

Botulotoxinum A: farmakologické předpoklady pro terapeutický účinek

MUDr. Jiří Slíva, Ph.D.

Ústav farmakologie 3. LF UK, Praha

Botulotoxin produkovaný bakteriemi *Clostridium botulinum* patří mezi dnes nejsilnější známé neurotoxiny. V článku je pojednán jeho základní mechanismus účinku v kontextu potenciálu k terapeutickému využití u svalových spasticit a jiných poruch. Jelikož je dnes k dispozici několik léčivých přípravků s obsahem botulotoxinu, je v textu věnována pozornost mj. jejich vzájemné odlišnosti, která je hlavním předpokladem i pro odlišnou imunogenicitu.

Klíčová slova: *Clostridium botulinum*, botulotoxin, spasticita, imunogenita, neurotoxin, incobotulotoxin A.

Botulinumtoxinum A: pharmacological prerequisites for therapeutic effect

Botulinumtoxin is one of the most poisonous neurotoxin produced by the bacterium *Clostridium botulinum*. This paper deals with the basic mechanism of action in the context of its potential for therapeutic use in muscle spasticity and other disorders. Since today there are several medicines containing botulinumtoxin, in the text, among others, their mutual differences have been addressed. These play an important role for different immunogenicity profiles.

Key words: *Clostridium botulinum*, botulinumtoxin, spasticity, immunogenicity, neurotoxin, incobotulinumtoxin A.

Úvod

Botulotoxin (syn. klobásový jed) je přirozený neurotoxin produkovaný anaerobními sporujícími bakteriemi *Clostridium botulinum*, přičemž aktuálně je známo sedm biochemicky a sérologicky odlišných variant (BoNT/A až BoNT/G). Požití stravy kontaminované tímto toxinem vede k intoxikaci známé jako botulismus, prvně popsán již v 17. století (Erbuth et Naumann, 1999). Mnohem později byla u dětí popsána kolonizace střev neurotoxickými variantami *C. botulinum*; posledním známým patologickým korelátem je vniknutí a pomnožení těchto bakterií v ranách (pozn.: v těchto souvislostech je častěji zmiňováno *C. difficile*, resp. *C. perfringens*) (Simpson, 2004). Toxiny jsou bakteriemi tvořeny jako tzv. progenitorní toxiny v podobě různých velkých komplexů sestávajících z neaktivního polypeptidového řetězce o molekulové hmot-

nosti nad 150 kDa a dalších vedlejších řetězců. Jejich úloha spočívá v ochraně hlavního řetězce před poškozením kyselým žaludečním prostředím. V tenkém střevě se tyto řetězce rozpojí a hlavní polypeptid je vstřebáván. Jde o vůbec jednu z nejvíce toxických sloučenin, přičemž letální dávky odpovídají femtomolárním koncentracím.

Botulotoxin dnes nachází bohaté využití u řady patologických stavů – blefarospasmus, hemifaciální spazmy, laryngeální dysfonie, dystonie hlavy a krku, strabismus, dystonie v pletenci, křeče, anální fisury a rektální spazmy, palmární a axilární hyperhidróza, hypersalivace, bolest hlavy, hyperaktivní močový měchýř apod. V České republice je aktuálně k dispozici několik léčivých přípravků s obsahem účinné látky botulotoxinum A, jedním z nich je Xeomin 50 a Xeomin 100. Vedle čištěného aktivního neurotoxinu přípravek obsahuje lidský albumin

zabraňující adsorpci neurotoxinu na stěnu lachrymální a následně stříkačky s jehlou a sacharózu sloužící jako prevence krystalizace. Oproti ostatním přípravkům se mj. odlišuje i podmínkami pro uchovávání, kdy je možné jej bezpečně skladovat při pokojové teplotě (Prager, 2013). Indikace této formy botulotoxinu zahrnují symptomatickou léčbu blefarospazmu, cervikální dystonie s převážně rotační formou (torticollis spastica) a spasticit horních končetin po cévní mozkové příhodě projevujících se flektovaným zápěstím a sevřenou pěstí. Vedle známé přecitlivělosti na kteroukoliv obsaženou látku naopak nesmí být podáván u generalizované poruchy svalové aktivity (např. myasthenia gravis, Lambert-Eatonův syndrom) a u infekcí či zánětu v zamýšleném místě aplikace. Zároveň by neměl být používán u těhotných žen, pokud to není bezpodmínečně nutné; použití během kojení se nedoporučuje.



KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA:

MUDr. Jiří Slíva, Ph.D., jiri.sliva@lf3.cuni.cz

Ústav farmakologie 3. LF UK, Praha, Ruská 87, 100 00 Praha 10

Cit. zkr: Neurol. praxi 2017; 18(3): 212–215



JSME UNIKÁTNÍ

Neměla by být
naše terapie BoNT
také unikátní ?

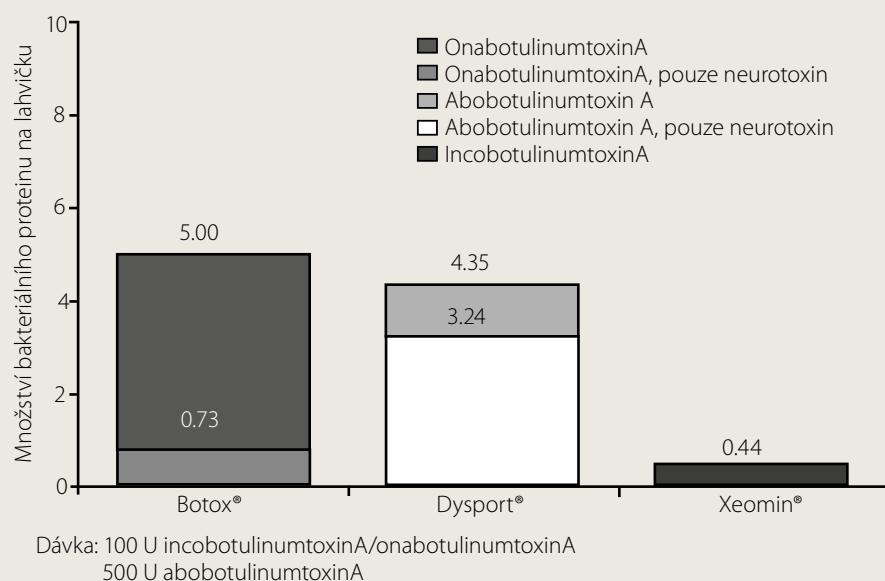
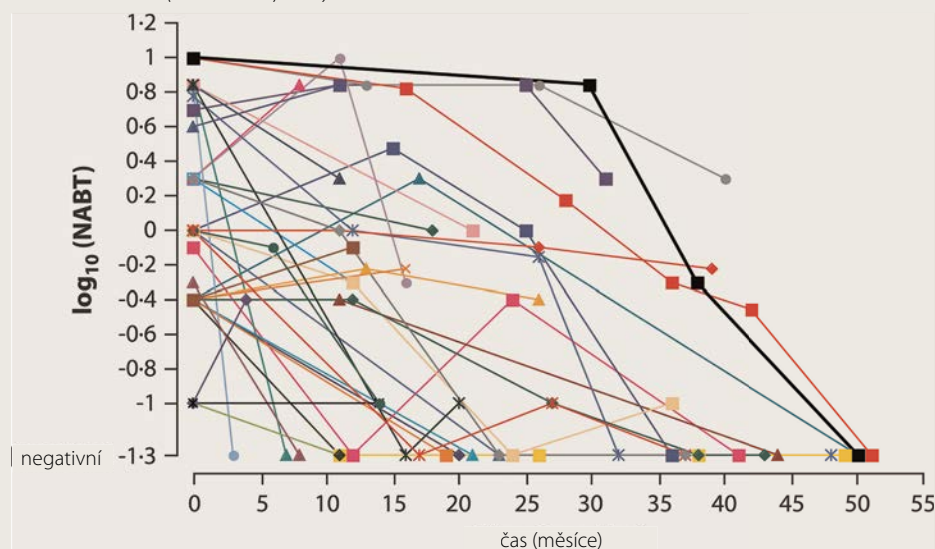


Zkrácená informace o přípravku:

XEOMIN® 100 LD50 jednotek prášek pro injekční roztok

Účinná látka: Clostridium botulini neurotoxinum typus A

Indikace: U dospělých k symptomatické léčbě blefarospasmu, cervikální dystonie převážně rotační formy (torticollis spastica) a spasticity horních končetin po cévní mozkové příhodě projevující se flektovaným zápěstím a sevřenou pěstí. **Kontraindikace:** Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na pomocnou látku. Generalizované poruchy svalové aktivity (např. myastenia gravis, Lambert-Eatonův syndrom). Infekce či zánět v navrhovaném místě aplikace. **Dávkování:** Optimální dávku a počet míst vpichu v léčeném svalu by měl lékař u každého pacienta určit individuálně. Je nutné provést titraci dávky. **Interakce:** Nebyly provedeny žádné studie interakcí. **Nežádoucí účinky:** Bolest hlavy, faciální paréza, ptóza očního víčka, suché oči, sucho v ústech, dysfagie, vyrážka, pre-synkopa, závrať, bolest šíje, svalová slabost, myalgie, svalová křeč, ztuhlost svalů a kostí. **Těhotenství a kojení:** Nejsou k dispozici žádné adekvátní údaje o použití botulotoxinu typu A u těhotných žen. Není známo, je-li botulotoxin typu A vylučován do mateřského mléka. Proto XEOMIN® nemá být používán během kojení. **Uchovávání:** Neotevřená injekční lahvička: Uchovávejte při teplotě do 25 °C. Podmínky uchovávání tohoto léčivého přípravku po jeho rekonstituci jsou uvedeny v bodě 6.3. SPC. **Upozornění:** Před podáním přípravku XEOMIN se musí lékař nejprve seznámit s anamnézou pacienta a změnami vyvolanými předchozími chirurgickými výkony. Je třeba dbát na to, aby XEOMIN nebyl podán do cévy. **Držitel rozhodnutí o registraci:** Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt/Main, SRN. **Datum poslední revize textu:** 9. 12. 2015 Výdej léčivého přípravku je vázán na lékařský předpis, přípravek je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Seznamte se prosím se Souhrnem údajů o přípravku (SPC). Zástupce držitele rozhodnutí o registraci: Desitin Pharma spol. s r.o., Opletalova 25, 110 00 Praha 1, www.desitin.cz

Obr. 1. Obsah bakteriálního proteinu a neurotoxinu v jednotlivých léčivých přípravcích s obsahem incobotulotoxinu A (Benecke, 2012)

Obr. 2. Pokles neutralizačních protilátek u nemocných s cervikální dystonií převedených na léčbu incobotulotoxinem A (Heftner et al., 2012)


Mechanismus účinku a farmakodynamické vlastnosti

Aktivní botulotoxin sestává ze třech částí: C-terminální doména zodpovídá za presynaptickou vazbu toxinu, N-terminální doména (L-řetězec) je Zn^{2+} dependentní endopeptidáza a prostřední část zprostředkovává translokaci L-řetězce do cytosolu nervového výběžku.

Mechanismus účinku botulotoxinu spočívá ve čtyřech po sobě následujících krocích: 1) rychlá a specifická vazba na membránu cholinergních zakončení; 2) internalizace (endocytóza); 3) translokace spuštěná acidifikací endozomu, kdy po vytvoření póru v jeho membráně vstupuje L-řetězec do cytosolu; 4) proteolytická aktivita s narušením synaptosomálních proteinů SNAP-25, syntaxin a synaptobrevin (komplex

SNARE) nezbytných pro uvolnění acetylcholinu. Konečným důsledkem je tedy blokáda uvolňování acetylcholinu do synaptické štěrbin. Délka trvání tohoto účinku se odvíjí od sérotypu botulotoxinu, dávky, typu cholinergního vlákna a přirozeně závisí i na živočišném druhu, včetně člověka. Vzhledem ke specifitě účinku jsou dotčenými cílovými strukturami reagujícími na botulotoxin kosterní svaly, žlázy a hladké svalové buňky. Nervová zakončení neuromuskulárních spojení dále neodpovídají na nervové impulzy a sekrece neurotransmiteru na motorických ploténkách je blokována (chemická denervace). Mechanismus obnovení přenosu vzruchu spočívá ve tvorbě nových nervových zakončení a opětovném vytvoření motorických plotének. K úplnému obnovení funkce nervosvalových

plotének/přenosu vzruchu dochází obvykle během 3–4 měsíců po intramuskulární injekci, kdy nervová zakončení dorostou a znovu vytvoří nervosvalovou ploténku (Montecucco et al., 2005).

Imunogenicita

Dlouhodobé podávání peptidů či proteinů za terapeutickým účelem představuje riziko tvorby protilátek, které na ně mohou působit neutralizačně. Pravděpodobnost jejich vzniku úzce koreluje s délkou léčby a četností podávání (Goschel et al., 1997). Současně tvorbu protilátek indukuje větší množství aplikovaného neurotoxinu a přítomnost nečistot ve finálním léčivém přípravku (Frevert et al., 2010). Přípravek Xeomin představuje technologicky nejnovější generaci přípravků s obsahem botulinu A. Botulotoxin A v proteinovém komplexu je získáván z bakteriálního precipitátu po odstranění těl bakterií; následuje purifikace s odstraněním komplexujících proteinů a lyofilizace, kdy je získán čistý aktivní neurotoxin, čímž se odlišuje od ostatních botulotoxinových přípravků (Frevert, 2010; Albanese, 2011). Průměrná koncentrace botulotoxinu A (onabotulinum toxin A; 900 kDa) v přípravcích Botox a Vistabel je 0,73 ng/100 jednotek, 3,24 ng (abobotulinum toxin A; 500–600 kDa) na 500 jednotek a 0,44 ng (incobotulinum toxin A; 150 kDa) na 100 jednotek přípravku Xeomin (obrázek 1) (Benecke, 2012). Další odlišnosti jsou rovněž zřejmé ve specifické biologické aktivitě, a to ve prospěch čistěného aktivního neurotoxinu (tabulka 1) (Frevert, 2010).

Na úrovni preklinických studií byla imunogenicitu intradermálně aplikovaného incobotulotoxinu A porovnávána oproti onabotulotoxinu A a abobotulotoxinu A u králíků ($n = 60$). Opakovaná aplikace incobotulotoxinu A byla prováděna vytvořením protilátek pouze u jednoho králíka a tyto navíc neměly neutralizační charakter. Naproti tomu vznik neutralizačních protilátek byl zaznamenán u 4 králíků léčených onabotulotoxinem A a u 15 králíků léčených abobotulotoxinem A. Užití dávky incobotulotoxinu byly přitom 4–5× vyšší než je ekvivalent klinicky doporučené nejvyšší dávky ve schválených indikacích (Blumel et al., 2006; Jost et al., 2007; Jimenez-Shahed, 2012). Obdobně vyzněly též experimenty u makaků (*Macaca fascicularis*), kterým byl incobotulotoxin A aplikován ve čtyřtydenních intervalech v dávkách 4, 8 ne-

Tab. 1. Porovnání základních charakteristik přípravků s obsahem botulotoxinu A (Frevert, 2010; Frevert, 2015)

	Botox/Vistabel (onabotulinum toxin A)	Xeomin/Bocouture (incobotulinum toxin A)	Dysport/Azzalure (abobotulinum toxin A)
počet jednotek/lahvička	50/100/200	50/100	300/500
výrobní proces	vakuové sušení	lyofilizace	lyofilizace
izolační proces	precipitace	precipitace a chromatografie	precipitace a chromatografie
molekulová hmotnost (kDa)	900	150	500–600
složení	komplex botulotoxinu	čištěný neurotoxin	komplex botulotoxinu
celkové množství klostridiálního proteinu/100 j. (ng)	5,0	0,44	4,87
množství neurotoxinu na 100 j. (ng)	0,73	0,44	0,65
specifická biologická aktivita (j./ng)	137	227	154
skladovatelnost	2–8 °C 2–3 roky	pokožková teplota 3–4 let	2–8 °C 2 roky

bo 16 j./kg. Jakkoliv byl neurotoxin biologicky účinný, tvorba neutralizačních protilátek nebyla pozorována u žádné z aplikovaných dávek (Eisele et al., 2008).

Tyto výsledky byly replikovány též na úrovni klinických studií. Svědčí o tom např. závěry 89týdenní studie, v rámci které byl incobotulotoxin A podáván nemocným se spasticitou horních končetin – u žádného z nemocných se během léčby neobjevily neutralizační protilátky (Kanovsky et al., 2009). Rovněž v žádné z dosud realizovaných studií III. a IV. fáze nebyl

výskyt neutralizačních protilátek proti této látce zaznamenán (Truong et al., 2013; Jost et al., 2015). V prizmatu běžné klinické praxe jsou zajímavé výsledky prospektivní kohortové studie, ve které byl incobotulotoxin A podáván nemocným s již přítomnými neutralizačními protilátkami vytvořenými na základě předchozí léčby některým z jiných botulinových přípravků. Nemocným s cervikální dystonií ($n = 37$) nedostatečně reagujících na dosavadní léčbu byl incobotulotoxin A podáván v konstantní dávce 200 j./inj. po dobu jednoho roku a dále až 500

j. po dalších 36 měsících. Navzdory iniciálnímu přetrvávajícímu vzestupu titru neutralizačních protilátek v prvních dvou letech léčby u některých nemocných došlo nakonec u většiny léčených k jejich poklesu, a to dokonce pod výchozí hodnotu – obrázek 2 (Heftner et al., 2012).

Farmakokinetické vlastnosti

Klasické kinetické a distribuční studie nelze s botulotoxinem typu A provádět, protože se léčivá látka aplikuje v malých množstvích (pikogramy na injekci) a váže se rychle a ireverzibilně na cholinergní nervová zakončení.

Lékové interakce

Žádné klinické studie primárně zaměřené na zhodnocení interakčního potenciálu botulotoxinu nebyly prováděny. Nicméně lze předpokládat potenciaci účinku při současném podávání aminoglykosidových antibiotik nebo interakci s periferními myorelaxancií (preferovány by měly být v případě nutnosti jejich podání látky s kratší délkou svého účinku). Nižší účinek botulotoxinu lze očekávat při současném podávání 4-aminocholinů, dnes využívaných jako antimalarika.

LITERATURA

1. Albanese A. Terminology for preparations of botulinum neurotoxins: what a difference a name makes. *JAMA* 2011; 305: 89–90.
2. Benecke R. Clinical relevance of botulinum toxin immunogenicity. *BioDrugs* 2012; 26: e1–e9.
3. Blumel J, Frevert J, Schwaier A. Comparative antigenicity of three preparations on botulinum neurotoxin A in the rabbit. *Neurotox Res* 2006; 9: 238.
4. Eisele KH, Taylor HV, Blumel JJ. Immunogenicity of NT201 (Xeomin®) in Cynomolgus monkeys following high-dose injections. *Mov Disord* 2008; 23: S5.
5. Erbguth FJ, Naumann M. Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786–1862) and the "sausage poison". *Neurology* 1999; 53: 1850–1853.
6. Frevert J. Content of botulinum neurotoxin in Botox(R)/Vistabel(R), Dysport(R)/Azzalure(R), and Xeomin(R)/Bocouture(R). *Drugs R D* 2010; 10: 67–73.
7. Frevert J. Pharmaceutical, biological, and clinical properties of botulinum neurotoxin type A products. *Drugs R D* 2015; 15: 1–9.
8. Frevert J, Dressler D. Complexing proteins in botulinum toxin type A drugs: a help or a hindrance? *Biologics* 2010; 4: 325–332.
9. Goschel H, Wohlfarth K, Frevert J, Dengler R, Bigalke H. Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies--therapeutic consequences. *Exp Neurol* 1997; 147: 96–102.
10. Heftner H, Hartmann C, Kahlen U, Moll M, Bigalke H. Prospective analysis of neutralising antibody titres in secondary non-responders under continuous treatment with a botulinumtoxin type A preparation free of complexing proteins--a single cohort 4-year follow-up study. *BMJ Open* 2012; 4: pii: e000646.
11. Jimenez-Shahed J. A new treatment for focal dystonias: incobotulinumtoxinA (Xeomin(R)), a botulinum neurotoxin type A free from complexing proteins. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2012; 8: 13–25.
12. Jost WH, Benecke R, Hauschke D, Jankovic J, Kanovsky P, Roggenkamper P, Simpson DM, Comella CL. Clinical and pharmacological properties of incobotulinumtoxinA and its use in neurological disorders. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9: 1913–1926.
13. Jost WH, Blumel J, Grafe S. Botulinum neurotoxin type A free of complexing proteins (XEOMIN) in focal dystonia. *Drugs* 2007; 67: 669–683.
14. Kanovsky P, Platz T, Comes G, Grafe S, Sassini I. NT 201, botulinum neurotoxin free from complexing proteins (Xeomin®) provided sustained efficacy and was safe in spasticity: 89 weeks long-term data. *J Neurol Sci* 2009; 285: S75–S76.
15. Montecucco C, Molgo J. Botulinum neurotoxins: revival of an old killer. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5: 274–279.
16. Prager W. Differential characteristics of incobotulinumtoxinA and its use in the management of glabellar frown lines. *Clin Pharmacol* 2013; 5: 39–52.
17. Simpson LL. Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 167–193.
18. Truong DD, Gollomp SM, Jankovic J, LeWitt PA, Marx M, Hanschmann A, Fernandez, HH. Sustained efficacy and safety of repeated incobotulinumtoxinA (Xeomin(R)) injections in blepharospasm. *J Neural Transm (Vienna)* 2013; 120: 1345–1353.