

# Активность препаратов ботулинического токсина типа А при клиническом применении

Andy Pickett, Naveed Panjwani and Roderic S. O'Keefe

Technical Affairs, Ipsen Limited, 190 Bath Road, Slough, SL1 3XE, U.K.



В настоящее время при лечении очаговых неврологических расстройств широко используют ботулинический токсин типа А. Активность двух основных препаратов, Dysport® и BOTOX® определяется с помощью теста ЛД<sub>50</sub> на мышах, однако различия в методиках этих тестов не позволяют провести прямое сравнение единиц биологической активности этих препаратов. Ранее мы опубликовали данные о том, что одна единица BOTOX® эквивалентна примерно трем единицам Dysport® при оценке с помощью метода, использовавшегося для определения величины ЛД<sub>50</sub> для Dysport®. Это соотношение, равное примерно 3:1, широко опробировалось в клинической практике, и оно оказалось полезным для сравнения препаратов во многих областях применения.

В литературе имеется много данных относительно образования антител при клиническом применении продуктов, содержащих токсин типа А. Выработка антител приводит к вторичной толерантности к ботулиническим токсинам. Считается, что важным фактором в формировании иммуногенной реакции при клиническом применении токсина является белковая нагрузка. Иммуногенность увеличивается с возрастанием белковой нагрузки токсина в расчете на одну дозу.

Мы сравнили белковую нагрузку на единицу ЛД<sub>50</sub> для Dysport® и BOTOX®, используя как ранее опубликованные, так и недавно полученные данные, и представили данные, которые демонстрируют постоянство характеристик партий токсина Dysport® в течение многих лет и, следовательно, неизменность белковой нагрузки на единицу активности токсина. Такое же детальное сравнение для BOTOX® было проведено только на двух партиях токсина, использовавшегося в клиниках (одна из них уже не используется), которые значительно отличались друг от друга при таком сравнении белковой нагрузки.

На основании прямого сравнения имеющихся данных мы установили, что BOTOX® (применяющийся в настоящее время) содержит 5 нанограмм белка токсина на флакон, содержащий 100 единиц ЛД<sub>50</sub> BOTOX®, а Dysport® содержит 5 нанограмм белка токсина на флакон, содержащий 500 единиц ЛД<sub>50</sub> Dysport®. Однако, с учетом того, что отношение активностей составляет, примерно, 3:1, доза 100 единиц ЛД<sub>50</sub> препарата BOTOX®, которая содержит 5 нанограмм белка токсина, эквивалентна дозе 300 единиц ЛД<sub>50</sub> препарата Dysport® (соответствующей 3 нанограммам белка токсина в препарате Dysport®). Следовательно, эти данные показывают, что препарат Dysport® содержит на 40% меньше белка, по сравнению с эквивалентной дозой BOTOX®.

нем. В 2002 году Управлением контроля качества лекарств и пищевых продуктов США (FDA) разрешило применение BOTOX® для лечения морщин в области надпереносья под коммерческим названием BOTOX® Cosmetic.

Активность этих двух препаратов, Dysport® и BOTOX®, определяли на мышах по величине ЛД<sub>50</sub>. Тем не менее, различия в методологии тестов и методах анализа данных не позволяют непосредственно сравнивать единицы биологической активности. Ранее мы опубликовали данные о том, что одна единица BOTOX® эквивалентна примерно трем единицам Dysport® при определении ЛД<sub>50</sub> с помощью метода, применявшегося для Dysport® (Hambleton & Pickett). Основной причиной такого различия считается различие буферных растворов, которые использовали для разбавления во время испытания. О значении этого различия буферов сообщалось также в работе Sawtell & Ream (1996). Насколько нам известно, публикаций, в которых сравнивались два препарата по методике определения ЛД<sub>50</sub>, больше не было. Такое соотношение, примерно 3:1, было широко изучено и подтверждено во многих областях клинического применения (Marrion 1995, Whurr 1995, Sheean 1996, Odergren 1998, van den Bergh 1998, Tidswell 2001, Poewe 2002, Ranoux 2002).

В литературе имеется ряд публикаций, в которых обсуждается образование антител при клиническом применении продуктов, содержащих токсин типа А, которое приводит к вторичной толерантности. (Jankovic 1995, Kessler 1997 & 1999, Goschel 1997, Hanna 1998 & 1999, Palace 1998, Rollnik 2001, Dressler 2002, Racette 2002). Важным фактором в формировании иммуногенного ответа при клиническом применении токсина для большинства белковых препаратов считается белковая нагрузка в расчете на дозу. Иммуногенность может возрастать при увеличении нагрузки белка токсина в расчете на дозу. При повторном введении дозы, может быть вызвана иммунная реакция, как это происходит, например, при любом режиме вакцинации, когда один и тот же белок вводят повторно. Потеря ответной реакции при повторном введении может быть связана не только с образованием антител против токсина, однако в значительном числе таких случаев было показано, что именно образование антител является причиной потери реакции на лечение.

Мы сравнили белковую нагрузку на единицу ЛД<sub>50</sub> препаратов Dysport® и BOTOX®, используя как ранее опубликованные, так и новые данные, и представляем здесь наши данные с учетом результатов исследования ЛД<sub>50</sub> данных препаратов.

## Введение:

В настоящее время при лечении очаговых неврологических расстройств в клинике широко используют ботулинический токсин типа А.

Имеется два основных коммерческих препарата токсина типа А, а именно Dysport® (компания Ipsen) и BOTOX®, (компания Allergan Inc.). В Соединенном Королевстве применение Dysport® было разрешено в декабре 1990 г., первоначально для лечения блефароспазма и гемифациального спазма. В настоящее время применение препарата разрешено во многих странах для других показаний, включая кривошею (дистонию шейных мышц) и спастичность после инсульта. Применение BOTOX® было разрешено с 1989 г. с показаниями аналогичными тем, которые Dysport® получил со време-

## BOTOX®:

Мы составили обзор литературы, с целью определить специфическую активность BOTOX® при клиническом применении и эти результаты представлены в таблице 1.

В данных имеющихся в литературе мы смогли выявить только две партии токсина BOTOX®, которые использовали в клинике и которые имели номера 79-11 и ВСВ2024. Эти партии токсина были названы пользователями «Старый BOTOX®» и «Новый BOTOX®». Новый BOTOX® в конце 1997 г. был разрешен Управлением контроля качества лекарств и пищевых продуктов США (FDA) для применения и имел более высокую специфическую активность, чем Старый BOTOX® (Aoki 1999).

Не смотря на то, что Старый BOTOX®, насколько нам известно, больше не используется в клинической практике, мы включили в таблицу 1 те данные, которые нам удалось найти. Как видно из таблицы 1, в большом количестве работ, выполненных на этих двух партиях токсина, прямо указана специфическая активность материала. В частности, специфическая активность препаратов BOTOX® и BOTOX® Cosmetic указаны в соответствующей информации для врачей о каждом из этих двух препаратов. Эта информация для врачей была утверждена FDA.

На основании полученных нами данных можно установить специфическую активность 5 нанограммов белка токсина во флаконе, содержащем 100 единиц ЛД<sub>50</sub> препарата. В таблицу 1 включены наши расчеты, с помощью которых получено это значение.

**Таблица 1**  
**Обзор данных по специфической активности BOTOX®:**

Год	Ссылка	Партия	Единиц на нанограмм	Нанограмм на единицу	Нанограмм на флакон
1986	Tsui и др.		2,5	0,4	40*
1988	Lange и др.		2,5*	0,4	40
1989	Quinn & Hallett		2,5*	0,4	40
1992	Goodnough & Johnson		2,5*	0,4	40
1996	Borodic и др.		2,3*	0,43	43,5
1996	Borodic и др.	79-11	от 2 до 4*	от 0,5 до 0,25	50-25
1997	Goschel и др.		4	0,25	25*
1999	Aoki		4	0,25	25*
2002	Naumann и др.		4	0,25	25*
2002	Racette и др.		4	0,25	25*
2003	Jackovic и др.		4	0,25	25*
1999	Aoki		20,8	0,05	4,8*
2002	Naumann и др.		20	0,05	5*
2002	Racette		20,8	0,05	4,8*
2002	Allergan, Inc	BCB2024	20*	0,05	5
2002	Allergan, Inc		20*	0,05	5
2003	Jackovic и др.		20	0,05	5*

\* Значение, приведенное в ссылке

## Ссылки (в том же порядке, как они приведены выше):

Tsui и др., 1986. Двойное слепое исследование ботулинического токсина при спастической кривошее. *The Lancet*, 1986, Aug 2, 245-246.

Lange и др., 1988. Отдаленные последствия местного введения ботулинического токсина: частота и течение. *Adv. Neurol*, 1988, 50, 609-613.

Quinn & Hallett, 1989. Стандартизация доз ботулинического токсина (письмо в редакцию). *The Lancet*, 1989, Apr 29, 964.

Goodnough & Johnson, 1992. Стабилизация ботулинического токсина типа А при лиофилизации. *Appl Env Microbiol*, 1992, 3426

Borodic и др., 1996. Обзор: Лечение ботулиническим токсином, иммунологическая устойчивость и трудности связанные с имеющимися материалами. *Neurology* 1996, 46, 26-29.

Goschel и др., 1997. Лечение ботулиническим токсином типа А: нейтрализующие и ненейтрализующие антитела - Терапевтические последствия. *Exp Neurol*, 1997, 147, 96-102.

Aoki, 1999. Новые доклинические данные по BOTOX (ботулинический токсин типа А) - очищенному комплексу нейротоксина относительно других препаратов ботулинического токсина. *Eur J Neurol* 1999 6(S4), S3-S10.

Naumann и др., 2002. Рандомизированное, двойное слепое, перекрестное сравнение эффективности и безопасности ботулинического токсина типа А, полученного из исходного нерасфасованного токсина и имеющегося нерасфасованного токсина для лечения дистонии шейных мышц. *J Neurol*, 2002, 249, 57-63.

Racette и др., 2002. Отсутствие реакции при повторном применении нового нерасфасованного ботулинического токсина А (BCB2024). *Mov Disord*, 2002, 17, 5, 1098-1100.

Jankovic и др., 2003. Сравнение эффективности и иммуногенности исходного и имеющегося ботулинического токсина при дистонии шейных мышц. *Neurology*, 2003, 60, 1186-1188.

Компания Allergan, Inc. BOTOX® (ботулинический токсин типа А) очищенный комплекс нейротоксина, Информация для врачей, вариант исправленный в июле 2002.

Компания Allergan, Inc. BOTOX® Косметический (ботулинический токсин типа А) очищенный комплекс нейротоксина, Информация для врачей, вариант исправленный в июле 2002.

## Dysport® :

Компания Ipsen ранее не публиковала значений специфической активности для партий нерасфасованного токсина препарата Dysport®. Ранее, Stell и др. (1988) и Quinn и Hallett (1989) описали продукт "Портон-Даун" (Porton Down) или "Английский комплекс токсин-геммагглютинин", но эти отчеты были предназначены для получения разрешения на применение, и продукты имели другую форму. Они сообщили, что содержание белка в этом продукте составляло 25 нанограмм на 1000 единиц ЛД<sub>50</sub> (12,5 нанограмм на 500 единиц ЛД<sub>50</sub>; 40 единиц ЛД<sub>50</sub> на нанограмм), но эти значения не соответствуют применяемому в настоящее время продукту Dysport®.

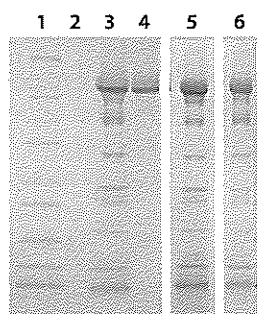
Здесь мы впервые приводим сведения о не расфасованных коммерческих партиях токсина Dysport®, применявшегося в клинике, после лицензирования продукта, который предназначен для коммерческого использования.

**Таблица 2**  
Эффективность\* и содержание белка токсина в нерасфасованных партиях токсина Dysport®

	Клинические/производственные партии до 2002 г.				
	A	B	C		
Активность (единиц ЛД <sub>50</sub> для мышей на мл)	1.0x10 <sup>6</sup>	4.2x10 <sup>7</sup>	1.7x10 <sup>7</sup>		
Среднее количество белка токсина, в нанограммах на флакон, содержащий 500 единиц ЛД <sub>50</sub>	3.9				
	Клинические/производственные партии до 2003 г.				
	P	Q	R	S	T
Активность (единиц ЛД <sub>50</sub> для мышей на мл)	7.8x10 <sup>7</sup>	8.8x10 <sup>7</sup>	6.8x10 <sup>7</sup>	7.5x10 <sup>7</sup>	5.2x10 <sup>7</sup>
Среднее количество белка токсина, нанограмм на флакон, содержащий 500 единиц ЛД <sub>50</sub>	5				
Суммарное среднее количество белка токсина, в нанограммах на флакон, содержащий 500 единиц ЛД <sub>50</sub>	4.4±1.3				

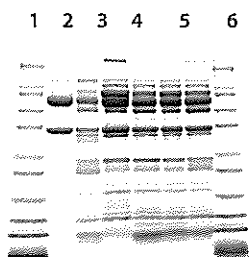
\* Единицы ЛД<sub>50</sub>

**Рис. 1 - ДСН-ПААГ электрофорез в восстановительных условиях**



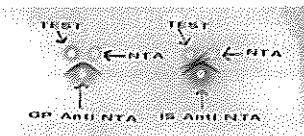
- Дорожка 1 Маркеры молекулярного веса
- Дорожка 2 Пустая
- Дорожка 3 Партия Р
- Дорожка 4 Аналитический маркер нейротоксина
- Дорожка 5 Партия Q
- Дорожка 6 Партия R

**Рис. 2 - ДСН-ПААГ электрофорез в не восстановительных условиях**



- Дорожка 1 Маркеры молекулярного веса
- Дорожка 2 Аналитический маркер нейротоксина
- Дорожка 3 Партия Р
- Дорожка 4 Партия Q
- Дорожка 5 Партия R
- Дорожка 6 Маркеры молекулярного веса

**Рис. 3 – Анализ подлинности по Ухтерлони (Ouchterlony):**



Метод Ухтерлони (Ouchterlony) анализа двойной диффузии в геле для определения подлинности в не расфасованных партиях препарата Dysport®

Этот метод обнаруживает специфические реакции антиген-антитело по образованию полос иммунопреципитата в агаровом геле.

На Рис. 3 показан анализ партии А по Ухтерлони

**IS Anti A**

Международная антисыворотка к комплексу гемагглютинин-токсин типа А из *C. botulinum*

**Anti NTA**

Антисыворотка к очищенному нейротоксину типа А из *C. botulinum*

**NTA**

Очищенный нейротоксин типа А

**Тест**

Dysport® партия нерасфасованного токсина Р

**Специфическая активность:**

Специфическая активность (называемая также специфической токсичностью) ботулинического токсина определяется как сила действия в единицах ЛД<sub>50</sub> на единицу веса белка, обычно в миллиграммах. В широком смысле, этот показатель применяют для характеристики чистоты любого препарата белка: чем выше значение, тем чище препарат.

На основании числа единиц ЛД<sub>50</sub> токсина типа А во флаконе, указанного на этикетке, и специфической активности, можно рассчитать количество белка токсина на флакон лекарственного продукта. Чем больше вес на единицу ЛД<sub>50</sub>, тем больше будет белковая нагрузка с введенной пациенту дозой.

**Таблица 3**  
Расчет эквивалентной нагрузки белком токсина:

	Dysport® 500 единиц ЛД <sub>50</sub> на флакон	ВОТОХ® 100 единиц ЛД <sub>50</sub> на флакон
нанограмм белка на флакон	5 (из таблицы 2)	5 (из таблицы 2)
Число единиц ЛД <sub>50</sub> , указанных на этикетке флакона	500	100
Число единиц ЛД <sub>50</sub> , эквивалентных препарату Dysport® на флакон	500	300
nanograms of toxin protein per 500 Dysport-equivalent LD50 units	5	8
Эквивалентный процент нагрузки белком токсина	100%	167%

**РЕЗЮМЕ:**

- Мы представили данные, подтверждающие, что содержание белка токсина во флаконе с 500 единицами ЛД<sub>50</sub> препарата Dysport® составляет около 5 нанограмм.

- По литературным данным, флакон препарата BOTOX®/BO-TOX® Cosmetic содержит 5 нанограмм белка токсина на 100 единиц ЛД<sub>50</sub>.
- На основании данных об эквивалентности ЛД<sub>50</sub> опубликованных рядом групп, 100 единиц ЛД<sub>50</sub> BOTOX® соответствуют, примерно, 300 единицам ЛД<sub>50</sub> препарата Dysport®
- Следовательно, в эквивалентных дозах, нагрузка белка токсина для препарата Dysport®, примерно, на 40% ниже, чем для BOTOX®.
- От белковой нагрузки на клиническую дозу может зависеть выработка антител у некоторых пациентов.
- На основании опубликованных данных, доля пациентов, у которых появляются антитела к BOTOX® может достигать 17% (компания Allergan, Inc, 2002 г.). Данные для Dysport® показывают, что антитела против токсина появляются не более чем у 2,5% пациентов (Kessler 1999).

## Ссылки:

Allergan, Inc. BOTOX® (ботулинический токсин типа А) очищенный комплекс нейротоксина, Информация для врачей, версия исправленная в июле 2002 г.

Dressler и др., Eur. Neurol, 2002, 47, 118-121. Связанная с антителами неэффективность лечения ботулиническим токсином: можно ли преодолеть ее повышением доз ботулинического токсина.

Goschel и др., Exp Neurol, 1997, 147, 96-102. Лечение ботулиническим токсином типа А: нейтрализующие и не нейтрализующие антитела - Терапевтические последствия.

Hambleton и др., J R Soc Med., 1994, 87, 719. Эквивалентность активности препаратов ботулинического токсина.

Hanna и др., Neurology 1998, 50, 1624-1629. Сравнение биотеста на мышах с вестерн блоттингом для определения антител к ботулиническому токсину.

Hanna и др., J Neurol Neurosurg Psychiatry 1999, 66, 612-616. Сравнение МРА с RIA 125I-BTX. Использованные клинические образцы.

Jankovic и др., Neurology 1995, 45, 1743-1745. Реакция и иммунологическая устойчивость при инъекциях ботулинического токсина.

Kessler и др., J Neurol, 1999, 246, 265-274. Длительное лечение дистонии шейных мышц ботулиническим токсином типа А: Эффективность, безопасность и частота образования антител.

Kessler и др., Mov Disord 1997, 12, 95-99. Тест EBD – Клинический тест для обнаружения антител к ботулиническому токсину типа А.

Marrion и др., J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1995, 59, 102-3. Стандартизация доз ботулинического токсина (письмо в редакцию).

Odergren и др., J. Neurol Neurosurg & Psych., 1998, 64, 6-12. Двойное слепое рандомизированное исследование с параллельными группами для оценки эквивалентности доз препаратов Dysport и Botox при лечении дистонии шейных мышц.

Palace и др., Neurology 1998, 50, 1463-1466. Анализ ботулинического токсина А методом радиоиммунопреципитации.

Poewe и др., J Neurol Neurosurg Psych, 2002, 72, 430. Относительная активность препаратов Botox и Dysport: двойное слепое, рандомизированное, перекрестное исследование при дистонии шейных мышц. [редакционный комментарий]

Quinn и др., The Lancet, 1989, Apr 29, 964. Стандартизация доз ботулинического токсина (письмо в редакцию).

Racette и др., Movement Disorders, 2002, 17, 5, 1098-1100. Вторичное отсутствие реакции на новый нерасфасованный ботулинический токсин А (BCB2024).

Ranoux и др., J Neurol Neurosurg Psych, 2002, 72, 459-462. Относительная активность препаратов Botox и Dysport: двойное слепое, рандомизированное, перекрестное исследование при дистонии шейных мышц.

Rollnik и др., Neurol Clin Neurophysiol. 2001; 3, 2-4. Нейтрализующие антитела к ботулиническому токсину типа А – клинические наблюдения при дистонии шейных мышц.

Sawtell и др., Biologicals 1996, 24, 75. Наблюдения относительно действия разбавителя, применяемого для разведения токсина при определении активности Clostridium botulinum.

Sheean, Proceedings of Biomedical Aspects of Clostridial Neurotoxins. International Conference Oxford. Tranter HS (Ed.) 1996, P: 125-130. Определение единиц: Клинический опыт.

Stell и др., BMJ 1988, 297, 616. Лечение ботулиническим токсином спастической кривошеи.

Tidswell и др., Постерное сообщение - World Congress of Neurology, June 2001. Сравнение двух препаратов ботулинического токсина типа А при лечении дистоний.

van den Bergh и др., Dystonia 3: Adv Neurol, 1998, 78, 231-235. Стандартизация доз ботулинического токсина.

Whurr и др., Mov Disord 1995, 10, 3. Сравнение действия доз американского и британского препаратов ботулинического токсина А при лечении спастической дисфонии.

Мы благодарим наших коллег в техническом отделе (Technical Affairs), Sarah Shipley and Lesley Maughan, за помощь и вклад в эту работу. Мы также признательны всем нашим коллегам в компании Ipsen за содействие в сборе представленных данных и за конструктивную критику.