

Данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат ботулинический нейротоксин *Clostridium botulinum*, причем этот нейротоксин свободен от комплексообразующих белков, которые естественным образом присутствуют в этом комплексе. Согласно данному изобретению показано, что этот свободный нейротоксин в противоположность комплексу не приводит в пациентах к индукции или приводит только к явно пониженной индукции нейтрализующих антител. Данное изобретение относится к применению ботулинического нейротоксина *Clostridium botulinum* для приготовления лекарственного средства для лечения заболеваний нервной системы. Другой аспект данного изобретения относится к применению ботулинического нейротоксина *Clostridium botulinum* для косметического лечения.

Токсивный комплекс *Clostridium botulinum* типа А ( $M_r$  900.000) применяют в течение нескольких лет для терапии различных дистоний. В настоящее время разрешены два различных содержащих этот комплекс препарата для лечения блефароспазма, спазмов, относящихся к одной половине лица, и спастической кривошее: BOTOX® и DYSMINT®. Терапия других заболеваний нервной системы (например, спастичностей, мигрени, люмбаго, шейного синдрома и гиперсаливации) в настоящее время клинически испытывается. Кроме того, эти препараты применяются при косметических показаниях, таких как гипергидроз (повышенное потоотделение) и ярко выраженное образование морщин. Другие токсивные комплексы *Clostridium botulinum* (типов B, C, D, E, F, G) также пригодны для этих терапий. Правда, в настоящее время в продаже отсутствует продукт, поставляющий токсины типа B-G.

Комплексы ботулинических нейротоксинов состоят из смеси белков *Clostridium botulinum*. Это гемагглютинины с различными молекулярными массами, нетоксичный негемагглютинирующий белок ( $M_r$  приблизительно 120.000) и нейротоксин ( $M_r$  приблизительно 150.000). Они образуют кислотоустойчивый комплекс, который является ответственным за пероральную токсичность при отравлениях пищевыми продуктами. В противоположность чистому нейротоксину этот комплекс выдерживает агрессивную среду в желудочно-кишечном тракте и делает возможным энтеральное всасывание нейротоксина, который через кровообращение или лимфатическую систему достигает клеток-мишеней и там приводит в действие блокаду высвобождения медиаторов. После этого происходит паралич поперечно-полосатой и гладкой мускулатуры и прекращение различных вегетативных функций. Отравившиеся пациенты умирают от недостаточности дыхательной мускулатуры. Так как чистый нейротоксин распадается в желудочно-кишечном тракте и

вследствие этого не резорбируется в кишечнике, после приема внутрь он не является ядовитым. При парентеральном введении терапевтические действия нейротоксина и комплекса не отличаются друг от друга, так как комплекс разрушается в ткани на его компоненты и только нейротоксин поглощается в клетках-мишениях.

Для терапевтического применения комплекс, согласно современному уровню техники, инъектируют непосредственно в дистоническую или спастическую мышцу, где нейротоксин при физиологическом pH высвобождается из комплекса и оказывает желательное фармакологическое действие. Хотя комплекс применяют лишь в исключительно низких дозах (1-25 нг, в зависимости от показания и величины пораженной мышцы), после повторяемых инъекций у значительного числа пациентов начинается образование специфических нейтрализующих антител, направленных против этого нейротоксина. Непосредственным следствием является то, что положительные в отношении антител пациенты уже не реагируют на этот комплекс. Но они могли бы лечиться другими типами токсинов, из которых, правда, ни один не разрешен для применения в терапии. Если пациент перепробует все типы токсинов и при этом образуются против них антитела, то дальнейшее применение комплекса ботулинического токсина (все равно, какого типа) больше не будет помогать. При этом следует учитывать, что каждый прием комплекса способствует повышению титра антител до точки, в которой дальнейшее применение комплекса уже не имеет смысла, так как больше уже не достигается никакой эффект. До достижения заметного снижения титра антител часто проходят годы, так что эти пациенты на протяжении продолжительного периода времени не могут не лечиться (ботулиническим нейротоксином).

Образованию специфических антител благоприятствуют два фактора. Во-первых, нейротоксин, фиксированный в комплексе, на протяжении более продолжительного времени находится в ткани и может активировать попадающие в ткань блуждающие иммунные клетки к образованию антител. Однако, большая продолжительность пребывания не приводит к повышенному поглощению в клетках-мишениях, так как отправленные клетки-мишени больше не могут поглощать никакой токсин. Медленно диссоциирующий из комплекса нейротоксин также действует только иммунологически. С другой стороны, содержащиеся в комплексе белки усиливают иммунный ответ. Гемагглютинины являются лектинаами, также белками, которые отличаются высокой аффинностью к определенным сахарам. Благодаря связыванию с сахарными структурами лектины действует иммуностимулирующим образом. Так, удалось показать, что лектины конканавалин А, фитогемагглютинин и митоген фитолакки американ-

ской активируют Т- и В-лимфоциты. Гемагглютинины комплекса ботулинического токсина, которые также связываются с постоянно присутствующими в мембранах сахарами, могут функционировать таким же образом, что и иммуноадьюванты, и способствовать образованию антител и тем самым безуспешности терапии.

Поэтому задачей изобретения является разработка альтернативного пути лечения вышеуказанных заболеваний и нарушений. В частности, согласно изобретению предлагается подходящее биологически активное вещество, при помощи которого могли бы лечиться пациенты, у которых уже образовались нейтрализующие антитела.

В качестве решения поставленной задачи, в качестве альтернативы обоим коммерческим препаратам из комплекса ботулинического токсина типа А, BOTOX® и DYSMSPORT®, а также альтернативы описаны в уровне техники комплексам остальных типов (B, C, D, E, G, G) было создано новое лекарственное средство, которое содержит только чистый нейротоксин (типа А или B, C, D, E, F, G) и свободно от гемагглютининов и других чужеродных белков. Вследствие его небольшой молекулярной массы оно диффундирует быстрее к клеткам-мишеням, в которые оно поглощается, до того, как активируются иммунные клетки, привлекаемые гемагглютининами. При исследовании антигенности было показано, что чистый нейротоксин всех типов в отличие от коммерческих препаратов типа А и комплексов типов B, C не вызывает или вызывает образование очень небольшого количества антител. При терапевтическом применении этого нового разработанного лекарственного средства (чистого нейротоксина типов A, B, C, D, E, F, G) даже при повторяемых применениях не наблюдается обусловленной антителами несостоятельности действия терапии. Далее, удалось показать, что чистые нейротоксины вследствие их моментальной биодоступности пригодны также и для лечения пациентов, у которых после применения комплекса ботулинического токсина, например, после лечения BOTOX® и DYSMSPORT®, развился титр антител против соответствующего типа (так называемые вторичные нереспондеры) и, следовательно, являются уже недоступными дальнейшему лечению при помощи BOTOX® и DYSMSPORT®, так как введение коммерческих токсинов уже не приводит к снижению жалоб.

Лекарственное средство согласно изобретению пригодно в качестве терапевтического средства особенно для пациентов с титром антител против ботулинического токсина, в частности против ботулинического токсина типа А. Особенно пригодно фармацевтическое средство данного изобретения (чистый нейротоксин или смесь нескольких чистых нейротоксинов) в случае таких пациентов, которые обнаруживают титр антител не более 50, предпочтительно не

более 30, более предпочтительно не более 20, особенно предпочтительно не более 10, и наименее предпочтительно не более 5 mEg/мл. При этом 1 mEg антител является тем количеством антител, которое нейтрализует 10Eg токсина.

С другой стороны, лекарственное средство данного изобретения может применяться предпочтительно такими пациентами, которые еще никогда раньше или уже в течение многих лет, не лечились ботулиническим нейротоксином, так как их титр антител с самого начала является низким или равным нулю. Преимущество данного изобретения в этом случае состоит в том, что титр этих пациентов не повышается, или в крайнем случае очень несущественно повышается, при обработке чистым токсином в соответствии с данным изобретением. Другими словами, терапевтическое средство согласно изобретению может применяться на протяжении продолжительного периода времени без потери его действия.

Индукция антител при терапии токсином *C. botulinum* тормозится, следовательно, тем, что вместо высокомолекулярных токсических комплексов вводится чистый нейротоксин. Полностью отделенный от белков комплекса нейротоксин является тотчас же биодоступным и может связываться непосредственно с нервными окончаниями концевых пластинок двигательных нервов.

Один аспект данного изобретения относится к фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере один из ботулинических нейротоксинов *Clostridium botulinum* типов A, B, C, D, E, F или G (или смесь двух или более из этих нейротоксинов), причем все нейротоксины свободны от комплексообразующих белков, которые естественным образом присутствуют в комплексе.

Согласно предпочтительной форме выполнения речь идет о фармацевтической композиции, которая отличается тем, что нейротоксин или смесь нейротоксинов у пациентов не приводит или, по сравнению с комплексами, приводит лишь к уменьшенной индукции нейтрализующих антител.

Следующая предпочтительная форма выполнения предусматривает фармацевтическую композицию, которая в качестве нейротоксина или в качестве смеси нейротоксинов содержит природный нейротоксин или смесь природных нейротоксинов.

Следующая предпочтительная форма выполнения предусматривает фармацевтическую композицию, которая в качестве нейротоксина или в качестве смеси нейротоксинов содержит рекомбинантный нейротоксин или смесь рекомбинантных нейротоксинов.

Следующая предпочтительная форма выполнения фармацевтической композиции согласно изобретению предусматривает композицию, которая в качестве нейротоксина содержит

нейротоксин Clostridium botulinum типа А или В или в качестве смеси нейротоксинов смесь нейротоксинов Clostridium botulinum типа А и В.

Следующий аспект данного изобретения относится к применению ботулинических нейротоксинов Clostridium botulinum типов А, В, С, D, E, F или G или смеси двух или более этих нейротоксинов для приготовления лекарственного средства для лечения заболеваний нервной системы или дистоний. При заболеваниях нервной системы или дистониях речь идет преимущественно о спастической кривошее и блефароспазме, о спастичностях, таких как «конская стопа», спазмы, относящиеся к одной половине лица, мигрени, люмбаго, шейный синдром или гиперсаливация.

Еще один аспект данного изобретения относится к применению ботулинических нейротоксинов Clostridium botulinum типов А, В, С, D, E, F или G или смеси двух или более этих нейротоксинов для косметической терапии, причем косметическая терапия для лечения гипергидроза и образования морщин, в частности, в области лица, является особенно предпочтительной.

Наиболее предпочтительным согласно изобретению является применение одного из нейротоксинов отдельно или в смеси для приготовления лекарственного средства для лечения вышеуказанных нервных заболеваний у таких пациентов (примarily человека, а также и животного), которые уже обнаруживают нейтрализующие антитела против комплекса ботулинического нейротоксина, в частности, против комплекса Clostridium botulinum типа А или В, или против нескольких комплексов, в частности, против комплексов Clostridium botulinum типа А и В (так называемых вторичных нереспондеров).

Нейротоксины, их смеси или фармацевтические композиции согласно изобретению могут находиться в виде водного раствора, в частности, в виде водного инъекционного раствора, а также в виде лиофилизованных продуктов.

Известные сами по себе чистые нейротоксины типов А-Г получали согласно протоколам, которые содержатся в публикациях приведенных в списке литературы. В качестве примера описана очистка двух нейротоксинов (типа А и В) в нижеследующих примерах.

Пример 1. Выделение чистого нейротоксина.

Чистый нейротоксин из Clostridium botulinum типа А получают согласно способу, который основывается на способе DasGupta & Sathyamoorthy. Clostridium botulinum типа А культивируют в ферментере на 20 л в среде, которая состоит из 2% протеозопептона, 1% дрожжевого экстракта, 1% глюкозы и 0,05% тиогликолята натрия. После 72 ч роста токсин осаждают добавлением 3н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (конечный pH = 3,5). Осажденную и центрифужированную

биомассу экстрагируют 0,2M натрийфосфатным буфером pH 6,0.

После отделения нуклеиновых кислот осаждением протамина сульфатом токсин осаждают добавлением сульфата аммония. Солюбилизованный и диализованный против 50 mM фосфата натрия pH 6,0 осадок связывают на колонке ДЭАЭ-Сефадекса при том же самом показателе pH и элюируют 150 mM NaCl. Затем следует хроматография через колонку Сефадекса-QAE, которая уравновешена 50 mM Трис/HCl-буфером pH 7,9. Токсин элюируют при помощи NaCl-градиентов. На последней стадии токсин хроматографируют через SP-Сефадекс при pH 7,0. При этом связанный токсин отделяют из колонки при помощи NaCl-градиентов (0-300 mM). Очищенный токсин анализируют в электрофорезе в ДСН-полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) и он обнаруживает чистоту 95 ± 5%. Биологическую активность определяют в мышином LD<sub>50</sub>-тесте: одной LD<sub>50</sub>-единице соответствуют 4,8 пг белка.

Пример 2. Получение готового лекарственного средства содержащего один ботулинический нейротоксин.

Готовят раствор очищенного нейротоксина из примера 1, который содержит 200 мышиных LD<sub>50</sub>-единиц, 10 мг сахарозы и 2 мг человеческого сывороточного альбумина на мл. По 0,5 мл раствора помещают во флаконы и лиофилизируют. Лиофилизаты восстанавливают в виде раствора физиологическим раствором поваренной соли и определяют биологическую активность. Флаконы содержат 100 ± 30 LD<sub>50</sub>-единиц.

Пример 3. Выделение чистого нейротоксина В.

Clostridium botulinum типа В культивируют в той же самой среде и при тех же самых условиях, что и Clostridium botuliaum типа А, и обрабатывают для осаждения сульфатом аммония. Затем следует опять хроматография на ДЭАЭ-Сефадексе при pH 6,0. Элюированные из колонки 150 mM NaCl фракции очищают и диализуют против фосфата натрия pH 7,0, после чего проводят хроматографию на QAE-Сефадексе. Содержащие токсин фракции хроматографируют затем с использованием ДЭАЭ-Сефадекс-хроматографии при pH 8,5 (50 mM Трис/HCl pH 8,5).

Наконец получают высокоочищенный ботулинический токсин типа В с использованием хроматографии на гидроксилапатите, уравновешенном 10 mM Na-фосфатом pH 8,0. Связанный гомогенный токсин элюируют 80 mM Na-фосфатом pH 8,0 и сразу после этого определяют, биологическую активность в LD<sub>50</sub>-тесте (2-4 x 10<sup>7</sup> LD<sub>50</sub>-единиц/мг белка).

Пример 4. Обнаружение антител.

20 кроликов инъектировали внутрекожно 25 Eg BOTOX® на протяжении 12 недель с интервалом 14 дней (5 инъекций). После 3 недель

и после этого с интервалом 14 дней получали сыворотку.

Антитела против нейротоксина A Clostridium botulinum обнаруживали при помощи иммуноферментного анализа с иммобилизацией гомогенного нейротоксина на микротитрационном планшете. Связывающие нейротоксин антитела определяли количественно с использованием второго меченого ферментом антитела.

Результат представлен в табл. 1. Уже через 5 недель после первого применения можно было обнаружить антитела у 5 кроликов. Через 11 недель содержали антитела против нейротоксина сыворотки 17 кроликов, следовательно 85% используемых животных. В биологическом тесте определения активности было показано, что 12 из 17 сывороток содержали нейтрализующие антитела (табл. 2).

Таблица 1. Определение проб сывороток (разведение 1:100) кроликов, обработанных BOTOX®, с использованием иммуноферментного анализа. Приведены OD<sub>490 nm</sub> > 0,1. Все

OD-показатели скорректированы при помощи OD-показателей преиммунных сывороток

№ кро- лика	3-я не- деля	5-я не- деля	7-я не- деля	9-я не- деля	11-я неделя
1	—	—	—	0,11	0,36
2	—	—	—	2,36	2,23
3	—	—	0,57	1,43	1,44
4	—	—	0,68	1,68	0,93
5	—	0,97	3,52	3,49	3,44
6	—	—	1,34	2,32	2,70
7	—	—	2,13	3,09	3,00
8*	—	0,53	1,47	2,75	2,75
9	—	—	0,43	2,44	2,85
10	—	—	2,99	3,15	2,73
11	—	0,10	2,42	2,45	1,93
12	—	—	—	1,13	1,95
13	—	—	—	—	1,89
14	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—
16	—	—	—	—	—
17	—	2,93	3,62	3,72	3,44
18	—	—	1,18	2,28	2,62
19	—	—	0,43	0,43	0,81
20	—	1,65	3,20	2,97	2,88

\* Показатели не были скорректированы, так как не было преиммунной сыворотки;

"—" обозначает оптическую плотность (OD<sub>490</sub>) < 0,1.

Таблица 2. Нейтрализация при помощи сывороток кроликов, обработанных BOTOX® (неделя 11 после первой иммунизации), в мышном гемидафрагмальном анализе (предел детектирования: 0,35 мEg/мл антител)

Кролик	Нейтрализация мEg/мл
1	2,0
2	н.о.
3	н.о.
4	>10
5	>100
6	н.о.
7	>10
8	>10
9	н.о.
10	н.о.
11	н.о.
12	>10
13	н.о.
14	н.о.
15	<0,35

16	0,4
17	>10
18	>10
19	2,0
20	>10

н.о. = не определяли

Пример 5. Тест на антигенность с коммерчески доступным продуктом и чистым нейротоксином.

После того как было показано, что комплекс из нейротоксина и гемагглютининов и нетоксического, негемагглютинирующего белка индуцирует образование нейтрализующих антител, исследовали иммуногенное действие чистого нейротоксина (типа А). Для этого обрабатывали 8 кроликов комплексом токсина и 12 кроликов чистым токсином. Согласно описанному выше способу (см. пример 1), использовали 25 Eg каждого препарата посредством подкожного введения. Количество нейротоксина, измеренное по весу, было одинаковым в обоих препаратах (200 пг/доза), как было определено в ELISA. BOTOX® содержал еще дополнительно комплексные белки (около 800 пг/доза).

Четыре из восьми обработанных BOTOX® животных обнаружили в ELISA титр антител, в то время как у 12 обработанных чистым нейротоксином животных не были обнаружены антитела против чистого нейротоксина. Этот результат был подтвержден в тесте на биологическую активность. Все четыре сыворотки кроликов содержали титр нейтрализующих антител, которые ингибировали действие токсина (табл. 3).

Таблица 3. Нейтрализация сыворотками (разведение 1:3) кроликов, обработанных BOTOX® (неделя 11 после первой иммунизации), в мышном гемидафрагмальном анализе (предел детектирования: 1 мEg/мл антител)

Кролик	Нейтрализация мEg/мл
1	12 мEg
2	>30 мEg
3	4,5 мEg
8	>30 мEg

Пример 6. (Сравнительный пример).

В этом эксперименте сравнивали образование антител при использовании BOTOX® с образованием антител при использовании DYSPORT®. Для этого в каждом случае десять кроликов обрабатывали либо BOTOX® (группа 1), либо DYSPORT® (группа 2), либо чистым нейротоксином (группа 3) согласно описанной схеме.

В то время как в группе 1 и группе 2 более 50% животных образовали титр нейтрализующих антител, сыворотки животных группы 3 не содержали антител.

Пример 7. Клиническое испытание.

Пациент (в возрасте 45 лет), которого на протяжении 5 лет лечили BOTOX® по поводу спастической кривошеи, развил титр антител 3 мEg/мл сыворотки. Ни BOTOX®, ни DYSPORT® не были терапевтически эффектив-

ными в случае этого пациента. Попытка терапии чистым ботулиническим нейротоксином в дозе 145 Eg, которая была эквивалентна последней инъецируемой дозе BOTOX®, в пределах 72 ч привела к расслаблению мышцы, к нормализации положения головы и к исчезновению мышечных болей. Нежелательные побочные действия не были обнаружены.

#### Пример 8. Клиническое испытание.

Пациента (в возрасте 52 лет) в течение 3 лет лечили BOTOX® по поводу церебрального пареза. Он развил титр антител 1 мEg/мл сыворотки, поэтому это лечение должно было быть прекращено. Инъекция 200 Eg чистого нейротоксина сделала возможной успешное лечение.

#### Литература

DasGupta, B.R. & Sathyamoorthy, V. (1984), Purification and Amino Acid Composition of Type A Botulinum Neurotoxin; Toxicon 22(3), p. 415 – 424.

De Jongh, K.S., Schwartzkoff, C.L. & Howden, M.E.H. (1989), Clostridium botulinum Type D Neurotoxin Purification and Detection; Toxicon 27 (2), p. 221 - 228 Schmidt, J.J. & Siegel, L.S.(1986), Purification of Type E Botulinum Neurotoxin by High - Performance Ion Exchange Chromatography; Analyt. Biochemistry 156, p. 213 – 219.

Nukina, M., Mochida, Y., Sakaguchi, S. & Sakaguchi, G. (1988), Purification of Clostridium botulinum Type G Progenitor Toxin; Zbl. Bakt. Hyg. A 268, p. 220 – 227.

Terajima, J., Syuto, B., Ochanda, J.O. & Kubo, S. (1985), Purification and Characterization of Neurotoxin Produced by Clostridium botulinum Type C 6813; Infection and Immunity 48 (2), p. 312-317.

Wadsworth, J.D.F., Desai, M., Tranter, H.S. et al. (1990), Botulinum type F neurotoxin: Large-scale Purification and Characterization of its Binding

to Rat Cerebrocortical Synaptosomes; Biochem. J. 268, p. 123 - 128.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение ботулинических нейротоксинов *Clostridium botulinum* типов А, В, С, Д, Е, F или G или смеси двух или более этих нейротоксинов, отличающееся тем, что нейротоксин или смесь нейротоксинов свободны от комплексообразующих белков, которые естественным образом образуют комплексы с ботулиническими нейротоксинами, для получения фармацевтического средства для косметического лечения или для лечения дистоний или заболеваний нервной системы пациентов, животных или человека, которые уже образовали нейтрализующие антитела против таких ботулинических нейротоксинов.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что подлежащие лечению пациенты уже образовали нейтрализующие антитела против комплекса *Clostridium botulinum* типа А или В или против комплекса *Clostridium botulinum* типа А и В.

3. Применение по п.1 или 2, отличающееся тем, что косметическое лечение осуществляется для лечения гипергидроза.

4. Применение по одному из пп.1-3, отличающееся тем, что косметическое лечение осуществляется для лечения образования морщин.

5. Применение по п.4, отличающееся тем, что косметическое лечение для лечения образования морщин осуществляется в области лица.

6. Применение по п.1 или 2, отличающееся тем, что в случае заболеваний нервной системы или дистоний речь идет о спастической кривошеи, блефароспазме, спастичностях, таких как «конская стопа», спазмы, относящиеся к одной половине лица, мигрени, люмбаго, шейный синдром или гиперсаливация.

