

**(19) C2 (11) 72253 (13) UA**

(98) вул. Л.Первомайського, 11, кв. 45, м. Київ, 01023

(85) 2002-01-07

(74) Мошинська Ніна Миколаївна, (UA)

(45) [2005-02-15]

(43) [2002-03-15]

(24) 2005-02-15

(22) 2000-05-26

(12) null

(21) 2002010181

(46) 2005-02-15

(86) 2000-05-26 PCT/DE00/01777

(30) 199 25 739.6 1999-06-07 DE

(54) ЗАСТОСУВАННЯ БОТУЛІНІЧНОГО НЕЙРОТОКСИНУ, ВІЛЬНОГО ВІД КОМПЛЕКСОУТВОРЮЮЧИХ БІЛКІВ, ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ЗАСОБУ ПРИМЕНЕНИЕ БОТУЛИНОВОГО НЕЙРОТОКСИНА, НЕ СОДЕРЖАЩЕГО КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИХ БЕЛКОВ, ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА PHARMACEUTICAL PREPARATION CONTAINING BOTULINUM NEUROTOXIN FREE OF COMPLEXING PROTEINS

(56) US A 5512547 30.04.1995 2 WO A1 9639167 12.12.1996 2 WO A1 9428923 22.12.1994 2

(71)

(72) DE Бігалке Ханс DE Бігалке Ханс DE Бігалке Ханс DE Фреверт Юрген DE Фреверт Юрген DE Фреверт Юрген

(73) DE МЕРЦ ФАРМА ГМБХ УНД КО. КГАА DE МЕРЦ ФАРМА ГМБХ УНД КО. КГАА DE MERZ PHARMA GMBH and CO. KGAA

Изобретение относится к применению ботулиновых нейротоксинов *Clostridium botulinum* типа А, В, С, D, Е, F или G, или смеси двух и более нейротоксинов. При этом нейротоксин или смесь нейротоксинов не содержат комплексообразующих белков, которые обычно вместе с нейротоксинами образуют комплексы ботулинового нейротоксина.

Винахід стосується застосування ботулінічних нейротоксинів *Clostridium botulinum* типу А, В, С, D, Е, F або G, або суміші з двох або більше цих нейротоксинів, при цьому нейротоксин або суміш нейротоксинів вільні від комплексоутворюючих білків, які звичайним чином разом з нейротоксинами утворюють комплекси ботулінічного нейротоксину.

The invention relates to a pharmaceutical preparation containing one of the botulinum neurotoxins of *Clostridium botulinum* of types A, B, C, D, E, F or G or a mixture of two or more of these neurotoxins. The inventive preparation is characterized in that the neurotoxin or the mixture of neurotoxins does not contain the complexing proteins which, together with the neurotoxins, naturally form the botulinum neurotoxin complexes.

1. Застосування ботулінічних нейротоксинів Clostridium botulinum типу А, В, С, D, Е, F або G, або суміші двох або більше цих нейротоксинів, яке **відрізняється** тим, що нейротоксин або суміш нейротоксинів, вільних від комплексоутворюючих білків, які природним чином утворюють комплекси з ботулінічними нейротоксинами, застосовують для одержання фармацевтичного засобу для косметичного лікування або для лікування дистоній або захворювань нервової системи пацієнтів, вибраних з тварин або людини, в яких вже утворилися нейтралізуючі антитіла проти таких ботулінічних нейротоксинів.
2. Застосування за п. 1, яке **відрізняється** тим, що в пацієнтів, які підлягають лікуванню, вже утворилися нейтралізуючі антитіла проти комплексу Clostridium botulinum типу А або В, або проти комплексу Clostridium botulinum типу А і В.
3. Застосування за п. 1 або 2, яке **відрізняється** тим, що косметичне лікування здійснюється для лікування гіпергідрозу.
4. Застосування за одним з пунктів 1-3, яке **відрізняється** тим, що косметичне лікування здійснюється для лікування утворення зморшок.
5. Застосування за п. 4, яке **відрізняється** тим, що косметичне лікування для лікування утворення зморшок здійснюється в області обличчя.
6. Застосування за п. 1 або 2, яке **відрізняється** тим, що у випадку захворювань нервової системи або дистоній мова йде про спастичну кривошию, блефароспазм, спастичності, такі як «кінська стопа», спазми, що відносяться до однієї половини обличчя, мігрені, люмбаго, шийний синдром або гіперсалівація.

Даний винахід відноситься до фармацевтичних композицій, які містять ботулінічний нейротоксин *Clostridium botulinum*, причому цей нейротоксин вільний від комплексоутворюючих білків, які природним образом присутні в цьому комплексі. Згідно з даним винаходом показано, що цей вільний нейротоксин в протилежність комплексу не приводить в пацієнтах до індукції або приводить тільки до явно зниженої індукції нейтралізуючих антитіл. Даний винахід відноситься до застосування ботулінічного нейротоксину *Clostridium botulinum* для приготування лікарського засобу для лікування захворювань нервової системи. Інший аспект даного винаходу відноситься до застосування ботулінічного нейротоксину *Clostridium botulinum* для косметичного лікування.

Токсиновий комплекс *Clostridium botulinum* типу А ( $M_r$  900.000) застосовують протягом декількох років для терапії різних дистоній. У цей час дозволені два різних препарати, що містять цей комплекс для лікування блефароспазма, спазмів, що відносяться до однієї половини обличчя, і спастичної кривошиї: BOTOX® і DYSPORT®. Терапія інших захворювань нервової системи (наприклад, еластичностей, мігрені, люмбаго, шийного синдрому і гіперсалівації) в цей час клінічно випробовується. Крім того, ці препарати застосовуються при косметичних показаннях, таких як гіпергідроз (підвищене потовиділення) і яскраво виражене утворення зморшок. Інші токсинові комплекси *Clostridium botulinum* (типів В, С, D, Е, F, G) також придатні для цих терапій. Правда, в цей час в продажу відсутній продукт, що постачає токсини типу В-Г.

Комплекси ботулінічних нейротоксинів складаються з суміші білків *Clostridium botulinum*. Це гемагглютиніни з різною молекулярною масою, нетоксичний не-гемагглютинуючий білок ( $M_r$  приблизно 120.000) і нейротоксин ( $M_r$  приблизно 150.000). Вони утворюють кислотостійкий комплекс, який є відповідальним за пероральну токсичність при отруєннях харчовими продуктами. У протилежність чистому нейротоксину, цей комплекс витримує агресивне середовище в шлунково-кишковому тракті і робить можливим ентеральне всмоктування нейротоксину, який через кровообіг або лімфатичну систему досягає клітин-мішеней і там приводить в дію блокаду вивільнення медіаторів. Після цього відбувається параліч поперечно-смугастої і гладкої мускулатури і припинення різних вегетативних функцій. Пацієнти, що отруїлися вмирають від недостатності дихальної мускулатури. Оскільки чистий нейротоксин розпадається в шлунково-кишковому тракті і внаслідок цього не резорбується в кишечнику, після прийому всередину він не є отруйним. При парентеральному введенні терапевтичні дії нейротоксину і комплексу не відрізняються один від одного, оскільки комплекс руйнується в тканині на його компоненти і тільки нейротоксин поглинається в клітинах-мішенях.

Для терапевтичного застосування комплекс, згідно з сучасним рівнем техніки, ін'єкують безпосередньо в дистонічний або спастичний м'яз, де нейротоксин при фізіологічному рН вивільняється з комплексу і надає бажану фармакологічну дію. Хоча комплекс застосовують лише у виключно низьких дозах (1-25нг, в залежності від показань і величини ураженого м'яза), після повторних ін'єкцій у значного числа пацієнтів починається утворення специфічних нейтралізуючих антитіл, направлених проти цього нейротоксину. Безпосереднім слідством є те, що позитивні відносно антитіл пацієнти вже не реагують на цей комплекс. Але вони могли б лікуватися іншими типами токсинів, з яких, правда, жоден не дозволений для застосування в терапії. Якщо пацієнт перепробує всі типи токсинів і при цьому утворюються проти них антитіла, то подальше застосування комплексу ботулінічного токсину (все одно, якого типу) більше не буде допомагати. При цьому потрібно враховувати, що кожний прийом комплексу сприяє підвищенню титру антитіл до точки, в якій подальше застосування комплексу вже не має значення, оскільки більше вже не досягається ніякий ефект. До досягнення помітного зниження титру антитіл часто проходять роки, так що ці пацієнти протягом тривалого періоду часу, не можуть не лікуватися (ботулінічним нейротоксином).

Утворенню специфічних антитіл сприяють два чинники. По-перше, нейротоксин, фіксований в комплексі, протягом більш тривалого часу знаходиться в тканині і може активувати попадаючи в тканину блукаючи імунні клітини до утворення антитіл. Однак, велика тривалість перебування не приводить до підвищеного поглинання в клітинах-мішенях, оскільки отруєні клітини-мішені більше не можуть поглинати ніякий токсин. Нейротоксин, що повільно дисоціює з комплексу також діє тільки імунологічний. З іншого боку, білки, що містяться в комплексі, посилюють імунну відповідь. Гемагглютиніни є лектинами, також білками, які відрізняються високої афінністю до певного цукру. Завдяки скріпленню з цукровими структурами лектини діють імуностимулюючим чином. Так, вдалося показати, що лектини конканавалін А, фітогемагглютинін і мітоген фітолаки американської активують Т- і В-лімфоцити. Гемагглютиніни комплексу ботулінічного токсину, які також зв'язуються з постійно присутніми в мембранах цукрами, можуть функціонувати таким же чином, що і імуноад'юванти, і сприяти утворенню антитіл і тим самим безуспішності терапії.

Тому задачею винаходу є розробка альтернативного шляху лікування вищезгаданих захворювань і порушень. Зокрема, згідно з винаходом пропонується відповідна біологічно активна речовина, за допомогою якої могли б лікуватися пацієнти, в яких вже утворилися нейтралізуючі антитіла.

Як рішення поставленої задачі, як альтернатива обом комерційним препаратам з комплексу ботулінічного токсину типу А, BOTOX® і DYSPORT®, а також альтернативи описані в рівні техніки комплексам інших типів (В, С, D, Е, G, G) було створено новий лікарський засіб, який містить тільки чистий нейротоксин (типу А або В, С, D, Е, F, G) і вільний від гемагглютинінів і інших чужорідних білків. Внаслідок його невеликої молекулярної маси він дифундує швидше до клітин-мішеней, в які він пригинається, до того, як активуються імунні клітини, що притягаються гемагглютинінами. При дослідженні антигенності було показано, що чистий нейротоксин всіх типів на відміну від комерційних препаратів типу А і комплексів типів В, С не викликає або спричиняє утворення дуже невеликої кількості антитіл. При терапевтичному застосуванні цього нового розробленого лікарського засобу (чистого нейротоксину типів А, В, С, D, Е, F, G) навіть при застосуваннях, що повторюються не спостерігається зумовленої антитілами неспроможності дії терапії. Далі, вдалося показати, що чисті нейротоксини внаслідок їх моментальної біодоступності придатні також і для лікування пацієнтів, в яких після застосування комплексу ботулінічного токсину, наприклад, після лікування BOTOX® і DYSPORT®, розвинувся титр антитіл проти відповідного типу (так звані повторні не-респондери) і, отже, є вже недоступними подальшому лікуванню за допомогою BOTOX® і DYSPORT®, оскільки введення комерційних токсинів вже не

приводить до зниження скарг.

Лікарський засіб згідно з винаходом придатний як терапевтичний засіб особливо для пацієнтів з титром антитіл проти ботулінічного токсину, зокрема, проти ботулінічного токсину типу А. Особливо придатний фармацевтичний засіб даного винаходу (чистий нейротоксин або суміш декількох чистих нейротоксинів) у випадку таких пацієнтів, які виявляють титр антитіл не більше за 50, переважно не більше за 30, більш переважно не більше за 20, особливо переважно не більше за 10, і найбільш переважно не більше за 5 МЕг/мл. При цьому 1 МЕг антитіл є тією кількістю антитіл, яка нейтралізує 1 ОЕг токсину.

З іншого боку, лікарський засіб даного винаходу може застосовуватися переважно такими пацієнтами, які ще ніколи раніше, або вже протягом багатьох років, не лікувалися ботулінічним нейротоксином, оскільки їх титр антитіл з самого початку є низьким або рівним нулю. Перевага даного винаходу в цьому випадку полягає в тому, що титр цих пацієнтів не підвищується, або в крайньому випадку дуже неістотно підвищується, при обробці чистим токсином відповідно до даного винаходу. Іншими словами, терапевтичний засіб згідно з винаходом може застосовуватися протягом тривалого періоду часу без втрати його дії.

Індукція антитіл при терапії токсином *C. botulinum* гальмується, отже, тим, що замість високомолекулярних токсичних комплексів вводиться чистий нейротоксин. Повністю відділений від білків комплексу нейротоксин є негайно ж біодоступним і може зв'язуватися безпосередньо з нервовими закінченнями кінцевих пластинок рухових нервів.

Один аспект даного винаходу відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить щонайменше один з ботулінічних нейротоксинів *Clostridium botulinum* типів А, В, С, D, Е, F або G (або суміш двох або більше з цих нейротоксинів), причому всі нейротоксини вільні від комплексоутворюючих білків, які природним образом присутні в комплексі.

Згідно з переважною формою виконання мова йде про фармацевтичну композицію, яка відрізняється тим, що нейротоксин або суміш нейротоксинів у пацієнтів не приводить або, в порівнянні з комплексами, приводить лише до зменшеної індукції нейтралізуючих антитіл.

Наступна переважна форма виконання передбачає фармацевтичну композицію, яка в якості нейротоксину або як суміш нейротоксинів містить природний нейротоксин або суміш природних нейротоксинів.

Наступна переважна форма виконання передбачає фармацевтичну композицію, яка в якості нейротоксину або як суміш нейротоксинів містить рекомбінантний нейротоксин або суміш рекомбінантних нейротоксинів.

Наступна переважна форма виконання фармацевтичної композиції згідно з винаходом передбачає композицію, яка в якості нейротоксину містить нейротоксин *Clostridium botulinum* типу А або В або як суміш нейротоксинів суміш нейротоксинів *Clostridium botulinum* типу А і В.

Наступний аспект даного винаходу відноситься до застосування ботулінічних, нейротоксинів *Clostridium botulinum* типів А, В, С, D, Е, F або G або суміші двох або більше з цих нейротоксинів для приготування лікарського засобу для лікування захворювань нервової системи або дистоній. При захворюваннях нервової системи або дистоніях мова йде переважно про спастичну кривошию і блефароспазм, про еластичності, такі як «кінська стопа», спазми, що відноситься до однієї половини обличчя, мігрені, люмбаго, шийний синдром або гіперсалівація.

Ще один аспект даного винаходу відноситься до застосування ботулінічних, нейротоксинів *Clostridium botulinum* типів А, В, С, D, Е, F або G або суміші двох або більше з цих нейротоксинів для косметичної терапії, причому косметична терапія для лікування гіпергідрозу і утворення зморшок, зокрема, в області обличчя, є особливо переважною.

Найбільш переважним згідно з винаходом є застосування одного з нейротоксинів окремо або в суміші для приготування лікарського засобу для лікування вищезгаданих нервових захворювань у таких пацієнтів (переважно людини, а також і тварини), які вже виявляють нейтралізуючі антитіла проти комплексу ботулінічного нейротоксину, зокрема, проти комплексу *Clostridium botulinum* типу А або В, або проти декількох комплексів, зокрема, проти комплексів *Clostridium botulinum* типу А і В (так званих повторних не-респондерів).

Нейротоксини, їх суміші або фармацевтичні композиції згідно з винаходом можуть знаходитися у вигляді водного розчину, зокрема, у вигляді водного ін'єкційного розчину, а також у вигляді ліофілізованих продуктів.

Відомі самі по собі чисті нейротоксини типів А-Г отримували згідно з протоколами, які містяться в публікаціях приведених в списку літератури. Як приклад описане очищення двох нейротоксинів (типу А і В) в нижченаведених прикладах.

Приклад 1: Виділення чистого нейротоксину

Чистий нейротоксин з *Clostridium botulinum*, типу А отримують згідно з способом, який засновується на способі DasGupta & Sathyamoorthy. *Clostridium botulinum* типу А культивують в ферментері на 20л в середовищі, яке складається з 2% протеозопептону, 1% дріжджового екстракту, 1% глюкози і 0,05% тіогліколяту натрію. Після 72 годин зростання токсин осаджують додаванням 3 н  $H_2SO_4$ . (кінцевий рН = 3,5). Осаджену і центрифуговану біомасу екстрагують 0,2 М натрій-фосфатним буфером рН 6,0.

Після відділення нуклеїнових кислот осадженням протамінсульфатом токсин осаджують додаванням сульфату амонію. Солюбілізований і діалізований проти 50мМ фосфату натрію рН 6,0 осадок зв'язують на колонці ДЕАЕ-Сефадекса при тому ж самому показнику рН і елюють 150мМ NaCl. Потім слідує хроматографія через колонку Сефадекса-QAE, яка урівноважена 50 Ш Tris/HCl- буфером рН 7,9. Токсин елюють за допомогою NaCl-градієнтів. На останній стадії токсин хроматографують через SP-Сефадекса при рН 7,0. При цьому пов'язаний токсин відділяють з колонки за допомогою NaCl-градієнтів (0-300мМ). Очищений токсин аналізують в електрофорезі в ДСН-поліакриламідному гелі (ДСН-ПААГ) і він виявляє чистоту 95±5%. Біологічну активність визначають в мишачому LD<sub>50</sub>-тесті: одній LD<sub>50</sub>-одиниці відповідають 4,8пг білка.

Приклад 2: Отримання готового лікарського засобу утримуючого один ботулінічний нейротоксин

Готують розчин очищеного нейротоксину з прикладу 1, який містить 200 мишачих LD<sub>50</sub>-одиниць, 10мг сахарози і 2мг людського сироваткового альбуміну на мл. По 0,5мл розчини вміщують у флакони і ліофілізують. Ліофілізати відновлюють у вигляді розчину фізіологічним розчином кухонної солі і визначають біологічну активність. Флакони містять 100±30 LD<sub>50</sub>-одиниць.

#### Приклад 3: Виділення чистого нейротоксину В

*Clostridium botulinum* типу В культивують в тому ж самому середовищі і при тих же самих умовах, що і *Clostridium botulinum* типу А, і обробляють для осадження сульфатом амонію. Потім слідує знову хроматографія на ДЕАЕ-Сефадексе при рН 6,0. Елюйовані з колонки 150мМ NaCl фракції очищують і діалізують проти фосфату натрію рН 7,0, після чого проводять хроматографію на QAE-Сефадексе. Утримуючі токсин фракції хроматографують потім з використанням ДЕАЕ-Сефадексу-хроматографії при рН 8,5 (50мМ Трис/HCl рН 8,5).

Нарешті отримують високо очищений ботулінічний токсин типу В з використанням хроматографії на гідроксилапатиті, урівноваженому 10мМ Na-фосфатом рН 8,0. Пов'язаний гомогенний токсин елюють 80мМ Na-фосфатом рН 8,0 і відразу після цього визначають біологічну активність в LD<sub>50</sub>-тесті (2-4 × 10<sup>7</sup> LD<sub>50</sub>-одиниць/мг білка).

#### Приклад 4: Виявлення антитіл

20 кроликів ін'єкували внутрішньошкірно 25 Ег BOTOX® протягом 12 тижнів з інтервалом 14 днів (5 ін'єкцій). Після 3 тижнів і після цього з інтервалом 14 днів отримували сироватку.

Антитіла проти нейротоксину А *Clostridium botulinum* виявляли за допомогою імуноферментного аналізу, з імобілізацією гомогенного нейротоксину на мікротитраційному планшеті. Зв'язуючі нейротоксин антитіла визначали кількісно з використанням другого міченого ферментом антитіла.

Результат представлений в таблиці 1. Уже через 5 тижнів після першого застосування можна було виявити антитіла у 5 кроликів. Через 11 тижнів містили антитіла проти нейротоксину сироватки 17 кроликів, отже, 85% тварин, що використовуються. У біологічному тесті визначення активності було показано, що 12 з 17 сироваток містили нейтралізуючі антитіла (таблиця 2).

Таблиця 1

Визначення проб сироваток (розведення 1:100) кроликів, оброблених BOTOX®, з використанням імуноферментного аналізу. Приведені GD<sub>490nm</sub> >01. Всі OD-показники скориговані за допомогою OD-показників преімуних сироваток

| № кролика | 3-й тиждень | 5-й тиждень | 7-й тиждень | 9-й тиждень | 11-й тиждень |
|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 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         |

\* Показники не були скориговані, оскільки не було преімуної сироватки

"-" означає оптичну щільність (OD<sub>490</sub>) < 0,1

Таблиця 2

| Нейтралізація за допомогою сироваток кроликів, оброблених BOTOX® (тиждень 11 після першої імунізації), в мишачому гемідіафрагмальному аналізі (межа детектування: 0,35МЕг/мл антитіл) |                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Кролик                                                                                                                                                                                | Нейтралізація мед/мл |
| 1                                                                                                                                                                                     | 2,0                  |
| 2                                                                                                                                                                                     | н.в.                 |
| 3                                                                                                                                                                                     | н.в.                 |
| 4                                                                                                                                                                                     | >10                  |
| 5                                                                                                                                                                                     | >100                 |
| 6                                                                                                                                                                                     | н.в.                 |
| 7                                                                                                                                                                                     | >10                  |
| 8                                                                                                                                                                                     | >10                  |

|    |       |
|----|-------|
| 9  | н.в.  |
| 10 | н.в.  |
| 11 | н.в.  |
| 12 | >10   |
| 13 | н.в.  |
| 14 | н.в.  |
| 15 | <0,35 |
| 16 | 0,4   |
| 17 | >10   |
| 18 | >10   |
| 19 | 2,0   |
| 20 | >10   |

н.в. = не визначали

Приклад 5: Тест на антигенність з комерційно доступним продуктом і чистим нейротоксином

Після того як було показано, що комплекс з нейротоксину і гемагглютининів і нетоксичного, не-гемагглютинуючого білка індукує утворення нейтралізуючих антитіл, досліджували імуногенну дію чистого нейротоксину (типу А). Для цього обробляли 8 кроликів комплексом токсину і 12 кроликів чистим токсином. Згідно з описаним вище способом (див. приклад 1), використали 25Ег кожних препаратів за допомогою підшкірного введення. Кількість нейротоксину, виміряна по вазі, була однаковою в обох препаратах (200пг/доза), як була визначене в ELISA. BOTOX® містив ще додатково комплексні білки (біля 800пг/доза).

Чотири з восьми оброблених BOTOX® тварин виявили в ELISA титр антитіл, в той час як у 12 оброблених чистим нейротоксином тварин не були виявлені антитіла проти чистого нейротоксину. Цей результат був підтверджений в тесті на біологічну активність. Всі чотири сироватки кроликів містили титр нейтралізуючих антитіл, яких інгібували дію токсину (таблиця 3).

Таблиця 3

Нейтралізація сироватками (розведення 1:3) кроликів, оброблених BOTOX® (тиждень 11 після першої імунізації), в мишачому гемідіафрагмальному аналізі  
(межа детектування: 1 мЕг/мл антитіл)

| Кролик | Нейтралізація мЕг/мл |
|--------|----------------------|
| 1      | 12мЕг                |
| 2      | >30мЕг               |
| 3      | 4,5мЕг               |
| 8      | >30мЕг               |

Приклад 6: (Порівняльний приклад)

У цьому експерименті порівнювали утворення антитіл при використанні BOTOX® з утворенням антитіл при використанні DYSPOORT®. Для цього в кожному випадку десять кроликів обробляли або BOTOX® (група 1), або DYSPOORT® (група 2), або чистим нейротоксином (група 3) згідно з описаною схемою.

У той час як в групі 1 і групі 2 більше за 50% тварин утворили титр нейтралізуючих антитіл, сироватки тварин групи 3 не містили антитіл.

Приклад 7: Клінічне випробування

Пацієнт (у віці 45 років), якого протягом 5 років лікували BOTOX® з приводу спастичної кривошиї, розвинув титр антитіл 3мЕг/мл сироватки. Ні BOTOX®, ні DYSPOORT® не були терапевтично ефективними у випадку цього пацієнта. Спроба терапії чистим ботулінічним нейротоксином в дозі 145Ег, яка була еквівалентна останній ін'єкційній дозі BOTOX®, в межах 72 годин привела до розслаблення м'язу, до нормалізації положення голови і до зникнення м'язових болів. Небажані побічні дії не були виявлені.

Приклад 8: Клінічне випробування

Пацієнта (у віці 52 років) протягом 3 років лікували BOTOX® з приводу церебрального парезу. Він розвинув титр антитіл 1мЕг/мл сироватки, тому це лікування повинне було бути припинене. Ін'єкція 200Ег чистого нейротоксину зробила можливою успішне лікування.

Література

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; Analyst, 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.