201–6 (2000).
20. Miller, R. G., Petajan, J. H., Bryan, W. W. *et al.* A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann. Neurol.* 39, 256–60 (1996).
- 5 21. Lai, E. C., Felice, K. J., Festoff, B. W. *et al.* Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study Group. *Neurology* 49, 1621–30 (1997).
22. Borasio, G. D., Robberecht, W., Leigh, P. N. *et al.* A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I Study
10 Group. *Neurology* 51, 583–6 (1998).
23. Boyd, J. G. & Gordon, T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur. J. Neurosci.* 15, 613–26 (2002).
24. Raoul, C. & Aebischer, P. ALS, IGF-I and gene 5 therapy: 'it's never too late to mend'. *Gene Ther.* 11, 429–30 (2004).
- 15 25. Windebank, A. J. Use of growth factors in the treatment of motor neuron diseases. *Adv. Neuro / 68*, 229–34 (1995).
26. Masu, Y., Wolf, E., Holtmann, B. *et al.* Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365, 27–32 (1993).
- 20 27. Giess, R., Holtmann, B., Brag, M. *et al.* Early onset of severe familial amyotrophic lateral sclerosis with a SOD1 mutation: potential impact of CNTF as a candidate modifier gene. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1277–86 (2002).
28. D'Ercole, A. J., Ye, P. & O'Kusky, J. R. Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides* 36, 209–20 (2002).
- 25 29. Gao, W. Q., Shinsky, N., Ingle, G. *et al.* IGF-I deficient mice show reduced peripheral nerve conduction velocities and decreased axonal diameters and respond to exogenous IGF-I treatment. *J. Neurobiol.* 39, 142–52 (1999).
30. Ernfors, P., Lee, K. F. & Jaenisch, R. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368, 147–50 (1994).
- 30 31. Moore, M. W., Klein, R. D., Farinas, I. *et al.* Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 76–9 (1996).
32. Sanchez, M. P., Silos-Santiago, I., Frisen, J. *et al.* Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 70–3 (1996).

33. Orrell, R. W., King, A. W., Lane, R. J. & de Bellerocche, J. S. Investigation of a null mutation of the CNTF gene in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 132, 126–8 (1995).
34. Azari, M. F., Lopes, E. C., Stubna, C. *et al.* Behavioural and anatomical effects of systemically administered leukemia inhibitory factor in the SOD1 (G93A G1H) mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* 982, 92–7 (2003).
35. Feeney, S. J., Austin, L., Bennett, T. M. *et al.* The effect of leukaemia inhibitory factor on SOD1 G93A murine amyotrophic lateral sclerosis. *Cytokine* 23, 108–18 (2003).
36. Ramer, M. S., Bradbury, E. J., Michael, G. J., Lever, I. J. & McMahon, S. B. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in sensory and motoneurons in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2713–21 (2003).
37. Luttun, A., Tjwa, M., Moons, L. *et al.* Revascularization of ischemic tissue sby PIGF-treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat. Med.* 8, 831–40 (2002).
38. Thorne, R. G. & Frey, W. H., 2nd. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations. *Clin. Pharmacokinet.* 40, 907–46 (2001).
39. Yamaguchi, S., Iwata, K. & Shibuya, M. Soluble Flt-1 (soluble VEGFR-1), a potent natural antiangiogenic molecule in mammals, is phylogenetically conserved in avians. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 554–9 (2002).
40. Luttun, A., Autiero, M., Tjwa, M. & Carmeliet, P. Genetic dissection of tumor angiogenesis: are PIGF and VEGFR-1 novel anti-cancer targets? *Biochim. Biophys. Acta* 1654, 79–94 (2004).
41. Stockhammer, G., Poewe, W., Burgstaller, S. *et al.* Vascular endothelial growth factor in CSF: a biological marker for carcinomatous meningitis. *Neurology* 54, 1670–6 (2000).
42. Marti, H. H. & Risau, W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15809–14 (1998).
43. Nutt, J. G., Burchiel, K. J., Comella, C. L. *et al.* Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 60, 69–73 (2003).

44. Veldink, J. H., Bar, P. R., Joosten, E. A. *et al.* Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul. Disord.* 13, 737–43 (2003).
45. Lino, M. M., Schneider, C. & Caroni, P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J. Neurosci.* 22, 4825–32 (2002).
46. Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D. *et al.* Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* 9, 936–43 (2003).
47. Airaksinen, M. S. & Saarma, M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 383–94 (2002).
48. Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. US. A* 99, 11946–50 (2002).
49. Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L. & Montesano, R. Leukemia inhibitory factor(LIF) inhibits angiogenesis in vitro. *J. Cell. Sci.* 108 (Pt 1), 73–83 (1995).
50. Ruprecht, K., Stadelmann, C, Hummel, V. *et al.* Brain derived neurotrophic factor does not act on adult human cerebral endothelial cells. *Neurosci. Lett.* 330, 175–8 (2002).
51. Koh, S. W. Ciliary neurotrophic factor released by corneal endothelium surviving oxidative stress ex vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 2887–96 (2002).
52. Louissaint, A., Jr., Rao, S., Leventhal, C. & Goldman, S. A. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* 34, 945–60 (2002).
53. Weston, G. C., Haviv, I. & Rogers, P. A. Microarray analysis of VEGF-responsive genes in myometrial endothelial cells. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 855–63 (2002).
54. Giess, R., Beck, M., Goetz, R. *et al.* Potential role of LIF as a modifier gene in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 54,1003–5 (2000).
55. Stormont, J. M., Meyer, M. & Osol, G. Estrogen augments the vasodilatory effects of vascular endothelial growth factor in the uterine circulation of the rat. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183, 449–53 (2000).
56. Lissbrant, I. F., Hammarsten, P., Lissbrant, E. *et al.* Neutralizing VEGF bioactivity with a soluble chimeric VEGF-receptor protein flt(1-3)IgG inhibits

testosterone-stimulated prostate growth in castrated mice. *Prostate* 58, 57–65 (2004).

57. Tsuzuki, Y., Fukumura, D., Oosthuyse, B. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1 alpha--> hypoxia response element-> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in
5 tumors. *Cancer Res.* 60, 6248–52 (2000).

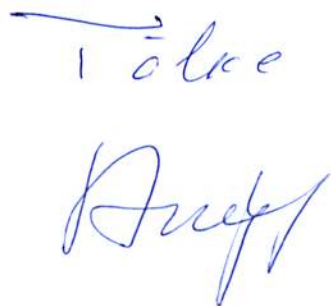
58. Krum, J. M., Mani, N. & Rosenstein, J. M. Angiogenic and astroglial responses to vascular endothelial growth factor administration in adult rat brain. *Neuroscience* 110, 589–604 (2002).

59. Caroni, P., Schneider, C, Kiefer, M.C. & Zapf, J. Role of muscle insulin-like growth
10 factors in nerve sprouting: suppression of terminal sprouting in paralyzed muscle by IGF-binding protein 4. *J. Cell Biol.* 125,893–902 (1994).

60. Kunst, C. B., Messer, L., Gordon, J., Haines, J. & Patterson, D. Genetic mapping of a mouse modifier gene that can prevent ALS onset. *Genomics* 70, 181–9 (2000).

PATENDINÕUDLUS

1. VEGF₁₆₅ kasutamiseks motoneuronite haiguste raviks, mille korral manustatakse VEGF₁₆₅ pidevalt kuni 4 nädala jooksul alates haiguse ilmumisest annuste vahemikus 0,01 µg/kg/päev kuni 0,6 µg/kg/päev.
- 5 2. VEGF₁₆₅ kasutamiseks vastavalt punktile 1, mis e r i n e b selle poolest, et vahemik on 0,01 µg/kg/päev kuni 0,2 µg/kg/päev.
3. VEGF₁₆₅ kasutamiseks vastavalt punktile 1, mis e r i n e b selle poolest, et vahemik on 0,01 µg/kg/päev kuni 0,1 µg/kg/päev.
4. VEGF₁₆₅ kasutamiseks vastavalt punktile 1, mis e r i n e b selle poolest, et vahemik
10 on 0,01 µg/kg/päev kuni 0,08 µg/kg/päev.
5. VEGF₁₆₅ kasutamiseks vastavalt punktile 1, mis e r i n e b selle poolest, et vahemik on 0,01 µg/kg/päev kuni 0,06 µg/kg/päev.
6. VEGF₁₆₅ kasutamiseks vastavalt ükskõik millisele punktile 1 kuni 5, mis e r i n e b selle poolest, et manustamine on intratekaalne.
- 15 7. VEGF₁₆₅ kasutamiseks vastavalt ükskõik millisele punktile 1 kuni 5, mis e r i n e b selle poolest, et manustamine on intratserebroventrikulaarne.
8. VEGF₁₆₅ kasutamiseks vastavalt ükskõik millisele punktile 1 kuni 5, mis e r i n e b selle poolest, et VEGF-i pidev manustamine toimub implanteeritud osmootse minipumba abil.
- 20 9. VEGF₁₆₅ kasutamiseks vastavalt ükskõik millisele punktile 1 kuni 8, mis e r i n e b selle poolest, et motoneuroni haigus on amüotroofne lateraalskleroos.


 tõlke õigsust kinnitan
 ARNO ANKIJALG
 patendivolinik

Taht, 22. 10. 2010