

Aus der Klinik für Neurologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth

**Neutralisierende Antikörper gegen  
Botulinumneurotoxin- Eine Analyse  
relevanter Einflussfaktoren**

---

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

Vorgelegt von  
Alexander Jansen

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Philipp Albrecht

Zweitgutachter/in: PD Dr. med. Thomas Schroeder

## **Auflistung eigener Publikationen**

### **Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Philipp Albrecht, Alexander Jansen, John-Ih Lee, Marek Moll, Marius Ringelstein, Dietmar Rosenthal, Hans Bigalke, Orhan Aktas, Hans-Peter Hartung, Harald Hefter, High prevalence of neutralizing antibodies after long-term botulinum neurotoxin therapy. *Neurology®*, 2019 Jan 1;92(1):48-54.

## **Zusammenfassung (deutsch)**

Wiederholte Injektionen von Botulinumneurotoxin (BoNT) gehen mit dem Risiko, neutralisierende Antikörper (NAbs) zu entwickeln einher. Diese NAbs stehen möglicherweise mit der Entwicklung eines sekundären Therapieversagens (STF) im Zusammenhang. Die Inzidenz von NAbs bei kontinuierlicher BoNT-Behandlung von Dystonien oder Spastiken liegt zwischen 0,5 und 1,5% pro Jahr, folglich sind Prävalenzwerte von bis zu über 15% bei Patienten unter Langzeittherapie über 10 Jahren oder länger anzunehmen. Diese Annahme konnte bereits für Patienten mit Zervikaler Dystonie und Cerebralparese bestätigt werden, jedoch noch nicht für Patienten mit anderen Dystonien oder adulter Spastik. Bisherige Studien waren häufig auf einzelne Indikationen, oder auf Patienten mit STF beschränkt und unterliegen somit einer statistischen Verzerrung.

In dieser Arbeit wurde ein nicht vorselektiertes Kollektiv bestehend aus 596 Patienten unter BoNT-Langzeittherapie untersucht, um den Einfluss verschiedener Faktoren zu analysieren. Eingeschlossen wurden insgesamt 596 Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen, die sich in regelmäßiger Behandlung in der Botulinumtoxin-Ambulanz der neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf befanden. Serumproben von den eingeschlossenen Patienten wurden auf das Vorhandensein von NAbs getestet. Hierfür wurde zunächst eine Analyse mittels ELISA durchgeführt. Positiv getestete Proben wurden erneut per Maus-Hemidiaphragma Analyse auf das Vorhandensein von NAbs untersucht. Die Prävalenz von NAbs wurde für die verschiedenen Behandlungsindikationen sowie im Gesamtkollektiv ermittelt. Mittels binärer logistischer Regressionsanalyse wurden Einflussfaktoren analysiert, die signifikant zur Bildung von NAbs beitragen. Im Gesamtkollektiv konnten bei 83 von 596 Patienten (13,9%) NAbs nachgewiesen werden. Die Wahrscheinlichkeit NAbs zu entwickeln stieg signifikant mit der verwendeten Dosis pro Injektion, sowie der kumulativen Gesamtdosis und wurde durch das verwendete Präparat beeinflusst.

Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass wiederholte Injektionen von BoNT die Wahrscheinlichkeit erhöhen, NAbs zu entwickeln. Neben der Vermeidung von kurzen Injektionsintervallen könnte die Reduktion der verwendeten Injektionsdosen, unabhängig von der Behandlungsindikation, das Risiko der Entstehung von NAbs und somit eines STF reduzieren.

## **Zusammenfassung (englisch)**

Repetitive injections of botulinum neurotoxin (BoNT) bear the risk of induction of neutralizing antibodies (NABs), which may lead to secondary treatment failure (STF). The incidence of NABs during continuous treatment of dystonia or spasticity with BoNT ranges between 0.5%/year and 1.5%/year. This implies that high values of up to 15% can be expected for the prevalence of NABs in patients being treated for  $\geq 10$  years. This has been confirmed for patients with cervical dystonia and cerebral palsy but not for patients with other dystonias or adult spasticity. Previous studies have often focused on single indications or on patients with STF, creating a selection bias.

In this monocentric, observational cross-sectional study, 596 out-patients treated with BoNT for different indications were tested for BoNT binding antibodies by ELISA. Positive samples were investigated for neutralizing antibodies (NABs) using the mouse hemidiaphragm test. The prevalence of NABs was analyzed for the different indications. Besides the rate of NAB-positive patients overall and per patient subgroup, a stepwise binary logistic regression analysis performed to identify factors significantly contributing to the induction of NABs. Overall, 83 out of 596 patients (13.9%) had measurable NABs. The probability to develop NABs increased with the single and cumulative dose of treatment and was influenced by the BoNT formulation while all other factors analyzed had no additional influence.

Repeated injections of BoNT inevitably bear the risk of developing NABs. However, in addition to avoid short intervals between injections reducing the individual injected doses may diminish the risk of NAB induction and the emergence of STF independent of the indication for which BoNT is used.

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |  |
|--------------------|--|
| <b>BoNT</b>        | Botulinumneurotoxin                      |
| <b>ACH</b>         | Acetylcholin                             |
| <b>kDA</b>         | Kilodalton                               |
| <b>ona-BoNT-A</b>  | onabotulinumtoxinA                       |
| <b>abo-BoNT-A</b>  | abobotulinumtoxinA                       |
| <b>inco-BoNT-A</b> | incobotulinumtoxinA                      |
| <b>MU</b>          | mouse unit                               |
| <b>CD</b>          | Zervikale Dystonie                       |
| <b>ODT</b>         | Andere Dystonien                         |
| <b>BSP</b>         | Blepharospasmus                          |
| <b>ZNS</b>         | Zentralnervensystem                      |
| <b>FHS</b>         | Spasmus hemifacialis                     |
| <b>N.</b>          | Nervus                                   |
| <b>SPAS</b>        | Spastik                                  |
| <b>AK</b>          | Antikörper                               |
| <b>NAb</b>         | Neutralisierender Antikörper             |
| <b>NAP</b>         | Nicht-neutralisierender Antikörper       |
| <b>PTF</b>         | Primäres Therapieversagen                |
| <b>STF</b>         | Sekundäres Therapieversagen              |
| <b>uDU</b>         | <i>Unified dose units</i>                |
| <b>ELISA</b>       | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |
| <b>MHDA</b>        | Maus-Hemidiaphragma Analyse              |
| <b>MPA</b>         | <i>mouse protection assay</i>            |

# Inhaltsverzeichnis

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Einleitung .....  | 1  |
| 1.1   | Vorwort.....  | 1  |
| 1.2   | Botulinumtoxin .....  | 1  |
| 1.2.1 | Allgemeines .....   | 1  |
| 1.2.2 | Geschichte des Botulinumtoxins .....  | 2  |
| 1.2.3 | Wirkungsmechanismus und Struktur des BoNT .....   | 3  |
| 1.2.4 | Handelspräparate: .....   | 7  |
| 1.2.5 | Nebenwirkungen, Kontraindikationen und Therapiesicherheit .....                                   | 10 |
| 1.3   | Botulinumtoxin in der Behandlung verschiedener neurologischer<br>Erkrankungen: .....              | 11 |
| 1.3.1 | Zervikale Dystonie.....   | 11 |
| 1.3.2 | Andere Dystonien .....  | 12 |
| 1.3.3 | Blepharospasmus .....   | 13 |
| 1.3.4 | Spasmus hemifacialis.....   | 13 |
| 1.3.5 | Spastik.....  | 14 |
| 1.4   | Antigenität und Neutralisierende Antikörper .....   | 15 |
| 1.5   | Primäres und Sekundäres Therapieversagen .....  | 18 |
| 1.5.1 | Primäres Therapieversagen.....  | 18 |
| 1.5.2 | Sekundäres Therapieversagen.....  | 19 |
| 1.6   | Ziele der Arbeit:.....  | 20 |
| 2     | Material und Methoden .....   | 21 |
| 2.1   | Ethikvotum: .....   | 22 |
| 2.2   | Patientenkollektiv: .....   | 22 |
| 2.3   | Detektieren von BoNT-Antikörpern:.....  | 23 |
| 2.3.1 | ELISA: .....  | 24 |
| 2.3.2 | Maus-Hemidiaphragma-Analyse .....   | 25 |
| 2.4   | Statistische Analyse .....  | 26 |
| 3     | Ergebnisse.....   | 26 |
| 3.1   | Übersicht über das Patientenkollektiv: .....  | 27 |
| 3.2   | Kaplan-Meier-Analyse zur Entstehung von NAbs in den verschiedenen<br>Indikations-Subgruppen ..... | 32 |
| 3.3   | Einfluss der durchschnittlichen Einzeldosis auf die Entstehung von NAbs... 33                     |    |
| 3.4   | Regressionsanalyse .....  | 35 |
| 4     | Diskussion .....  | 36 |
| 4.1   | Prävalenz von NAbs im Gesamtkollektiv.....  | 37 |
| 4.2   | Vergleich der NAb-Prävalenzen in den Indikations-Subgruppen .....                                 | 38 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.2.1 | CD-Subgruppe .....  | 39 |
| 4.2.2 | BSP-Subgruppe.....  | 40 |
| 4.2.3 | ODT-Subgruppe.....  | 41 |
| 4.2.4 | SPAS-Subgruppe .....  | 41 |
| 4.2.5 | FHS- Subgruppe .....  | 43 |
| 4.3   | Einflussfaktoren auf die Entstehung von NAbs:.....                    | 43 |
| 4.3.1 | Einflussfaktor verwendetes Präparat .....                             | 44 |
| 4.3.2 | Einflussfaktor Einzeldosis pro Injektion.....                         | 45 |
| 4.3.3 | Einflussfaktor Injektionsintervall .....                              | 46 |
| 4.3.4 | Einflussfaktoren Behandlungsdauer und kumulative Lebenszeitdosis..... | 46 |
| 4.3.5 | Einflussfaktor Krankheitsbild .....                                   | 48 |
| 5     | Zusammenfassung/Fazit: .....  | 48 |
| 6     | Literaturverzeichnis .....  | 51 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Vorwort

Die vorliegende Dissertation beinhaltet Ergebnisse der im Jahr 2019 in der Fachzeitschrift „Neurology“ publizierten Studie „High prevalence of neutralizing antibodies after long-term botulinum neurotoxin therapy“ (Albrecht et al). An der Veröffentlichung wirkten mehrere Co-Autoren mit, unter anderem auch der Verfasser der vorliegenden Dissertation. Die in der Dissertation dargestellten und diskutierten Daten und Ergebnisse finden sich bereits in der oben genannten Publikation.

## 1.2 Botulinumtoxin

### 1.2.1 Allgemeines

Bei Botulinumneurotoxin (BoNT) handelt es sich um einen bakteriellen Toxinkomplex. Es existieren sieben verschiedene Toxin-Subtypen (Serotypen), die mit den Buchstaben A-G gekennzeichnet werden. BoNT wird durch die obligat anaeroben, sporenbildenden Bakterien *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyrricum*, *Clostridium barati* und *Clostridium argentinensis* gebildet [1, 2]. Die ersten Hinweise auf eine mögliche therapeutische Anwendung lieferte der deutsche Arzt und Dichter Justinus Kerner bereits im Jahr 1817, als er das Toxin in verdorbenen Wurstprodukten entdeckte und die mit dem Verzehr verbundenen Wirkungen auf den menschlichen Organismus beschrieb [3]. Der erstmalige Einsatz zur Therapie eines Krankheitsbildes wurde im Jahr 1977 durch Allen B. Scott zur alternativen Behandlung des Strabismus dokumentiert [4]. Seither hat sich das Indikationsspektrum deutlich ausgeweitet, so werden heute unter anderem zahlreiche neurologische Erkrankungen wie fokale Dystonien, Spastiken und andere Bewegungsstörungen mit BoNT-Injektionen behandelt [5, 6]. Weitere Behandlungsfelder eröffneten sich in der Urologie, in der Formen von Blasenentleerungsstörungen mit der Injektion von BoNT behandelt werden können. In der Gastroenterologie besteht die Möglichkeit BoNT bei Achalasie und Sphinkter- Dysfunktionen lokal zu injizieren. Im Fachbereich der Pädiatrie ist die infantile Cerebralparese eine wichtige Therapieindikation. Ebenfalls zu erwähnen ist der immer häufigere Einsatz in der ästhetischen Medizin, hier wird immerhin fast die Hälfte der weltweit produzierten

BoNT-Produkte aufgebraucht [6]. Eine vielversprechende Therapieoption stellt der Einsatz von BoNT zudem in der Behandlung der chronischen Migräne dar, es konnte eine Senkung der Frequenz und des Schweregrades der Migräne-Attacken gezeigt werden [7]. Es besteht zudem die Möglichkeit einer intraglandulären Injektion von BoNT zur Behandlung der Hypersalivation zum Beispiel bei Patientin mit Morbus Parkinson oder Amyotropher Lateralsklerose [8].

## 1.2.2 Geschichte des Botulinumtoxins

Die ersten Aufzeichnungen zu den Wirkungen des Botulinumtoxins wurden durch den aus Baden-Württemberg stammenden Arzt und Dichter Julius Kerner im Jahr 1817 gemacht. Er gilt als Erstbeschreiber des sogenannten Botulismus (botulus als lateinisches Wort für Wurst), welcher sich unter anderem durch Symptome wie Mundtrockenheit, verminderter Drüsensekretion, Darm- und Harnblasen-Atonie und motorischen Lähmungserscheinungen bemerkbar machte. Daher war in dieser Zeit auch von der Kerner'schen Erkrankung die Rede. Die Erkrankung wurde damals vor allem im Zusammenhang mit dem Verzehr von Wurstprodukten beobachtet, daher kam es zu der bis heutige geläufigen Bezeichnung Botulismus. Julius Kerner beschrieb schon damals die beobachteten Symptome, den Verlauf und die erhobenen Untersuchungsbefunde bei einer Vergiftung nach dem Verzehr von Wurst mit einem beeindruckenden Detailreichtum. Bereits zu dieser Zeit spekulierte er über einen hypothetischen therapeutischen Einsatz von BoNT [3, 9]. Erst viele Jahre nach den Beobachtungen von Julius Kerner gelang es dem Mikrobiologen Professor Piere Emile van Ermengem, das für den Botulismus verantwortliche Bakterium zu isolieren. Er untersuchte Personen, welche nach dem Verzehr von rohem Schinken bei einer Trauerfeier gestorben waren. Bei genaueren Untersuchungen des verzehrten Essens und einer Autopsie der verstorbenen Personen konnte er einen anaeroben Keim finden, welchen er zunächst *Bacillus botulinus* nannte [10]. Erst im Jahre 1924 erfolgte die Umbenennung in die bis heute geläufige Erreger-Bezeichnung *Clostridium botulinum*. Im Laufe der Zeit konnte der Erreger in vielen verschiedenen Lebensmitteln und nicht wie anfänglich vermutet nur in Wurst-oder Fleischwaren nachgewiesen werden. Exemplarisch beschrieb Landmann im Jahre 1904 die Isolierung eines weiteren BoNT-produzierenden Bakterien-Stammes aus grünen Bohnen [11]. Leuchs griff die Beobachtungen von Landmann, dass es mehr als einen Stamm des Erregers geben muss, im Jahr 1910 auf und verglich zwei der bisher

nachgewiesenen Stämme bezüglich ihrer Wachstumseigenschaften, ihrem Vermögen Toxin zu bilden und dessen Neutralisierbarkeit miteinander [12]. In den darauffolgenden Jahren konnten durch die Arbeit diverser Forschungsgruppen weltweit viele verschiedene Stämme, sowie verschiedene Serotypen nachgewiesen und isoliert werden [13-15]. Im Jahr 1949 konnte schließlich der genaue Wirkmechanismus des Botulinumtoxins durch Professor Arnold Stanley Vincent Burgen in Cambridge entschlüsselt werden. Erstmals wurde auf tierexperimenteller Grundlage die Hemmung der präsynaptischen Acetylcholin Freisetzung beschrieben [16]. Die ersten therapeutischen Anwendungen des Toxins wurden durch den Augenarzt Allen B. Scott vom Smith-Kettlewell Eye Research Institute in San Francisco dokumentiert. Allen Scott arbeitete in enger Kooperation mit Edward Schantz, welcher standardisierte Präparationen und Sicherheitsstandards für den therapeutischen Einsatz etablierte. Zunächst testete Scott die Wirkung tierexperimentell an Affen [17], wenige Jahre später publizierte er seine Arbeit über den erfolgreichen Einsatz von Botulinumtoxin bei der nicht-chirurgischen Therapie des Strabismus [4]. Auf Grundlage der Erkenntnisse von Allen Scott kam es in den folgenden Jahren zur Ausweitung der Indikationsspektrums und zur therapeutischen Anwendung in verschiedenen Bereichen der Medizin (siehe Kapitel 1.2.1).

### **1.2.3 Wirkungsmechanismus und Struktur des BoNT**

Um den speziellen Wirkungsmechanismus von BoNT an der motorischen Endplatte nachvollziehen zu können, sollen zunächst kurz die allgemeinen Prinzipien der Signalübertragung an Synapsen erklärt werden. Die sogenannte Synapse fungiert bei der Übertragung von Reizen zwischen zwei Zellen, z.B. einer Nerven- und einer Muskelzelle als funktionelle Kontaktstelle. Die Kommunikation erfolgt über einen Botenstoff, einen sogenannten Transmitter, im Fall der motorischen Endplatte handelt es sich um Acetylcholin (ACH). Die Kommunikation zwischen Nervenzelle und Muskelzelle erfolgt durch die Freisetzung (Exozytose) des Transmitters aus der Präsynapse. Diese Exozytose erfolgt Calcium-abhängig und wird durch verschiedene Proteine (sogenannter SNARE-Komplex) vermittelt. Nach der Exozytose des Transmitters kommt es zu dessen Diffusion über den schmalen synaptischen Spalt an die postsynaptische Membran. Hier befinden sich für den jeweiligen Transmitter spezifische Rezeptoren. Durch Bindung des Transmitters an diese Rezeptoren werden postsynaptische Effekte, wie z.B. die Veränderung des Membranpotentials, hervorgerufen. Bei der Signalübertragung zwischen Nerven- und Muskelzelle an der motorischen Endplatte kommt es so, durch den

Transmitter ACH vermittelt, zu einer Erregung mit einer daraus resultierenden Kontraktion einer Muskelfaser. Nach der Freisetzung des Transmitters wird dieser an der Präsynapse durch Endozytose zurückgewonnen. So kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen Transmitter Freisetzung und Rückgewinnung an der präsynaptischen Membran [18]. Das dem therapeutischen Einsatz zugrunde liegende Wirkprinzip des BoNT basiert auf einer anticholinergen Wirkung durch Blockierung der synaptischen Transmission. Je nach Zielgewebe kommt es nach Injektion von BoNT zu einer Blockade der cholinergen neuromuskulären Übertragung oder auch zu einer Blockade der cholinergen autonomen Übertragung an Schweißdrüsen, Speicheldrüsen, Tränendrüsen oder glatten Muskelzellen [19]. Um diesen Vorgang der Blockade genauer zu verstehen ist es wichtig, sich der Struktur des Toxins zuzuwenden. Bei BoNT handelt es sich um ein von Clostridien hergestelltes Protein, welches in seiner aktiven Form aus zwei Ketten besteht. Die beiden Ketten sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Es handelt sich um eine leichte Kette mit einem Molekulargewicht von ungefähr 50 Kilodalton (kDA) und eine schwere Kette mit einem Molekulargewicht von ungefähr 100 kDA. Die leichte Kette enthält eine Zinkprotease, welche, je nach Serotyp, verschiedene Bestandteile des SNARE-Komplexes zerschneidet und somit als katalytischer Bestandteil des Toxins fungiert. Die schwere Kette besteht aus einer Translokations-Domäne und einer Rezeptor-Domäne, welche für die spezifische Bindung an die Zielzelle zuständig ist. Die Zielzelle ist in diesem Fall die Präsynapse von Motorneuronen an der motorischen Endplatte. Die Bindung an BoNT-Rezeptoren der präsynaptischen Membran und die Endozytose werden durch beide Domänen der schweren Kette vermittelt. Bei den Rezeptoren handelt es sich um verschiedene Membran-Proteine, die vom Toxin genutzt werden [20]. Um in die Neurotransmitter-Vesikel zu gelangen, benutzt das Toxin die membranständige ATP-ase, die für die Wiederaufnahme des Transmitters in den Vesikel zuständig ist. Um sein Angriffsziel, nämlich die Proteine des SNARE-Komplexes, zu erreichen muss es zu einer Translokation der katalytisch aktiven leichten Kette ins Zytosol kommen. Der entscheidende Faktor für diese Translokation ist der Gradient des pH-Wertes an der Vesikelmembran. Dieser pH-Gradient wird durch die membranständige ATP-ase gewährleistet. Es kommt zu einer Protonierung des Toxins mit anschließender Translokation der leichten Kette durch die Vesikelmembran. Unter anderem durch den sauren pH-Wert im Vesikel vermittelt, kommt es zudem zu einer Spaltung der Disulfidbrücke, welche die leichte und schwere Kette miteinander verbindet. Die Translokation der leichten Kette ins Zytosol ist irreversibel. Wie oben bereits erwähnt

enthält die leichte Kette den katalytisch wirksamen Bestandteil des Toxins. Bei allen bekannten Stämmen und Serotypen von BoNT handelt es sich dabei um eine Zink-Metalloprotease, die spezifisch für ein Protein des SNARE-Komplexes ist und dieses zerschneidet. Das Zerschneiden eines Proteins hat dessen Inaktivierung zur Folge. Somit kann es zu keiner Ausbildung eines SNARE-Komplexes kommen, die Freisetzung vom Neurotransmitter ACH wird verhindert [1].

Der genaue Mechanismus dieser Inhibition der ACH-Freisetzung beruht also auf einer Verhinderung der Fusion ACH-gefüllter Vesikel mit der Plasmamembran und lässt sich in vier Teilschritte gliedern [1] (siehe Abb. 1).

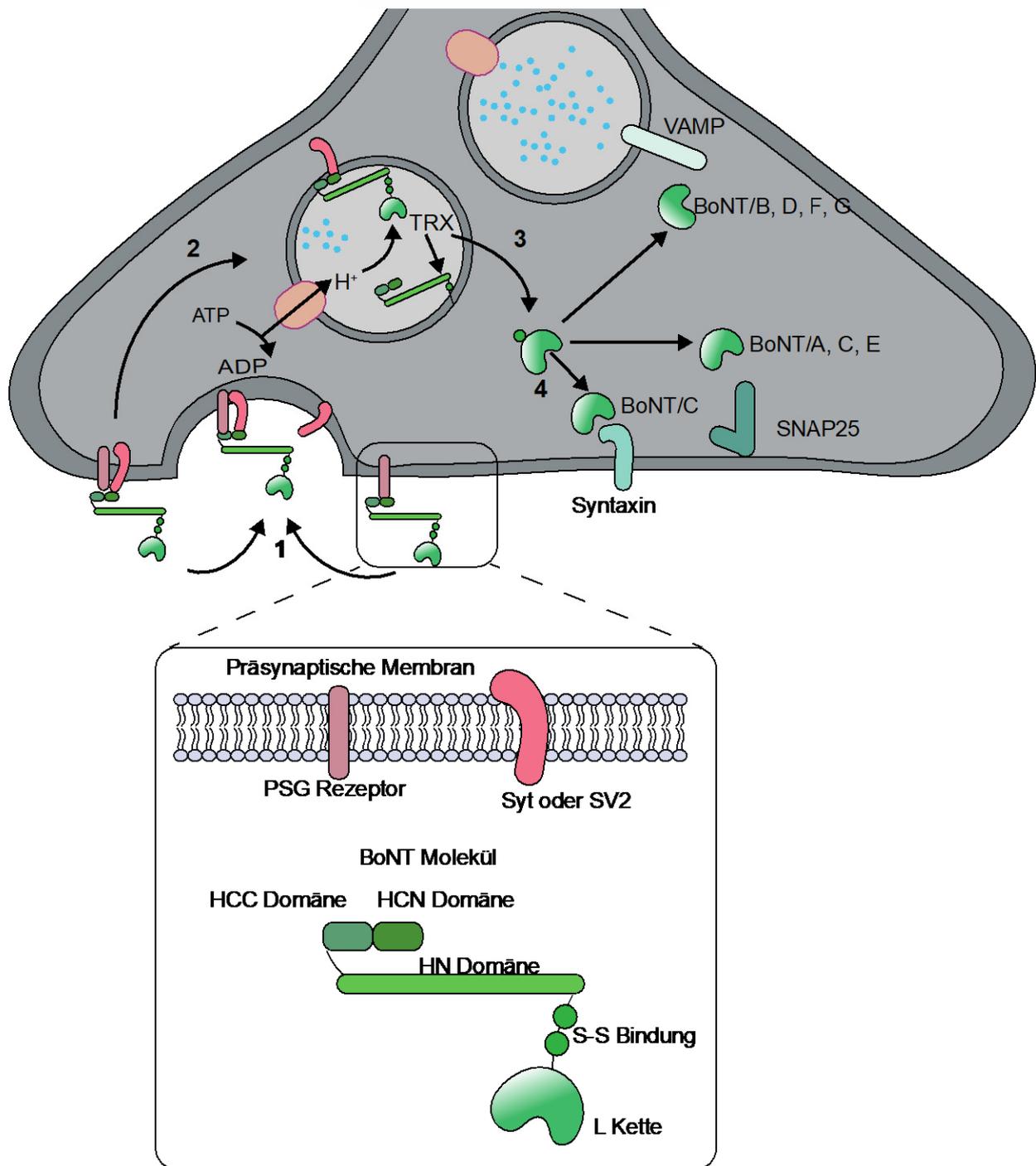


Abb. 1: **Wirkungsmechanismus von BoNT in den terminalen Nervenendigungen**, modifiziert nach Rossetto et al. [1]

1. Bindung bestimmter Abschnitte der schweren Kette (HCC Domäne, HCN Domäne) des Toxins an spezifische Rezeptoren der präsynaptischen Membran (PSG-Rezeptor, Syt oder SV2-Rezeptor)
2. Endozytose des Botulinumtoxins in synaptische Vesikel, hierbei wird die membranständige ATPase genutzt
3. Protonierung des Toxins, dadurch dann Spaltung der Disulfidbrücke (S-S Bindung) und Translokation (TRX) der leichten Kette (L Kette) durch die Vesikelmembran ins Zytosol
4. Zerschneiden spezifischer, an der Fusion der Neurotransmitter-Vesikel mit der Plasmamembran beteiligter Proteine des sogenannten SNARE-Komplexes (SNAP 25, VAMP, Syntaxin, je nach Serotyp des Toxins) durch die Zinkprotease der leichten Kette des Toxins

Wie oben bereits erwähnt greifen die verschiedenen Serotypen des Toxins unterschiedliche Proteine des SNARE-Komplexes an. Das Protein SNAP 25 wird durch die Serotypen BoNT-A, BoNT-C und BoNT-E zerschnitten, VAMP (auch Synaptobrevin genannt) wird durch die Serotypen BoNT-B, BoNT-D, BoNT-F und BoNT-G zerschnitten und Syntaxin wird durch den Serotyp BoNT-C zerschnitten [1, 6]. Durch das resultierende Ausbleiben der ACH-Freisetzung kann es demnach zu keiner Signalübertragung zwischen Nerven- und Muskelzelle kommen. Nach einer intramuskulären Injektion von BoNT kommt es also zu einer Schwächung bzw. Parese des jeweiligen Muskels (je nach verwendeter Dosis), sowie einer Abnahme der Endplattenpotentiale [21]. Die leichte Kette des Toxins bleibt im Zytosol über mehrere Wochen aktiv und zerschneidet weiterhin auch neu gebildete Proteine des SNARE-Komplexes [22]. Innerhalb von wenigen Tagen nach Injektion des Botulinumtoxins beginnt ein Aussprossen des terminalen Axons (sogenanntes *sprouting*). Bei diesem Vorgang werden neue Synapsen ausgebildet, die die Funktion der blockierten Synapse übernehmen. Zusammen mit der Metabolisierung des Toxins und der Neusynthese der Proteine des SNARE-Komplexes führt dieses *sprouting* mit Impulsübertragung über die neuen Nervenendigungen zu einer Reversibilität der Toxin-Wirkung. Zusätzlich kommt es zur Regeneration der ursprünglichen Synapsen mit anschließender Rückbildung der *Sprouting*-Synapsen. Diese Reversibilität tritt in etwa 3 Monaten nach der erfolgten Injektion ein. BoNT blockiert somit die synaptische Übertragung nur temporär, es kommt zu keiner bleibenden Schädigung des Neurons [23-25].

#### **1.2.4 Handelspräparate:**

Bei der therapeutischen Nutzung finden lediglich zwei der sieben unterschiedlichen Toxin-Serotypen A-G Anwendung. Hierbei handelt es sich um die Serotypen A und B, von denen verschiedene Formulierungen/Präparate existieren. Die drei wichtigsten Handelspräparate, welche den Toxin-Serotyp A enthalten sind onabotulinumtoxinA (ona-BoNT-A), welches unter dem Handelsnamen Botox® von Allergan Pharmaceuticals vertrieben wird, abobotulinumtoxinA (abo-BoNT-A) mit dem Handelsnamen Dysport® von Ipsen Pharma und incobotulinumtoxinA (inco-BoNT-A), das auch unter dem Handelsnamen Xeomin® von Merz Pharmaceuticals bekannt ist [26]. Das Präparat Neurobloc® von Eisai enthält den Toxin-Serotyp B und wird in den USA auch unter dem Handelsnamen Myobloc® vertrieben, beide Präparate liegen in Form von gebrauchsfertigen Lösungen vor [19, 26]. Botox® war 1989 das erste, von der U.S. Food

and Drug Administration zugelassene Präparat, damals noch unter dem Namen Oculinum®. Die Zulassung für Dysport® erfolgte zwei Jahre später im Jahr 1991, die für Xeomin® im Jahr 2005. Bei den drei BoNT-A Präparaten handelt es sich um wasserlösliche Pulver, welche vor dem Gebrauch in 0,9%-iger Kochsalzlösung/Wasser gelöst werden müssen. Nach der Lösung müssen die Präparate innerhalb von wenigen Stunden verwendet werden, da es sonst zum Nachlassen der Wirksamkeit und/oder bakterieller Kontamination kommen kann. Vor Verwendung gilt es die Lagerungsbedingungen der verschiedenen Präparate zu beachten. Für die Präparate Botox®, Dysport® und Neurobloc® ist eine Aufbewahrung im Kühlschrank bei bis zu 8°C vorgeschrieben, während sich Xeomin® auch bei Raumtemperatur lagern lässt. Alle Präparate sind bei Beachtung der Lagerungsbedingungen zwischen 15 und 36 Monate lang haltbar [19]. Die unterschiedlichen Formulierungen variieren untereinander bezüglich der Herstellung, der Wirkstärke und der Menge an Proteinen. In diesem Zusammenhang ist das Präparat Xeomin®, welches erst im Jahr 2005 zugelassen worden ist und sich durch die Herstellung ohne Komplexproteine von den anderen Formulierungen unterscheidet, hervorzuheben [27]. Die nicht-toxischen Komplexproteine werden hier beim Herstellungsprozess abgespalten, das Neurotoxin liegt demnach in isolierter Form vor. Die anderen Präparate weisen unterschiedliche Anteile an nichttoxischen Proteinen auf und assoziieren sich zu Dimeren. Dadurch lassen sich die verschiedenen Molekulargewichte erklären (siehe Tabelle 1). Auf den strukturellen Aufbau der verschiedenen kommerziellen BoNT-Formulierungen soll später im Kontext der Antigenität (Kapitel 1.4) noch genauer eingegangen werden.

Die industrielle Herstellung des Toxins erfolgt durch Clostridien-Stämme, welche unter anaeroben Bedingungen in einem Fermentationsbehälter bebrütet werden. Nach einem maximalen Wachstum der Clostridien-Kulturen kommt es zur Freisetzung von Toxin-Vorstufen, welche durch Enzyme in der Kultur aktiviert werden. Durch Hinzugabe von Säure werden die Clostridien-Kulturen abgetötet, bei anschließender Zentrifugation wird das Toxin von den produzierenden Stämmen getrennt. Nach der Abzentrifugation folgen mehrere Reinigungsschritte des Toxins, die Reinheit ist proportional zu der Aggressivität der Reinigungsschritte und wird photometrisch geprüft. Die biologische Aktivität eines fertigen Präparates wird in Form von sogenannten *mouse units* (MU) nach Durchführung eines Mausletalitätstestes angegeben. Eine MU ist in diesem Zusammenhang definiert als die BoNT-Menge, die 50% einer Mäusepopulation in einem standardisierten Tierversuch umbringen würde. Die Wirkstärke der Präparate wurde daher traditionell in MUs

angegeben. Inzwischen stehen auch zellkulturbasierte Methoden zur Verfügung, mit denen die Aktivität der Produktionschargen untersucht werden kann. Je nach Messwert folgt dann eine Verdünnung mit Lactulose- oder Natriumchlorid-Lösung, um die gewünschte Wirkstärke zu erreichen. Die Einheiten der verschiedenen Formulierungen sind aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Aktivitätstests nicht ohne Umrechnung miteinander vergleichbar nach [19].

| <b>Substanzname/<br/>Handelsname</b>   | <b>Ona-BoNT-A/<br/>Botox</b>               | <b>Abo-BoNT-A/<br/>Dysport</b>      | <b>Inco-BoNT-A/<br/>Xeomin</b>         |
|--|--|-------------------------------------|--|
| <b>Hersteller</b>                      | Alergan<br>Pharmaceuticals<br>USA          | Ipsen Pharma<br>UK                  | Merz<br>Pharmaceuticals<br>Deutschland |
| <b>Darreichungsform</b>                | Pulver                                     | Pulver                              | Pulver                                 |
| <b>BoNT-Serotyp</b>                    | A  | A                                   | A                                      |
| <b>SNARE-<br/>Angriffspunkt</b>        | SNAP 25                                    | SNAP 25                             | SNAP 25                                |
| <b>Pharmazeutische<br/>Hilfsstoffe</b> | Humanes<br>Serumalbumin,<br>Natriumchlorid | Humanes<br>Serumalbumin,<br>Lactose | Humanes<br>Serumalbumin,<br>Sucrose    |
| <b>Biologische Aktivität</b>           | 100 MU                                     | 500 MU                              | 100 MU                                 |
| <b>Größe der BoNT-<br/>Komponente</b>  | 900 kDA                                    | 900 kDA                             | 150 kDA                                |

Tabelle 1: **Ausgewählte Eigenschaften verschiedener BoNT-Präparate**, modifiziert nach Dressler, D [19]. MU=mouse units, kDA=Kilodalton

### **1.2.5 Nebenwirkungen, Kontraindikationen und Therapiesicherheit**

Obwohl BoNT ein äußerst potentes Toxin ist, gilt es bei der therapeutischen Anwendung bei richtiger Handhabung, Dosierung und unter Berücksichtigung anderer Faktoren als sicher und effektiv [28]. Ursächlich hierfür sind unter anderem die große therapeutische Breite und die lokal begrenzte Wirkungsentfaltung. Entscheidend hierfür ist, dass es nach Injektion von BoNT-A Präparaten zu keiner klinisch relevanten systemischen Verteilung kommt. Nach intramuskulärer Injektion kommt es zu einer nahezu vollständigen Bindung im Zielmuskel, wobei nur geringe Mengen in injektionsfernen Muskeln nachgewiesen werden konnten [29, 30]. Bei BoNT-B Präparaten kommt es zu einer deutlich höheren systemischen Verteilung. So kann es unter Therapie mit BoNT-B Präparaten häufiger zu autonomen Nebenwirkungen wie Akkomodationsstörungen, Mundtrockenheit und Schleimhautirritationen kommen, welche unter Therapie mit BoNT-A Präparaten nur sehr selten und bei hohen verwendeten Dosierungen auftreten können. Weder bei BoNT-A noch bei BoNT-B Präparaten lassen sich zentralnervöse Effekte nachweisen, da das Toxin die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann [31].

Ganz allgemein können Nebenwirkungen unter Therapie mit BoNT in systemische, lokale und obligate Nebenwirkungen untergliedert werden. Treten Nebenwirkungen in injektionsfernen Geweben, z.B. Speicheldrüsen nach Injektion in den Fuß zur Behandlung einer lokalen Spastik auf, so spricht man von einer systemischen Nebenwirkung. Diese werden durch eine Verteilung des Toxins im Blut ausgelöst. Man spricht von lokalen Nebenwirkungen, wenn diese durch die Diffusion von BoNT aus dem Zielmuskel in benachbarte Gewebe hervorgerufen werden. So kann es z.B. bei der Behandlung des Blepharospasmus zu einer Diffusion des Toxins in den benachbarten Musculus levator palpebrae kommen. Dadurch kommt es zu einer Ptose, welche wir folglich als lokale Nebenwirkung der BoNT-Therapie bezeichnen würden. Bei obligaten Nebenwirkungen handelt es sich um, durch den Wirkmechanismus des BoNT selbst ausgelöste Nebenwirkungen. Durch die therapeutische Behandlung einer ungewünschten Dystonie kommt es immer auch zu einer herabgesetzten willkürlichen Aktivität des betroffenen Muskels. Die Häufigkeit und Schwere aller Nebenwirkungen wird vor allem durch die Dosierung, aber auch durch andere Faktoren bestimmt. Nebenwirkungen einer BoNT-Injektionstherapie treten normalerweise nach ungefähr einer Woche auf und halten dann ein bis zwei Wochen an [19].

Als Kontraindikationen für eine Therapie mit BoNT gilt unter anderem das Vorliegen einer Schwangerschaft, da hierfür keine ausreichenden klinischen Erfahrungen vorliegen. Bei Krankheitsbildern, die mit vorbestehenden Paresen einhergehen ist bei der Anwendung von BoNT besondere Vorsicht geboten. Gleiches gilt für Krankheiten, bei denen die neuromuskuläre Überleitung gestört ist, wie z.B. Myasthenia gravis und das Lambert Eaton Syndrom [32].

Exemplarisch liefert unter anderem die Arbeit von Ramirez-Castaneda et al Daten zur Sicherheit und Effektivität unter Therapie mit BoNT. In dieser Langzeit-Studie über durchschnittlich fast 20 Jahren wurde die Sicherheit und Effektivität von BoNT an einem Kollektiv bestehend aus 89 Patienten erneut belegt. Bei einer durchschnittlichen Nachsorge-Zeit von 18,5 Jahren konnte an diesem Kollektiv, welches sich aus Patienten mit verschiedenen Diagnosen zusammensetzte, gezeigt werden, dass die Mehrheit der untersuchten Patienten von einem nachhaltigen Nutzen der BoNT-Injektionen profitieren. Das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen wurde mit einer Häufigkeit von 19% beschrieben, wobei es sich hierbei meist um Dysphagie, Ptosis oder eine Schwäche der behandelten Muskelpartien handelte [33]. Im Allgemeinen gelten die unerwünschten Nebenwirkungen im Rahmen einer langfristigen-Therapie mit BoNT als meist mild, mit der Zeit abnehmend und selbstlimitierend, sodass man von einer guten Wirksamkeit der Behandlung im Verhältnis zu einer eher geringen Anzahl tolerabler Nebenwirkungen sprechen kann [34, 35]. Die Häufigkeit unerwünschter Nebenwirkung lässt sich zudem durch klinische Erfahrung und optimale Injektionstechnik reduzieren [35].

### **1.3 Botulinumtoxin in der Behandlung verschiedener neurologischer Erkrankungen:**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten untersucht, die an verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern leiden. Allen diesen Erkrankungen ist gemeinsam, dass sie mit BoNT-Injektionen therapiert werden können. Im Folgenden soll kurz auf die einzelnen Krankheitsbilder der eingeschlossenen Patienten eingegangen werden.

#### **1.3.1 Zervikale Dystonie**

Dystonien sind Bewegungsstörungen, bei denen es durch dauerhafte oder intermittierende, unwillkürliche Muskelkontraktionen zu abnormen Bewegungen und/oder Haltungen kommt. Dystone Bewegungen sind typischerweise drehend oder zitternd und mit überschießender Muskelaktivität assoziiert [36]. Die Diagnose einer

Dystonie wird auf Grundlage der typischen Bewegungsmuster klinisch gestellt [37]. Die Zervikale Dystonie (CD) ist die häufigste Form der fokalen Dystonien und zeichnet sich durch drehende und/oder kippende Fehlstellungen des Halses aus [38,39]. Zu unterscheiden ist die häufigere, primäre Form der CD, welche wahrscheinlich aus dem Zusammenspiel genetischer Faktoren und Umweltfaktoren resultiert von der selteneren, sekundären Form [40]. Betroffene Patienten beklagen häufig den schmerzhaften Charakter der Krankheit, sowie die mit ihr verbundenen Einschränkungen im täglichen Leben [41]. Die Prävalenz wird in der Literatur sehr variabel angegeben und liegt bei ca. 5 Fällen/1000 000 Personen, wobei die Zahl bei dieser unterdiagnostizierten Krankheit in der Realität deutlich höher liegen dürfte und regionale Unterschiede berücksichtigt werden müssen [42]. Die Injektion von BoNT in die betroffenen Muskeln gilt als Therapie der Wahl zur Behandlung der CD [43]. Als alternative Therapiemöglichkeiten sind die medikamentöse Therapie mit Anticholinergika, Benzodiazepinen oder Spasmolytika [44], sowie chirurgische Interventionen wie die selektive Denervation [45] zu nennen. Bei therapierefraktären Fällen spielt zudem die tiefe Hirnstimulation eine Rolle [46].

### **1.3.2 Andere Dystonien**

Diese Patientensubgruppe (ODT) enthält in der vorliegenden Arbeit Patienten mit Meige-Syndrom, oromandibulären und oropharyngealen Dystonien, fokalen oder segmentalen Dystonien der Extremitäten, sowie Patienten mit generalisierten Dystonien. Eine Dystonie wird als fokal bezeichnet, wenn die betroffene Muskulatur auf eine Körperregion beschränkt ist, z.B. auf die Hand oder den Fuß, oder aber den Hals bei der CD bzw. die Augenlider beim Blepharospasmus (BSP). Fokale Dystonien stellen die häufigste Form der Dystonien dar und manifestieren sich meist im mittleren Erwachsenenalter. Meist bleibt ihre Präsentation fokal beschränkt, es kommt also nur selten zu einer Generalisierung. Davon abzugrenzen sind die segmentalen Dystonien, deren Symptomatik auf zwei zusammenhängende Körperpartien beschränkt ist. Ein Beispiel für eine segmentale Dystonie ist die oromandibuläre Dystonie. Generalisierte Dystonien hingegen betreffen multiple Lokalisationen, darunter mindestens eine der beiden unteren Extremitäten. Fokale Dystonien wie die CD oder der Blepharospasmus werden in erster Linie mit regelmäßigen BoNT-Injektionen behandelt. Therapie der ersten Wahl bei segmentalen und generalisierten Dystonien stellt die Pharmakotherapie mit Anticholinergika dar. Die Therapie mit BoNT spielt bei segmentalen und

generalisierten Dystonien vor allem eine ergänzende Rolle nach [37]. Das Meige-Syndrom wird von dem Krankheitsbild des BSP abgegrenzt und ist charakterisiert durch die Kombination aus dem klinischen Bild einer oromandibulären Dystonie und dem klinischen Bild eines BSP [47].

### **1.3.3 Blepharospasmus**

Der Blepharospasmus ist den fokalen Dystonien zuzuordnen und durch exzessive, unwillkürliche Kontraktionen der periokulären Muskulatur beider Gesichtshälften charakterisiert. Frauen sind häufiger betroffen als Männer, wobei die Prävalenz sehr variabel angegeben wird und bei 12 bis 133 Fällen/1000 000 Personen liegt. Durch die unwillkürlichen Muskelkontraktionen, die zu häufigem Blinzeln und teilweise zu einem kraftvollen Schluss der Augenlider führen, kann es zu einer funktionellen Blindheit kommen. Bei einigen Patienten führen sensorische Tricks zur vorübergehenden Abnahme der Beschwerden, man spricht hier von der sogenannten *geste antagoniste*. Der Leidensdruck der Patienten verstärkt sich durch die häufigen ophthalmologischen Begleiterkrankungen wie Blepharitis oder Keratokonjunktivitis. In den meisten Fällen handelt es sich um ein sporadisches, primäres Auftreten. Sekundäre BSP-Formen, zum Beispiel im Rahmen von strukturellen Läsionen des Zentralnervensystems (ZNS), sind selten [47]. Therapie der Wahl ist wie bei den anderen fokalen Dystonien die regelmäßige Injektionsbehandlung mit BoNT [37].

### **1.3.4 Spasmus hemifacialis**

Der Spasmus hemifacialis (FHS) ist durch unwillkürliche, unregelmäßige Kontraktionen der vom Nervus (N.) facialis (siebter Hirnnerv) innervierten Muskulatur gekennzeichnet. Aufgrund der unterschiedlichen Ätiologie dieser Bewegungsstörung wird der FHS von den anderen Dystonien abgegrenzt. Ursächlich ist in den meisten Fällen eine arterielle Kompression (meist durch die Arteria cerebelli inferior posterior oder die Arteria cerebelli inferior anterior) des N. facialis an seiner Austrittsstelle im Hirnstamm. Wesentlich seltener sind andere Raumforderungen wie zum Beispiel Schwannome oder Meningeome im Bereich des Kleinhirnbrückenwinkels, die zu einer Kompression des N. facialis führen. Die Diagnose wird meist klinisch gestellt. Oft ist die Symptomatik nur einseitig lokalisiert und beginnt in der periokulären Muskulatur. Die typischerweise einseitig auftretende Symptomatik hilft bei der differentialdiagnostischen Abgrenzung zum beidseitig auftretenden BSP. Im Krankheitsverlauf kommt es zu einer Ausdehnung

der Zuckungen, auf die vom N. facialis innervierte, mimische Muskulatur der betroffenen Gesichtshälfte. Der mit der Erkrankung verbundene Leidensdruck ist vor allem auf psychosoziale Aspekte, sowie eine mögliche Einschränkung des binokularen Sehens durch Spasmen der periokulären Muskulatur zurückzuführen. Oft kommt es zu einer Akzentuierung der Symptomatik im Rahmen von Stress oder während des Sprechens. Wichtige Differentialdiagnosen sind der BSP, oromandibuläre Dystonien und fokale Anfälle. Bei Patienten mit einem hohen Operationsrisiko und/oder ablehnender Haltung bezüglich einer Operation hat die effektive symptomatische Behandlung mit BoNT-Injektionen einen hohen Stellenwert in der Therapie des FHS. Eine kausale Therapie, die häufig zu langfristiger Beschwerdefreiheit führen kann, ist jedoch nur durch eine mikrovaskuläre Dekompression zu erreichen, wenn auch mit dem Risiko von Rezidiven nach [48, 49].

### **1.3.5 Spastik**

Alleine in Deutschland erleiden über 200 000 Personen jährlich einen Schlaganfall [50]. Häufig sind die überlebenden Patienten von motorischen Einschränkungen betroffen, bei denen es sich in fast 20% der Fälle auch um Spastiken handelt [51]. Generell entsteht eine Spastik auf der Basis einer Schädigung des ZNS (z.B. durch einen Schlaganfall). Klinisch ergibt sich das Bild eines erhöhten Muskeltonus mit gesteigerten Eigenreflexen bei verminderter Muskelaktivität bei aktiven Bewegungen des Patienten (Syndrom der spastischen Parese) [52]. Therapeutische Optionen zur Behandlung von Spastiken sind die orale Pharmakotherapie (zum Beispiel mit Baclofen), Physiotherapie, chirurgische Interventionen und regelmäßige BoNT-Injektionen [53]. BoNT-Injektionen sind in der Behandlung von Spastiken nach Schlaganfällen effektiv und gut toleriert, weshalb sie auch hier eine wesentliche Rolle spielen [54, 55]. Die infantile Cerebralparese steht für eine Reihe von Syndromen, die mit motorischen Einschränkungen einhergehen, welche durch gestörte Entwicklungen des zentralen Nervensystems entstehen. Charakteristische Merkmale dieser Syndrome sind Spastik, Bewegungsstörungen, Muskelschwäche, Ataxien und Rigidität. Die beschriebene Prävalenz bei 3-10-jährigen Kindern liegt in der Größenordnung von 2-4 Fällen/1000 Kindern. Der therapeutische Einsatz von BoNT-Injektionen hat auch hier einen hohen Stellenwert in der Behandlung von fokaler Spastik und wird häufig ergänzend zur oralen Pharmakotherapie und Physiotherapie eingesetzt [56].

## **1.4 Antigenität und Neutralisierende Antikörper**

Um die Mechanismen der Antikörperbildung unter Therapie mit BoNT nachvollziehen zu können, soll zunächst etwas über die Struktur von BoNT und die Zusammensetzung der verwendeten Präparate gesagt werden. Das Toxin selbst besteht aus einem Neurotoxin-Kern und nicht toxischen Komplex-Proteinen. Der Neurotoxin-Kern besteht aus einem inaktiven Vorläufer-Protein, welches eine schwere und eine leichte Kette enthält [57]. Der Neurotoxin-Kern ist von nicht toxischen Proteinen umgeben, welche sich nochmals in hämagglutinierende und nicht-hämagglutinierende Proteine unterteilen lassen. Diese Proteine werden auch Komplexproteine genannt (siehe Abb. 2). Diese verhindern unter anderem den Abbau des Neurotoxins. Verschiedene BoNT-Serotypen enthalten unterschiedliche nicht-toxische Proteine [6]. Die therapeutisch verwendeten Präparate bestehen aus BoNT, also aus für den therapeutischen Effekt verantwortlichen Proteinen, und nochmals einer Großzahl nicht toxischer Proteine. Die nicht-toxischen Bestandteile lassen sich in Hilfsstoffe wie Humanalbumin oder Pufferlösungen untergliedern. Die oben schon erwähnten Komplexproteine interagieren mit den Neurotoxinen und bilden Aggregate mit ihnen [1].

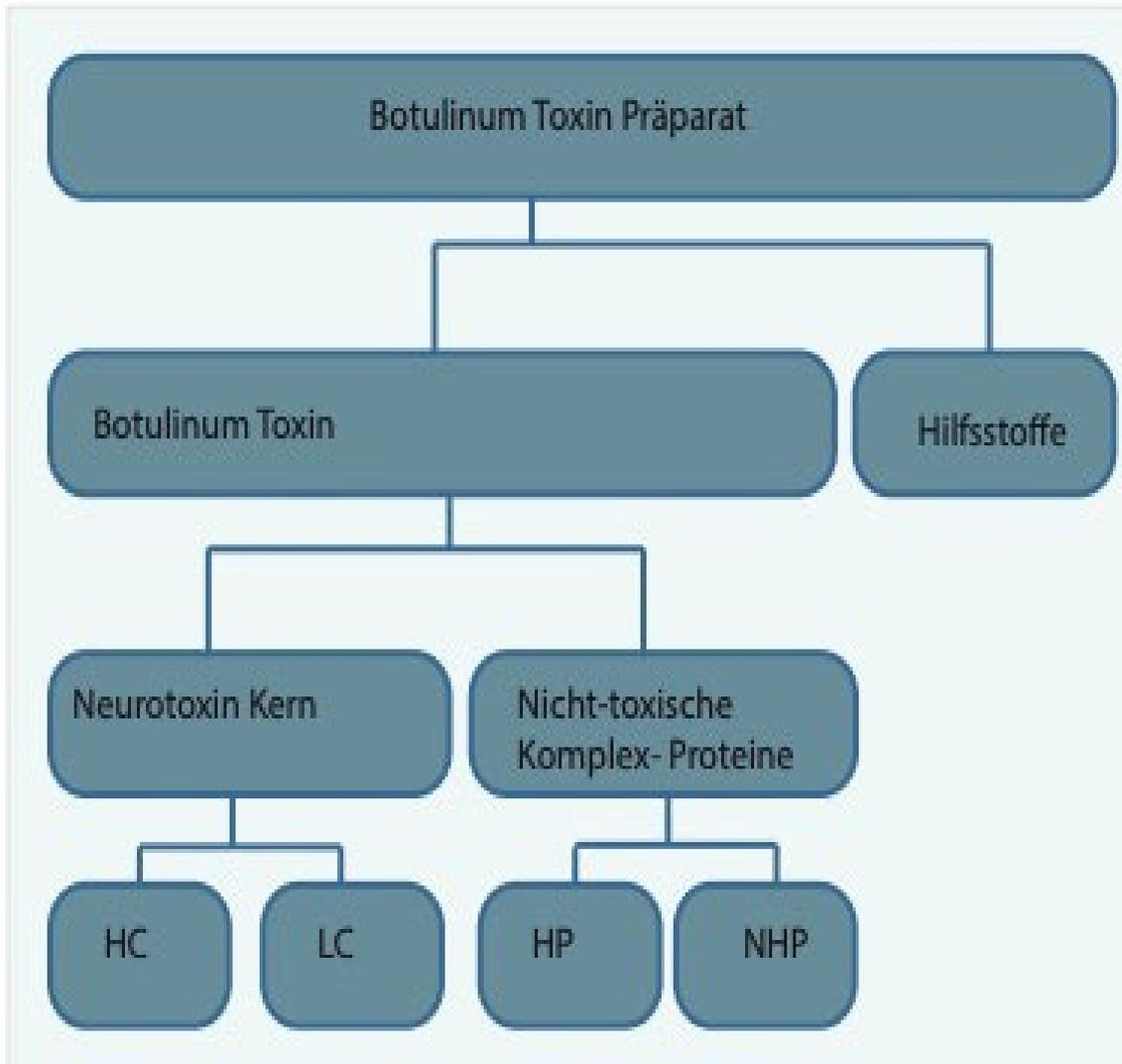


Abb. 2: **Zusammensetzung von BoNT-Präparaten**, modifiziert nach Dressler, D. [19]

BoNT besteht aus einem Neurotoxin-Kern und nicht toxischen Komplex-Proteinen. Der Neurotoxin-Kern besteht aus einem inaktiven Vorläufer-Protein, welches eine schwere (HC) und eine leichte Kette (LC) enthält. Der Neurotoxin-Kern ist von nicht toxischen Komplex-Proteinen umgeben, welche sich nochmals in hämagglutinierende (HP) und nicht-hämagglutinierende Proteine (NHP) unterteilen lassen. Diese Proteine werden auch Komplexproteine genannt.

Der immunologische Stellenwert der Komplexproteine wird häufig diskutiert und ist noch nicht endgültig geklärt, eine verstärkte Antikörperbildung durch die Aktivierung von dendritischen Zellen wird diskutiert [58]. Alle Proteine dieses Proteinkomplexes sind potentielle Antigene, und können somit die Bildung von Antikörpern (AK) bewirken [59]. Die Prävalenz solcher AK gegen Proteine, die in den Präparaten enthalten sind, wurde mit einer Häufigkeit von beinahe 60% unter Injektionstherapien beschrieben [60]. Im Allgemeinen haben beim Einsatz von Proteinen im therapeutischen Zusammenhang verschiedene Faktoren einen Einfluss auf die Bildung von AK. Wichtig sind hier die

Eigenschaften des Proteins selber (z.B. die Molekulargröße oder die Herkunft des Proteins), der Herstellungsprozess, die Applikation, die Lagerung und auch die genetische Prädisposition des Patienten [61].

Bei der klinischen Anwendung von BoNT-Präparaten kann es somit zur Bildung von AK gegen nicht-therapeutisch relevante Proteine oder gegen therapeutisch relevante Proteine kommen. Im zweiten Fall spricht man dann von sogenannten neutralisierenden Antikörpern (NAbs), welche den gewünschten Effekt der Injektionen reduzieren könnten [6]. Die unter Injektionstherapie gebildeten NAbs können sich im Laufe der Zeit wieder zurückbilden, so konnte bereits gezeigt werden, dass die NAb-Titer bei einem Großteil der Patienten (über 60%) nach Einstellung der Therapie rückläufig waren, wobei dieser Prozess langsam verläuft und mehrere Jahre dauert [62]. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die immunologische Antwort nach Wiederbeginn der Behandlung mit dem gleichen Serotyp reaktiviert werden kann. In diesem Zusammenhang wird dem Präparat inco-BoNT-A eine besondere Rolle zugesprochen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es nach Beendigung einer BoNT-Therapie und anschließenden Wiederbeginn mit inco-BoNT-A bei Patienten mit STF (zuvor mit ona-BoNT-A oder abo-BoNT-A behandelt) zu keiner erneuten Bildung von NAbs oder einem erneuten Auftreten von STF gekommen ist [63].

Bei einem Großteil der gegen Toxine gebildeten AK handelt es sich jedoch nicht um NAbs, sondern um AK, die an nicht funktionell relevante Proteine binden und somit keinen Effekt auf die Wirkung des Toxins haben [64]. Die klinische Relevanz dieser AK und deren möglicher Einfluss auf die Bildung von NAbs wird weiterhin diskutiert. Bisher gibt es keine klinischen Daten, die zeigen, dass nicht-neutralisierende Antikörper (NAPs) die Immunantwort auf BoNT-Präparate verstärkt und somit zu einer höheren Rate von NAbs führen könnten. Im Gegenteil gibt es Daten, die vermuten lassen, dass NAPs den Zugang zu den Bereichen, in denen die meisten NAbs gegen BoNT gebildet werden blockieren und somit die Immunogenität reduzieren könnten [65-67]. Die Inzidenz von NAbs während einer kontinuierlichen Behandlung mit BoNT wird in Größenordnungen zwischen 0,5% und 1,5% pro Jahr angegeben [65-67], demzufolge ist mit hohen Prävalenzen von bis zu 15% während einer Langzeitbehandlung über einen Zeitraum von zehn Jahren oder länger zu rechnen. Ähnlich hohe Prävalenzen konnten bereits auch in der Langzeitbehandlung von Patienten mit zervikaler Dystonie [68] und infantiler Cerebralparese [69, 70] nachgewiesen werden.

## **1.5 Primäres und Sekundäres Therapieversagen**

Trotz der oben beschriebenen Wirksamkeit bei guter Verträglichkeit gibt es Patienten, die nach initial erfolgreichem Ansprechen auf eine BoNT-Therapie, im Verlauf der weiteren Behandlungen, einen Verlust der Wirksamkeit erfahren. Diese Patienten bezeichnet man als sekundäre Therapieversager. Davon zu unterscheiden gilt es primäre Therapieversager, also Patienten, bei denen eine Therapie mit BoNT von Anfang an nicht suffizient wirksam war [71].

### **1.5.1 Primäres Therapieversagen**

Primäres Therapieversagen (PTF) beschreibt eine Situation, in der die Therapie mit BoNT seit der ersten Injektion und in allen folgenden Injektionen keine Linderung der Symptome nach sich zieht [59]. In zahlreichen Publikationen werden Patienten beschrieben, welche zu keinem Zeitpunkt einer BoNT-Therapie ein Ansprechen auf diese Therapie gezeigt haben. Exemplarisch konnte in einer Studie, die 235 Patienten unter Langzeit-Injektionstherapie mit BoNT einschloss, eine Prävalenz des PTF im Bereich von ca. 9% gezeigt werden. PTF wurde hier als unzureichendes Ansprechen auf die Therapie (<25% Verbesserung) definiert, welches seit der ersten Injektion dokumentiert werden konnte und sich auch in den folgenden Injektionen und unter erhöhter Dosis, nicht verbesserte [72]. Bemerkenswert an dieser und auch anderen Arbeiten, welche ähnlich hohe Prävalenz-Werte für PTF angeben, ist die hohe Rate von ca. 9%, wohingegen man in klinischen Szenarien von sehr viel geringeren Raten ausgeht. Als mögliche Ursache für das PTF in klinischen Populationen gelten zu geringe Injektionsdosen, Injektionsfehler und vorherige BoNT-Injektionen [73]. Ebenfalls zu beachten ist die regelrechte Lagerung des jeweiligen Präparates, welche essenziell für die Wirksamkeit ist. Zudem ist es von essentieller Bedeutung für den Behandlungserfolg, dass vor Beginn der Therapie die richtige Diagnose gestellt worden ist. Exemplarisch kann eine Verwechslung von Lidapraxie und Blepharospasmus zu einer fehlerhaften Interpretation des Therapieansprechens führen. Auch bei Krankheitsbildern, bei denen eine Injektionstherapie mit BoNT generell als schwierig gilt (zum Beispiel der Antecollis bei der CD) ist die Interpretation eines Nicht-Ansprechens schwierig und kann nicht automatisch mit einem PTF gleichgesetzt werden. Das PTF scheint in der klinischen Realität häufiger eher durch Pseudo-Nichtansprechen im Rahmen der oben genannten Störfaktoren zustande zu kommen als durch tatsächliches, immunologisch erklärbares PTF [59, 73].

Es wäre zudem denkbar, dass dem PTF eine genetische Prädisposition zugrunde liegen könnte. Bisher konnte jedoch keine genetische Mutation nachgewiesen werden, welche die Bindungsstellen für BoNT betrifft und somit eine PTF immunologisch erklären würde. Hierfür wurde bereits in einer Studie eine genetische Datenbank nach Mutationen im Bereich der Bindungsstellen für BoNT untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass das Vorliegen einer genetischen Mutation, welche das Therapieansprechen auf BoNT A und B beeinflusst, bei Menschen sehr unwahrscheinlich ist [74].

### **1.5.2 Sekundäres Therapieversagen**

Sekundäres Therapieversagen (STF) ist charakterisiert durch eine initiale Verbesserung der Symptomatik nach Beginn der Injektionstherapie mit BoNT, wobei es im weiteren Therapieverlauf dann jedoch zu einem Verlust der Wirksamkeit kommt [71]. So kommt es dazu, dass Patienten, die über einen gewissen Behandlungszeitraum erfolgreich mit BoNT behandelt werden konnten, im Laufe der Zeit keinen Behandlungserfolg nach erfolgter Injektion zeigen. Diese Patienten, die damit nicht der Definition von primären Therapieversagern entsprechen, werden als sekundäre Therapieversager definiert. Sie zeichnen sich durch das Ausbleiben einer klinischen Besserung und das Ausbleiben von Nebenwirkungen nach wenigstens zwei aufeinanderfolgenden Injektionsbehandlungen aus [75]. Im klinischen Kontext wird häufig der Zusammenhang zwischen der Entstehung von NAbS und dem STF diskutiert. In ausgewählten Publikationen wurden in Kollektiven von sekundären Therapieversagern prozentuale Anteile NAb-positiver Patienten im Bereich von 33% bis 100% beschrieben [75-78].

Die tatsächliche Bedeutung des Antikörperstatus bei sekundären Therapieversagern wird jedoch weiterhin diskutiert und scheint geringer zu sein als anfänglich angenommen. Lange et al konnten in einer großen Studie nur bei ungefähr der Hälfte der getesteten Patienten (alle als sekundäre Therapieversager klassifiziert) NAbS nachweisen. Somit drängt sich der Verdacht auf, dass neben der Entstehung von NAbS auch andere Einflussfaktoren eine wichtige Rolle bei der Entwicklung eines STF spielen könnten. Es kann also festgehalten werden, dass NAbS eine Rolle bei der Problematik des STF spielen könnten, andere Faktoren jedoch nicht vernachlässigt werden sollten [79].

Bei ausbleibender oder nur schwacher Besserung der Symptomatik nach erfolgter BoNT-Injektion sollte also auch an mögliche andere Ursachen gedacht werden, wie zum Beispiel die Verwendung von zu geringen Injektions-Dosen, fehlerhafte Injektionstechniken und die nicht optimale Auswahl des Ziel-Muskels. Es wird davon ausgegangen, dass diese

Faktoren weitaus häufiger der Grund des ausbleibenden Therapieerfolges sind als das STF. Ebenfalls sollte daran gedacht werden, dass die subjektive Wahrnehmung des Therapieerfolges zwischen dem Patienten und dem behandelnden Arzt durchaus unterschiedlich sein kann [28]. Wie weiter oben schon erwähnt, fällt die Einschätzung eines Therapieerfolges bei schwierig zu behandelnden Krankheitsbildern wie z.B. dem Antecollis zudem schwer. Zusätzlich muss immer an einen natürlichen Progress der zugrunde liegenden Erkrankung gedacht werden, welcher für den Verlust des anfänglichen Therapieerfolges verantwortlich sein kann [59].

Von Bedeutung ist es, STF im klinischen Alltag zu erkennen. Als erstes Anzeichen hierfür wird häufig eine Abnahme der Wirkungsdauer nach erfolgter BoNT-Injektion beschrieben [59]. Der behandelnde Arzt sollte dann klinische Screening-Tests anwenden, um die Wahrscheinlichkeit eines STFs besser einschätzen zu können [80-82]. Falls diese Tests das Bestehen eines möglichen STF bestätigen sollten, wird vorgeschlagen Serumproben zu gewinnen und diese auf das Vorkommen von NAbs untersuchen zu lassen [83]. Um ein STF und/oder das Vorhandensein von NAbs überhaupt detektieren zu können ist es folglich essentiell, dass sowohl Patienten als auch die behandelnden Ärzte den Beginn einer nachlassenden Wirksamkeit unter BoNT-Therapie bemerken und kritisch hinterfragen [84].

## **1.6 Ziele der Arbeit:**

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Prävalenz von NAbs bei Patienten, die sich aufgrund unterschiedlicher neurologischer Erkrankungen unter einer Langzeit-Therapie mit BoNT befinden, zu bestimmen und relevante Einflussfaktoren auf die Entstehung dieser NAbs zu untersuchen. Es soll analysiert werden, ob, und welche Faktoren (das der Injektion zugrunde liegende Krankheitsbild, das Alter zu Beginn der Behandlung, die Behandlungsdauer, die pro Injektion verwendete Einzeldosis, die kumulative Lebenszeit-Dosis, sowie das verwendete Präparat) einen Einfluss auf die Entstehung von NAbs haben. Ein weiteres besonderes Augenmerk der Arbeit soll darauf liegen, die Prävalenzen von NAbs in den verschiedenen Indikations-Subgruppen untereinander zu vergleichen. Bisherige Studien beantworteten die Frage nach der Prävalenz von NAbs während einer Langzeittherapie mit BoNT oft nur an vorselektierten Patientenkollektiven [53, 68-70, 76, 79, 84]. Vor allem bei Patienten mit CD als Behandlungsindikation liegt bereits eine dichte Datenlage zur Entstehung und Prävalenz von NAbs vor [65-68, 85], NAb-Prävalenzen bei anderen Indikationen sind bisher jedoch deutlich seltener untersucht

worden [65]. In bisherigen Studien wurden das Intervall zwischen aufeinanderfolgenden Injektionen, die Einzeldosis pro Injektion und die Anzahl der Injektionen als relevante Faktoren für die Entstehung von NAbS herausgearbeitet [65, 76, 79, 86].

Folgende Fragestellungen sollen in der Arbeit beantwortet werden:

-Hat die Verwendung von hohen Einzeldosen in der BoNT-Therapie hohe NAb-Prävalenzen zur Folge?

-Gibt es Unterschiede bezüglich der NAb-Prävalenzen in Patientensubgruppen, bei denen hohe Injektionsdosen üblich sind (CD, ODT, Spastik), im Vergleich zu Subgruppen, in denen geringe Injektionsdosen üblich sind (BSP, FHS)?

-Weisen die bisher wenig untersuchten Behandlungsindikationen ODT und SPAS aufgrund der üblicherweise hohen verwendeten Einzeldosen pro Injektion eine vergleichbar hohe Prävalenz von NAbS auf wie die CD-Subgruppe?

-Gibt es zusätzliche Faktoren (zu den im vorherigen Abschnitt erwähnten), die einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von NAbS haben (insbesondere die verschiedenen Krankheitsbilder und das verwendete Präparat)?

## 2 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit basiert auf einer monozentrischen Beobachtungsstudie, welche als Querschnittsanalyse angelegt worden ist. Eingeschlossen wurden insgesamt 596 Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen (CD, BSP, FHS, ODT und SPAS), die sich in regelmäßiger Behandlung in der Botulinumtoxin-Ambulanz der neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf, Deutschland befanden. Serumproben von den eingeschlossenen Patienten wurden auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen BoNT getestet. Hierfür wurde zunächst eine Analyse mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.1). ELISA-positiv getestete Proben wurden erneut per Maus-Hemidiaphragma-Analyse (MHDA) auf das Vorhandensein von NAbS untersucht (siehe Kapitel 2.3.2). Die Prävalenz von NAbS wurde für die verschiedenen Behandlungsindikationen CD, BSP, FHS, ODT und SPAS, sowie im Gesamtkollektiv ermittelt. Außerdem wurde unter Anwendung einer Kaplan-Meier-Analyse die Wahrscheinlichkeit, dass Patienten NAb-negativ bleiben in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer in den einzelnen Patientensubgruppen berechnet. Eine Dosis-Abhängigkeit der Wahrscheinlichkeit im Laufe der Behandlung

mit BoNT einen positiven NAb-Status zu entwickeln, wurde durch den Vergleich verschiedener Dosis-Subgruppen untersucht.

## **2.1 Ethikvotum:**

Die Studie, auf der die vorliegende Arbeit resultiert wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland zugelassen (Studiennummer 4085). Die mündliche und schriftliche Aufklärung der Patienten erfolgte über ein spezielles Informations- und Einverständnisformular. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig.

## **2.2 Patientenkollektiv:**

Alle 596 Patienten wurden im Zeitraum von Januar 2013 bis Dezember 2013 aus der Botulinumtoxin-Ambulanz der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, Deutschland rekrutiert.

Einschlusskriterien waren:

- Geschäftsfähigkeit
- Lebensalter über 18 Jahre
- Dokumentiertes Einverständnis zur Teilnahme an der Studie nach erfolgter Aufklärung
- Die Behandlung mit BoNT erfolgt aufgrund einer der oben genannten Indikationen (CD, BSP, FHS, ODT oder SPAS)
- Mindestens vier erfolgte BoNT-Injektionen im Laufe einer Behandlungsdauer von mindestens einem Jahr

Ausschlusskriterien waren das Fehlen der Einverständniserklärung, sowie ein Patientenalter unter 18 und/oder nicht-geschäftsfähige Personen. Die Patienten wurden in fünf verschiedene Indikations-Subgruppen unterteilt (CD, BSP, FHS, ODT und SPAS), wobei die ODT-Subgruppe Patienten mit Meige-Syndrom, oromandibulären und oropharyngealen Dystonien, sowie fokalen oder segmentalen Extremitätendystonien und generalisierte Dystonien enthielt. Zwei NAb-positive Patienten litten an einer symptomatischen Dystonie auf dem Boden einer Basalganglien-Läsion. Diese zwei Patienten wurden in der Subgruppen-Analyse weder in die ODT-Subgruppe noch in die SPAS-Subgruppe eingeschlossen. Insgesamt wurden 408 CD-Patienten, 54 BSP-Patienten, 47 FHS-Patienten, 52 ODT-Patienten und 33 SPAS-Patienten eingeschlossen. Da die eingeschlossenen Patienten mit unterschiedlichen Handelspräparaten therapiert worden sind, musste zur interindividuellen Vergleichbarkeit eine Umrechnung der

verwendeten Dosierungen erfolgen. Insgesamt wurden 324 der eingeschlossenen Patienten ausschließlich mit dem Präparat abo-BoNT-A behandelt, 68 Patienten ausschließlich mit ona-BoNT-A und 46 Patienten ausschließlich mit inco-BoNT-A. Bei 158 eingeschlossenen Patienten wurde im Verlauf ihrer Behandlung das BoNT-Präparat mindestens einmal gewechselt. Resultierend aus der Tatsache, dass die meisten Patienten mit dem Präparat Dysport® (abo-BoNT-A) behandelt worden sind, wurden die Dysport®-Dosen unverändert belassen. Die Dosen der beiden Präparate Botox® (ona-BoNT-A) und Xeomin® (inco-BoNT-A) wurden mit dem Faktor 2,5 multipliziert, um vergleichbare und einheitliche Dosierungen zu erhalten (uDU= *unified dose units*). Diese Umrechnung wurde bereits in verschiedenen Arbeiten zur Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Formulierungen durchgeführt [87, 88]. Zur genaueren Analyse des Einflusses der verwendeten Einzeldosis auf die Bildung von NAbs wurde eine Unterteilung in drei verschiedene Dosis-Subgruppen vorgenommen (0-350 uDU, 351-700 uDU und >700 uDU).

### **2.3 Detektieren von BoNT-Antikörpern:**

Den eingeschlossenen Patienten wurde zu einem zufällig gewählten Zeitpunkt ihrer BoNT-Therapie im Zeitraum von Januar 2013 bis Dezember 2013 jeweils einmalig 10 ml Blut abgenommen (periphere Blutentnahme aus einer Cubitalvene). Vor dem Zeitpunkt der Blutentnahme mussten mindestens vier BoNT-Injektionen im Laufe einer Behandlungsdauer von mindestens einem Jahr erfolgt sein. Aus den Blutproben wurde das Serum per Zentrifugation getrennt, sofort eingefroren und bis zum Transport bei -20 C° gelagert. Die Testung auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen BoNT wurde von einem unabhängigen Anbieter (BSL; Bioservice Scientific Laboratories, Planegg, Deutschland) durchgeführt. Hier wurden zwei aufeinanderfolgende ELISAs zur Untersuchung und Bestätigung von BoNT-bindenden Antikörpern durchgeführt. Um zwischen nicht-neutralisierenden Antikörpern und neutralisierenden Antikörpern zu unterscheiden, reicht das ELISA Verfahren jedoch nicht aus [78]. Daher wurden ELISA-positiv getestete Proben dann zu einer anderen Firma (Toxogen GmbH, Hannover, Deutschland) überführt. Hier wurden die Blutproben bezüglich des Vorhandenseins von BoNT-bindenden Antikörpern und NAbs unterschieden. Diese Diskriminierung erfolgte unter Anwendung der sensitiven MHDA.

### **2.3.1 ELISA:**

ELISA bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, bei dem eine Antigenkonzentration mittels enzymatisch katalysierter Farbreaktion bestimmt werden kann. Bei dem Sandwich ELISA ist ein Antikörper, der spezifisch an das zu bestimmende Antigen bindet, an eine 96-Well Platte gebunden und immobilisiert. Dieser wird dann mit dem Antigen inkubiert. Durch mehrere Waschschrte werden ungebundene Proteine von der Platte heruntergespült. Ein zweiter AK wird auf die Platte gegeben, der ebenfalls an das Antigen bindet. Es bildet sich ein sogenanntes „Sandwich“ aus dem ersten AK, dem Antigen und dem zweiten AK. An den zweiten AK ist ein Enzym gebunden, das einen Farbumschlag (durch Spaltung eines Substrats) katalysiert. Typischerweise wird die Meerrettichperoxidase oder die Alkalische Phosphatase verwendet. Die Intensität des farbigen Spaltungsprodukts kann mittels Photometer bestimmt werden. Durch einen Abgleich mit einer Standardkurve, kann dann die Antigenkonzentration bestimmt werden [89, 90]. Um Antikörper gegen BoNT im Serum von Patienten nachzuweisen, wird BoNT an einen immobilisierten AK gebunden. Es folgt eine Inkubation mit dem Patientenserum. Falls Antikörper gegen BoNT in dem Serum enthalten sind, binden sie an das fixierte BoNT. Die Konzentration der gebundenen AK wird dann mit einem Anti-human IgG Enzym Konjugat bestimmt [78].

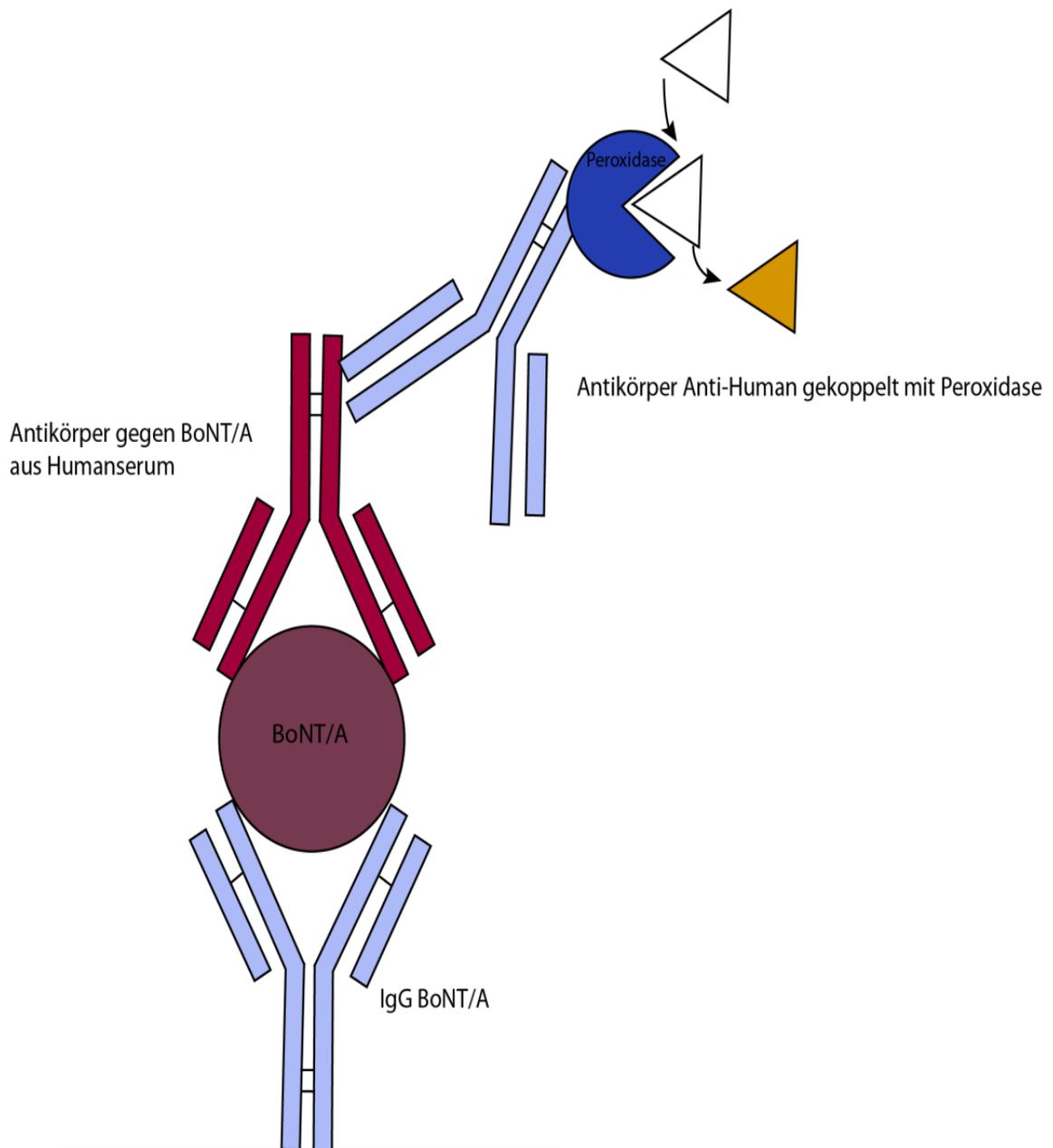


Abb. 3: Graphische Darstellung des immunologischen Nachweisverfahrens von BoNT-AK im Serum beim ELISA-Verfahren, modifiziert nach Engvall et al, Schuurs et al und Goschel et al [78,89, 90]. Der Immobilisierte Antikörper bindet an BoNT. das Patientenserum wird hinzugegeben. Falls bindende Antikörper (zwischen NABs und NAPs kann hierbei nicht unterschieden werden) vorhanden sind, werden diese mit einem Anti-Humanen Antikörper detektiert, der eine Peroxidase gebunden hat. Durch einen Farbumschlag, kann dann die Bindung des Antikörpers aus dem Patientenserum nachgewiesen werden.

### 2.3.2 Maus-Hemidiaphragma-Analyse

Bei der MHDA wird der linke oder rechte N. phrenicus aus einer getöteten Maus freigelegt und in ein Organbad (Krebsringerlösung, 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, pH7.7) überführt.

Durch elektrische Stimulation des Nervs wird die Kontraktion des Hemidiaphragmas induziert und mithilfe eines Kraftaufnehmers gemessen. Diese Stimulation des Hemidiaphragmas ist über mehrere Stunden möglich. Um die Konzentration von BoNT zu bestimmen, kann dieses in das Organbad hinzugegeben werden. Dadurch wird die Kontraktion des Muskels unterbunden. Anhand der Zeit zwischen BoNT Applikation und der Lähmung des Muskels, kann die Konzentration von aktivem BoNT gemessen werden. Dabei wird  $t_{1/2}$  als Zeitmaß verwendet, welches die Zeit angibt, bis zu der die Hälfte der maximalen Relaxation des Muskels eingetreten ist [91, 92]. Um NAbs von NAPs zu unterscheiden, wird eine bekannte Konzentration von BoNT zu dem Patientenserum hinzugegeben. Das Toxin-Serum-Gemisch wird zunächst mit Krebs-Ringer Lösung dialysiert und dann in das Organbad gegeben. Befinden sich NAbs im Serum, wird  $t_{1/2}$  verlängert, da die Toxizität von BoNT reduziert wird. Mithilfe dieser Methode, können NAbs im Patientenblut von den NAPs unterschieden werden [78].

## **2.4 Statistische Analyse**

Zur Identifizierung der relevanten, statistisch signifikanten Einflussfaktoren auf die Entstehung von NAbs wurde eine binäre Regressionsanalyse berechnet. Des Weiteren wurde für die fünf Indikations-Subgruppen, sowie für die drei Dosis-Subgruppen eine Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit darzustellen, in Abhängigkeit von der Therapiedauer einen negativen NAb-Status zu behalten. Die Vergleiche zwischen den Subgruppen bei den Kaplan-Meier-Kurven erfolgten mit Hilfe des Tarone-Ware Tests, wobei mittels Bonferroni Korrektur für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen korrigiert wurde. Zum weiteren Subgruppen Vergleich wurde eine Varianzanalyse (ANOVA mit Tukeys post hoc Test) durchgeführt. Alle statistischen Analysen wurden mit dem SPSS statistics package (IBM) durchgeführt. Als statistisches Signifikanzniveau wurde  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## **3 Ergebnisse**

Im Gesamtkollektiv konnten bei 83 von 596 Patienten (13,9%) NAbs nachgewiesen werden. Die Wahrscheinlichkeit, NAbs zu entwickeln, stieg mit der verwendeten Einzeldosis pro Injektion und der kumulativen Lebenszeit-Dosis. Einen zusätzlichen Einfluss hatte die verwendete BoNT- Formulierung. Alle anderen analysierten Faktoren,

wie Krankheitsentität, Behandlungsdauer oder Patientenalter zu Beginn der Behandlung hatten keinen Einfluss auf die Entstehung von NAbs.

### **3.1 Übersicht über das Patientenkollektiv:**

Das untersuchte Patientenkollektiv setzte sich aus fünf Subgruppen verschiedener Behandlungsindikationen zusammen. Die CD-Subgruppe machte hier mit Abstand den größten Anteil der Studienteilnehmer aus und bestand aus 408 Patienten. Die BSP-Subgruppe setzte sich aus 54 Patienten zusammen, die ODT-Subgruppe aus 52 Patienten, die FHS-Subgruppe aus 47 Patienten und die SPAS-Subgruppe aus 33 Patienten.

Betrachtet man die durchschnittliche Einzeldosis pro Injektion in den verschiedenen Subgruppen, so fällt auf, dass in den beiden Subgruppen FHS und BSP die geringsten Einzeldosen verwendet worden sind (durchschnittlich 82 uDU in der FHS-Subgruppe und durchschnittlich 112 uDU in der BSP-Subgruppe). Die höchsten verwendeten Einzeldosen pro Injektion wies die Subgruppe SPAS mit durchschnittlich 957 uDU pro Injektion auf. In der CD- und ODT-Subgruppe lagen die durchschnittlichen Einzeldosen ebenfalls weit über denen der FHS und BSP Subgruppe (durchschnittlich 641 uDU in der CD-Subgruppe und durchschnittlich 356 uDU in der ODT-Subgruppe).

Das durchschnittliche Alter der Patienten war in allen fünf Indikations-Subgruppen in etwa vergleichbar und lag bei über 55 Jahren.

Vergleicht man die Prävalenz von NAbs in den verschiedenen Indikations-Subgruppen so fällt die FHS-Subgruppe sofort ins Auge, in der kein einziger Patient NAb-positiv getestet worden ist. In allen anderen Subgruppen konnten Patienten mit NAbs nachgewiesen werden (siehe Tabelle 2). Der Anteil NAb-positiver Patienten war in den Subgruppen CD, ODT und SPAS sehr ähnlich und lag jeweils in Bereichen von über 15% (in der CD-Subgruppe bei 15,69%, in der ODT-Subgruppe bei 17,31% und in der SPAS-Subgruppe bei 15,15%). In der BSP-Subgruppe hingegen zeigte sich ein signifikant geringerer Anteil an NAb-positiven Patienten von 5,6% ( $p < 0.05$ , ANOVA mit Tukeys post-hoc Test, siehe Abb. 4 und Tabelle 2).

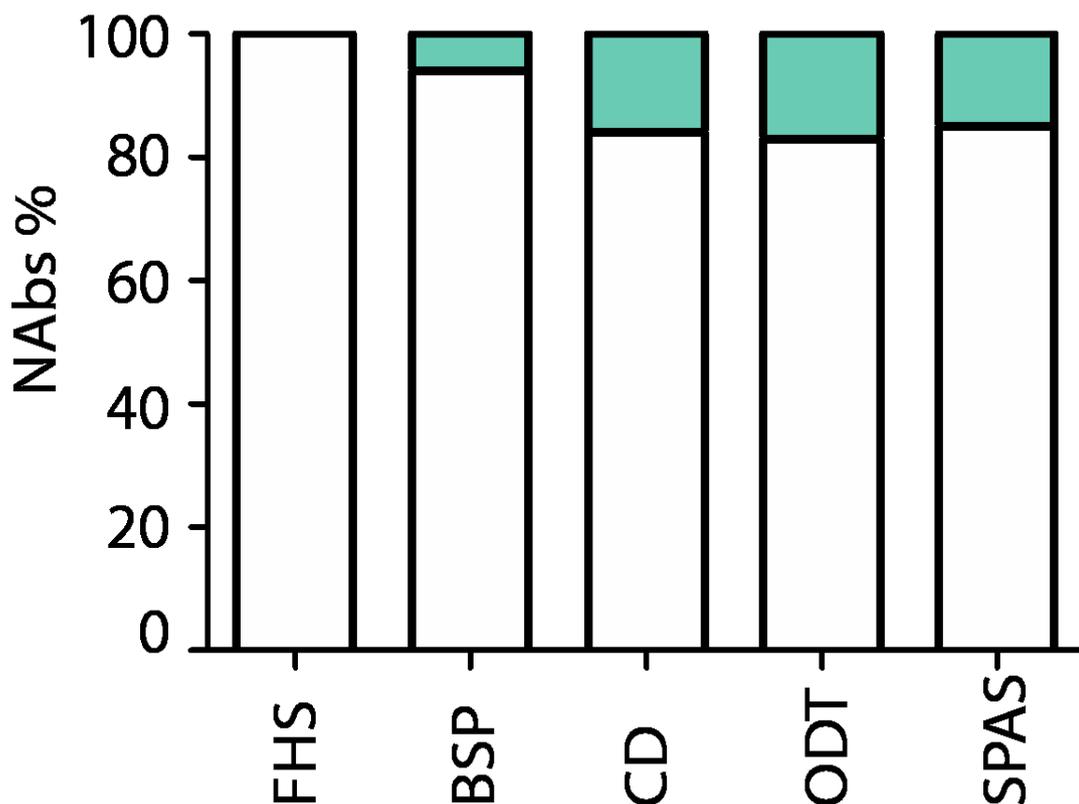


Abb. 4: **Prozentualer Anteil neutralisierender Antikörper (NAb)-positiver Patienten in den verschiedenen Indikations-Subgruppen**, modifiziert nach Albrecht et al. [93]. Der Anteil an NAb-positiv getesteten Patienten (grüne Fläche) war in den Subgruppen Spasmus hemifacialis (FHS) (kein NAb-positiv getesteter Patient) und Blepharospasmus (BSP) am geringsten. In den drei anderen Subgruppen Zervikale Dystonie (CD), andere Dystonien (ODT) und Spastik (SPAS) lag der Anteil an NAb-positiven Patienten in Bereichen von 15%.

Die Mehrheit der Patienten wurde ausschließlich mit der Formulierung abo-BoNT-A behandelt (n=324), 68 Patienten wurden ausschließlich mit ona-BoNT-A behandelt und 46 Patienten ausschließlich mit inco-BoNT-A. 158 Patienten erhielten im Verlauf ihrer Behandlung mehr als eine BoNT-Formulierung und wurden als *Switcher* klassifiziert. Die initial verwendete Formulierung war bei 95 dieser *Switcher* abo-BoNT-A, bei 61 ona-BoNT-A und bei zwei Patienten inco-BoNT-A. Im Hinblick auf die verwendeten Formulierungen zeigten sich sehr ähnliche Raten NAb-positiver Patienten bei abo-BoNT-A (6%) und ona-BoNT-A (7%). Bei den Patienten, welche mit mehr als einer Formulierung behandelt worden sind (*Switcher*), zeigten sich deutlich höhere Raten von Patienten mit NAb (33%). Unter Therapie mit ausschließlich inco-BoNT-A konnten keine NAb-positiven Patienten nachgewiesen werden (siehe Abb. 5). Die Behandlungsdauer unterschied sich bei den Patienten, die mit abo-BoNT-A oder ona-BoNT-A behandelt worden sind, nicht signifikant voneinander. Die sogenannten

*Switcher* zeigten jedoch deutlich längere Behandlungszeiträume. Patienten, die ausschließlich mit inco-BoNT-A behandelt worden sind, zeigten die kürzesten Behandlungszeiträume ( $p < 0,05$ , ANOVA mit Tukey post hoc Test).

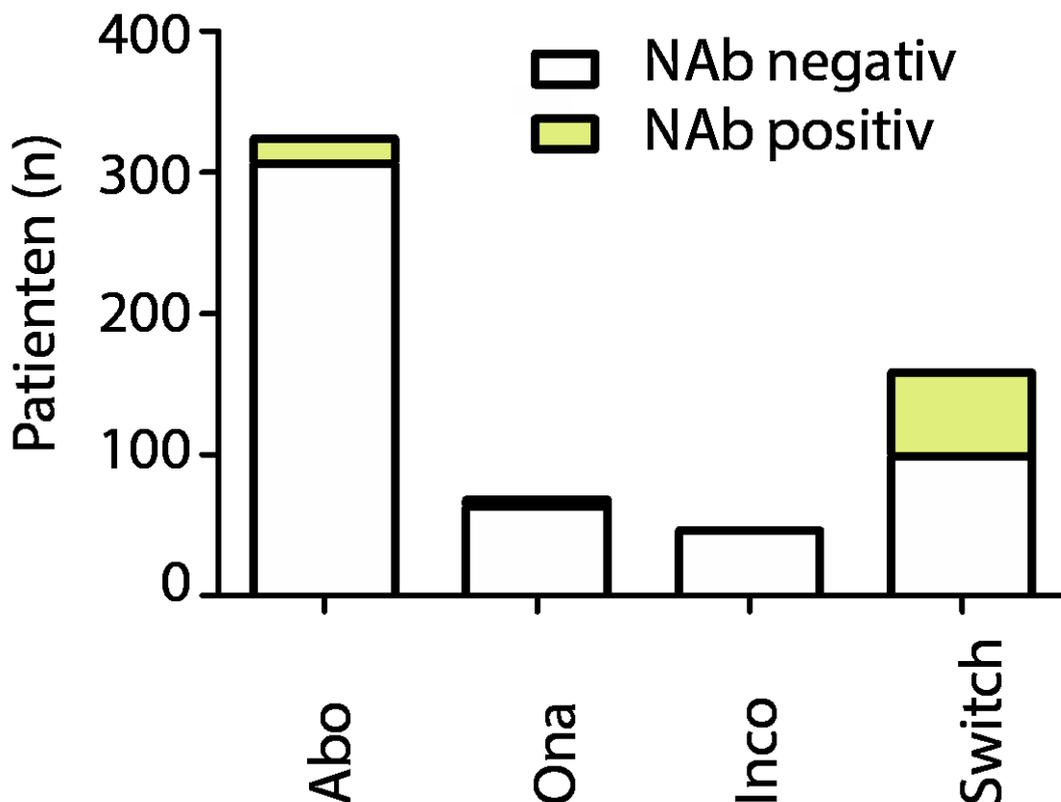


Abb. 5: Absoluter Anteil neutralisierender Antikörper (NAb)-positiver und NAb-negativer Patienten bei den verschiedenen Botulinumneurotoxin (BoNT)-Präparaten, modifiziert nach Albrecht et al. [93]. Bei den ausschließlich mit Inco-BoNT-A (Inco) behandelten Patienten konnte kein einziger NAb-positiver Patient nachgewiesen werden, in der Gruppe der sogenannten *Switcher* (Switch) zeigte sich im Gegensatz dazu ein hoher Anteil NAb-positiver Patienten (gelbe Fläche). Ebenfalls dargestellt sind die mit Abo-BoNT-A (Abo) und Ona-BoNT-A (Ona) behandelten Patienten

Die durchschnittliche Behandlungsdauer unterschied sich in den drei Subgruppen CD, BSP und FHS nicht wesentlich voneinander und lag zwischen fünf und sechs Jahren. In den beiden anderen Subgruppen (SPAS und ODT) war die Behandlungsdauer signifikant kürzer ( $p < 0,05$ , ANOVA mit Tukey post hoc Test). In diesen beiden Subgruppen lag die durchschnittliche Behandlungsdauer jeweils unterhalb von 4 Jahren (in der ODT-Subgruppe bei 2,87 Jahren, in der SPAS-Subgruppe bei 3,22 Jahren). In allen fünf Indikations-Subgruppen existierten Patienten, die schon seit mehr als 15 Jahren kontinuierlich mit BoNT-Injektionen behandelt worden sind (siehe auch Abb. 6).

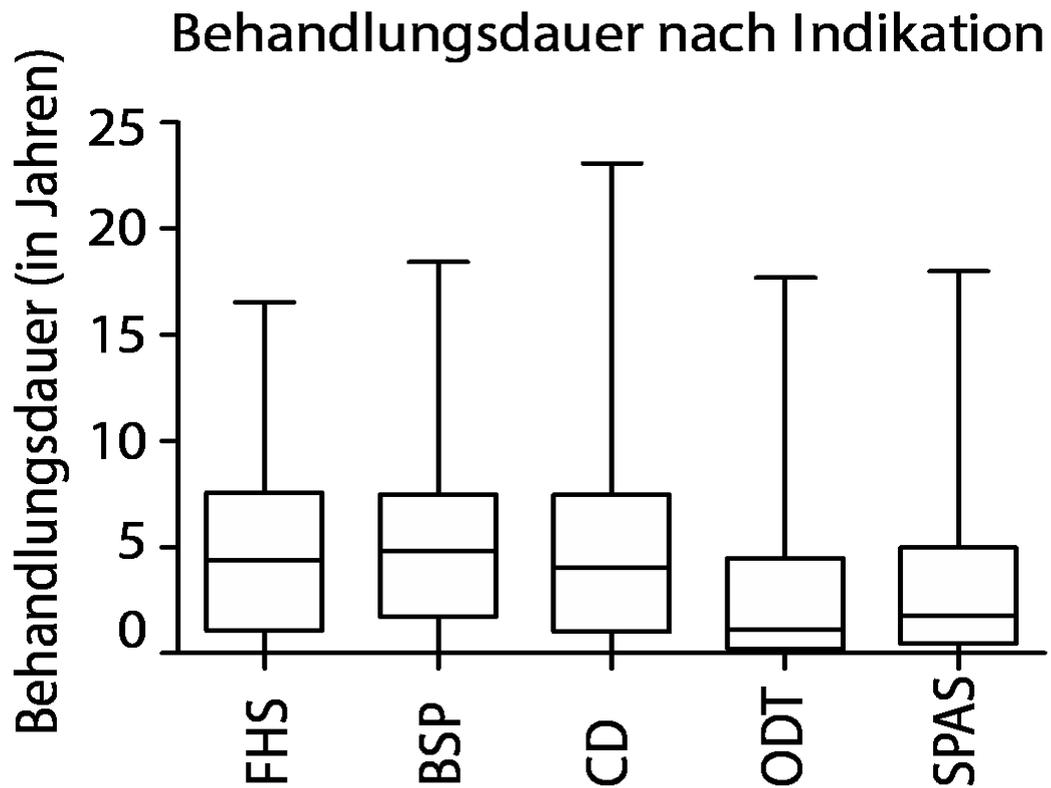


Abb. 6: **Box-Plot-Diagramm zur Verteilung der Behandlungsdauer in den verschiedenen Indikations-Subgruppen**, modifiziert nach Albrecht et al. [93]. Die horizontalen Balken kennzeichnen den Median, die Kästen die Bandbreite zwischen den Quartilen und die Whisker das Minimum und das Maximum. In allen fünf Subgruppen gab es Patienten, welche seit mehr als 15 Jahre mit Botulinumneurotoxin (BoNT) behandelt worden sind. Bei den dargestellten Indikations-Subgruppen handelt es sich um Spasmus hemifacialis (FHS), Blepharospasmus (BSP), Zervikale Dystonie (CD), andere Dystonien (ODT) und Spastik (SPAS).

| Parameter                                     | FHS     | BSP       | CD          | ODT        | SPAS       |
|---|---------|-----------|-------------|------------|------------|
| N=  | 47      | 54        | 408         | 52         | 33         |
| NAbs absolut, (NAb-Prävalenz)                 | 0       | 3 (5,56%) | 64 (15,69%) | 9 (17,31%) | 5 (15,15%) |
| Durchschnittliches Alter (Standartabweichung) | 67 (10) | 68 (11)   | 63 (13)     | 59 (15)    | 62 (14)    |
| Durchschnittliche Inzidenz von NAbs           | 0       | 0,993%    | 2,792%      | 6,031%     | 4,705%     |
| Durchschnittliche Behandlungsdauer in Jahren  | 5,27    | 5,6       | 5,62        | 2,87       | 3,22       |
| Durchschnittliche Einzeldosis in uDU          | 82      | 112       | 641         | 356        | 957        |

Tabelle 2: **Tabellarische Übersicht über das Patientenkollektiv**, die Zervikale Dystonie (CD)-Subgruppe machte mit 408 Patienten den mit Abstand größten Anteil der eingeschlossenen Patienten aus. Die Prävalenz von neutralisierenden Antikörpern (NAbs) lag in den Subgruppen CD, andere Dystonien (ODT) und Spastik (SPAS) jeweils im Bereich von über 15%, wobei in der Spasmus hemifacialis (FHS)-Subgruppe kein einziger Patient mit NAbs nachgewiesen werden konnte. Die durchschnittlich verwendeten Einzeldosen lagen in der FHS- und Blepharospasmus (BSP)-Subgruppe in deutlich geringeren Bereichen als in den anderen Subgruppen.

## **3.2 Kaplan-Meier-Analyse zur Entstehung von NAbS in den verschiedenen Indikations-Subgruppen**

Zur Analyse der Wahrscheinlichkeit im Laufe einer BoNT-Therapie einen negativen NAb-Status zu behalten, wurde eine Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt. Die Kaplan-Meier-Analyse ermöglichte es uns, für jeden Zeitpunkt der Therapie die Wahrscheinlichkeit zu bestimmen, einen negativen NAb-Status in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer zu behalten. Diese Wahrscheinlichkeitsanalyse erfolgte für jede der fünf Indikations-Subgruppen getrennt. Mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven wurden die Ergebnisse graphisch dargestellt. Auf der x-Achse wurde die Therapiedauer dargestellt, auf der y-Achse wurde die Wahrscheinlichkeit einen negativen NAb-Status zu behalten angezeigt. In den Subgruppen BSP, CD, ODT und SPAS kam es im Laufe der Zeit (x-Achse) zu einem Abfall der Kaplan-Meier-Kurven. Der Abfall der Kurve wies auf eine nicht-lineare Zunahme der Wahrscheinlichkeit hin, bei steigender Behandlungsdauer einen positiven NAb-Status zu entwickeln. Dabei bestand in den verschiedenen Indikations-Subgruppen ein signifikanter Unterschied im Risiko für die Entstehung von NAbS ( $p < 0.027$ , Tarone-Ware Test). Besonders auffällig war der Abfall der Kurven in den Subgruppen CD, ODT und SPAS. In diesen Subgruppen suggerierte der Verlauf der Kaplan-Meier-Kurven das Risiko einen positiven NAb-Status zu entwickeln auf Wahrscheinlichkeiten im Bereich von 30-40% während einer Langzeit-Therapie mit BoNT (Behandlungsdauer von ungefähr 15 Jahren). In der FHS-Subgruppe ließ sich am Kurvenverlauf parall zur x-Achse im Gegensatz dazu auch bei einer Behandlungsdauer von über 15 Jahren kein Risiko NAbS zu entwickeln, ablesen (siehe Abb. 7).

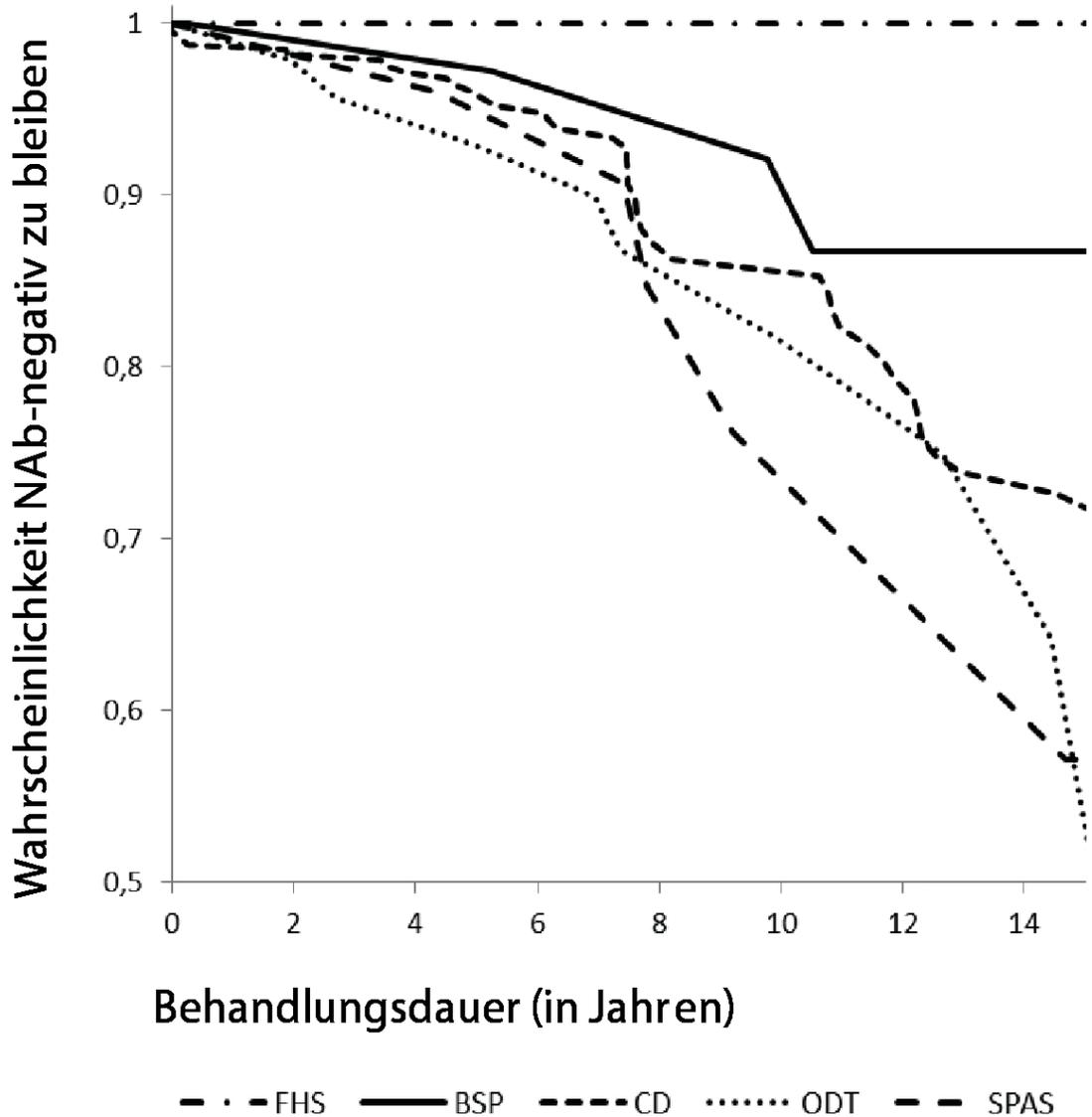


Abb. 7: Kaplan-Meier-Kurven zur Wahrscheinlichkeit einen negativen neutralisierenden Antikörper (NAb)-Status in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer zu behalten in den verschiedenen Indikations-Subgruppen, modifiziert nach Albrecht et al. [93]. Mit zunehmender Behandlungsdauer wird der Abfall der Kurven in den Subgruppen Zervikale Dystonie (CD), andere Dystonien (ODT) und Spastik (SPAS) immer steiler. Nach einem Behandlungszeitraum von 15 Jahren haben bis zu 40% der Patienten in diesen Subgruppen einen positiven NAb-Status entwickelt. Ebenfalls dargestellt sind die Kaplan-Meier-Kurven in den Subgruppen Spasmus hemifacialis (FHS) und Blepharospasmus (BSP).

### 3.3 Einfluss der durchschnittlichen Einzeldosis auf die Entstehung von NAb

Um den Einfluss der durchschnittlich verwendeten Einzeldosis pro Injektion auf die Entstehung von NAb zu untersuchen wurden die eingeschlossenen Patienten in drei verschiedene Dosis-Subgruppen unterteilt (0-350 uDU, 351-700 uDU, >700 uDU). Wie

bereits zuvor erwähnt stieg die Wahrscheinlichkeit einen positiven NAb-Status zu entwickeln mit zunehmender Behandlungsdauer. In unserer statistischen Analyse zeigte sich zudem, dass diese Wahrscheinlichkeit Dosis-abhängig ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Wahrscheinlichkeit NAbS zu entwickeln bei Patienten, welche durchschnittliche BoNT-Dosen von mehr als 350 uDU erhalten haben, höher war als bei Patienten, welche durchschnittliche Dosen von unter 350 uDU injiziert bekommen hatten ( $p < 0.003$ , Tarone Ware Test mit Bonferroni Korrektur). Die Wahrscheinlichkeit NAbS zu entwickeln war am höchsten bei Patienten, die mit Dosen von mehr als 700 uDU behandelt worden sind ( $p < 0.003$  Tarone Ware Test mit Bonferroni Korrektur). Graphisch wurden diese Ergebnisse durch den unterschiedlich stark ausgeprägten Abfall der Kaplan-Meier-Kurven (siehe Abb. 8) wiedergespiegelt. Der Kurvenverlauf der Hochdosis-Subgruppe ( $>700$  uDU) suggerierte eine Wahrscheinlichkeit von mehr als 40% unter Langzeit-BoNT-Therapie (Behandlungsdauer von über 15 Jahren) einen positiven NAb-Status zu entwickeln.

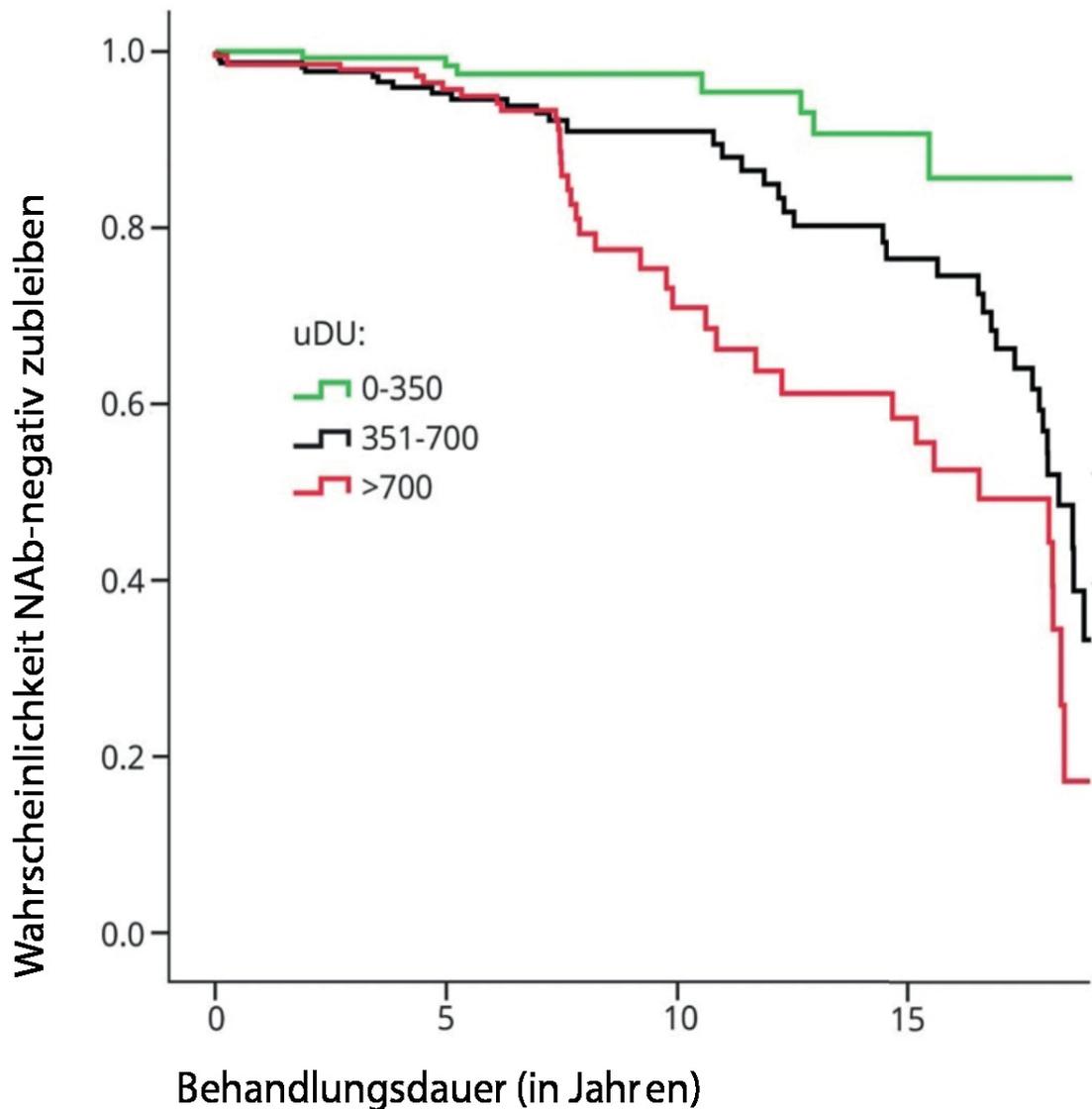


Abb. 8: Kaplan Meier-Kurven zur Wahrscheinlichkeit neutralisierende Antikörper (NAb)-negativ zu bleiben in Abhängigkeit von der verwendeten Einzeldosis über die Behandlungsdauer in Jahren, modifiziert nach Albrecht et al. [93]. Die Wahrscheinlichkeit einen negativen NAb-Status zu behalten nimmt mit der Behandlungsdauer in allen drei Dosis-Subgruppen, Dosisangabe in *unified dose units* (uDU), ab. Je höher die verwendete Einzeldosis, desto geringer ist diese Wahrscheinlichkeit über den Behandlungszeitraum.

### 3.4 Regressionsanalyse

Der Einfluss folgender Faktoren auf die Entstehung von NAbS wurde mittels einer binären Regresionsanalyse berechnet:

- Alter zu Beginn der Therapie
- Einzeldosis pro Injektion
- Behandlungsdauer

- Kumulative Lebenszeit-Dosis
- Krankheitsbild
- Verwendetes BoNT-Präparat (Abo-, Ona- und Inco-BoNT-A)

Von essentieller Bedeutung für die statistische Analyse war, dass das Präparat Inco-BoNT-A erst im Jahr 2005 zur Behandlung von den Krankheitsbildern ODT, CD und BSP zugelassen worden ist. Erst im Jahr 2010 erfolgte die Zulassung zur Behandlung von Patienten mit SPAS. Dadurch erklärte sich die deutlich kürzere Behandlungsdauer in der mit Inco-BoNT-A behandelten Patientengruppe. Um das hieraus resultierende Risiko einer statistische Verzerrung zu reduzieren, zensierten wir alle mit abo-/ona-BoNT-A behandelten Patienten, welche bereits vor 2005 (bei den Krankheitsbildern ODT, BSP oder CD), beziehungsweise vor 2010 (bei der Behandlungsindikation SPAS) behandelt worden waren.

In der Regressionsanalyse (mit dieser Zensur) hatten zwei Einflussfaktoren einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Entstehung von NAbs:

- Das verwendete Präparat ( Abo-, Ona- und Inco-BoNT-A)
- Die Einzeldosis pro Injektion

Als Haupteinflussfaktor zeigte sich das verwendete Präparat gefolgt von der verwendeten Einzeldosis pro Behandlung ( $p < 0.01$  und  $p = 0.023$ ). Alle anderen, oben genannten Faktoren (Alter zu Beginn der Therapie, Behandlungsdauer, kumulative Lebenszeitdosis und Krankheitsbild) hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von NAbs. Ebenfalls wurde die Regressionsanalyse ohne oben beschriebene Zensur, also mit allen eingeschlossenen Patienten durchgeführt. Hierbei zeigte sich interessanterweise, dass der Einfluss des verwendeten Präparates seine statistische Signifikanz verlor. In dieser Analyse (ohne Zensur) waren die Einflussfaktoren kumulative Lebenszeit-Dosis, sowie die Einzeldosis pro Behandlung statistisch signifikant ( $p = 0.004$  und  $p < 0.001$ ) im Bezug auf die Entstehung von NAbs.

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit basiert auf einer monozentrischen Studie, welche Daten zu der Prävalenz von NAbs unter Langzeitbehandlung mit BoNT liefert. Das dabei untersuchte Patientenkollektiv rekrutierte sich aus einem klinischen Szenario (Patienten aus der Botulinumtoxin Ambulanz Universitätsklinik Düsseldorf) und umfasste insgesamt 596 Patienten. Es bestand aus fünf verschiedenen Subgruppen, wobei die Unterteilung nach

der Behandlungsindikation erfolgte. Die hervorzuhebende Besonderheit dieser Studie ist, dass die Auswahl der eingeschlossenen Patienten ohne Selektion bezüglich des Therapieerfolges und/oder der Therapieindikation erfolgte. Daher ist ein Subgruppenvergleich zwischen den verschiedenen Behandlungsindikationen zulässig. Außerdem werden noch fehlende Informationen über NAb-Prävalenzen in kleineren, bisher weniger häufig untersuchten Patienten-Subgruppen geliefert. Die in diversen anderen Publikationen schon häufig untersuchten Einflussfaktoren auf die Entstehung von NAbs konnten an einem relativ großen Patientenkollektiv erneut analysiert werden.

#### **4.1 Prävalenz von NAbs im Gesamtkollektiv**

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit an einem nicht selektionierten Patientenkollektiv bestehend aus 596 Patienten eine NAb-Prävalenz von 13,9% (83 von 596 Patienten mit NAbs) ermittelt werden. Diese, am gesamten Patientenkollektiv bestimmte Prävalenz lässt sich mit den Ergebnissen einer großen Metaanalyse von Fabbri et al in Einklang bringen. Hier wurden Daten aus 61 verschiedenen Studien bei insgesamt 8525 eingeschlossenen Patienten analysiert. Die Gesamtprävalenz von NAbs lag in dieser Arbeit indikationsübergreifend bei 12,1% [65]. Wie bereits erwähnt erfolgte der Einschluss der Patienten in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf das Therapieansprechen unselektioniert (es wurden nicht nur Patienten mit beispielsweise STF eingeschlossen). Die eingeschlossenen Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Datenerhebung in regelmäßiger Behandlung mit BoNT und zeigten in den damit verbundenen klinischen Evaluationen ein zumindest partielles Ansprechen auf die Injektionstherapie. In diesem Zusammenhang sollten zwei mögliche Szenarien berücksichtigt werden, welche bei der Interpretation der ermittelten NAb-Prävalenzen bedacht werden müssen. Aufgrund der Tatsache, dass die vorliegende Studie als Querschnittsanalyse angelegt worden ist, handelt es sich bei den ermittelten NAb-Prävalenzen um eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt der jeweiligen Blutentnahme. Es wäre also möglich, dass Patienten aus unserer Kohorte bereits vor dem Beobachtungszeitraum ein STF entwickelt haben und aufgrund dessen die Therapie, vor einem möglichen Einschluss in die Studie, abgebrochen haben. Andererseits wäre es möglich, dass Patienten, welche NAb-positiv getestet worden sind, kurz nach dem Einschluss in unsere Studie ein STF entwickelt haben und die Therapie im Anschluss abgebrochen haben.

Unter Annahme, dass es sich bei dem Großteil der in unserer Studie eingeschlossenen Patienten um Therapieansprecher handelt, fällt auf, dass die in der aktuellen Arbeit

ermittelte NAb-Prävalenz von 13,9% im Vergleich zur von Fabbri et al getrennt analysierten Prävalenz bei 4282 Therapieansprechern eher hoch ausfällt. Die Prävalenz unter den Therapieansprechern zeigte in der Metaanalyse indikationsübergreifend lediglich einen Wert von 3,5% [65]. In einer anderen Metaanalyse von Naumann et al konnten sogar noch geringe Prävalenzen von NAb gezeigt werden. In dieser Analyse wurden lediglich 11 Fälle beschrieben (von insgesamt 2240 eingeschlossenen Personen), in denen es unter Ona-BoNT-A-Therapie zum Nachweis von NAb kam. Dies würde einer Prävalenz von lediglich 0,5% entsprechen [66]. Kritisch anzumerken ist, dass die Anzahl der Behandlungen (durchschnittlich 3,8) und die Nachsorge-Dauer in den untersuchten Studien im Vergleich zur vorliegenden Arbeit limitiert waren. Eine realitätsnahe Aussage zur Prävalenz von NAb unter Langzeittherapie mit BoNT (die durchschnittliche Behandlungsdauer lag in der vorliegenden Arbeit bei über 4 Jahren) lässt sich also wahrscheinlich verlässlicher anhand der aktuellen Ergebnisse treffen. Ebenfalls kritisch anzumerken ist, dass der Nachweis von NAb, in den bei der Metaanalyse von Naumann et al analysierten Studien, mittels *mouse protection assay* (MPA) erfolgte. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestätigung eines positiven Antikörperstatus die MHDA verwendet, welche als deutlich sensitiver gilt [94]. Generell fällt beim Versuch angegebene NAb-Prävalenzen unter BoNT-Therapie aus verschiedenen Studien miteinander zu vergleichen das Problem der unterschiedlichen Nachweismethoden auf. Sensitivitätsunterschiede beim Nachweis von NAb in den je nach Studie verwendeten Tests führen wahrscheinlich zu verschiedenen, nicht uneingeschränkt miteinander vergleichbaren Prävalenzwerten. Eine standardisierte Methode zur Detektion von NAb wäre hilfreich, um eine direkte Vergleichbarkeit der Studienergebnisse untereinander zu ermöglichen [67].

## **4.2 Vergleich der NAb-Prävalenzen in den Indikations-Subgruppen**

Auch wenn der Einschluss der Patienten für die vorliegende Arbeit unselektioniert erfolgte, zeigten alle eingeschlossenen Patienten zumindest ein partielles Ansprechen auf die BoNT-Therapie (siehe auch Kapitel 4.1). Nichtsdestotrotz lassen sich die in der vorliegenden Arbeit ermittelten NAb-Prävalenzen innerhalb der verschiedenen Indikations-Subgruppen prinzipiell mit den Ergebnissen von Lange et al vergleichen [79]. In deren Arbeit wurde die Prävalenz von NAb in einem aus sekundären Therapieversagern bestehenden Kollektiv ermittelt. Sowohl in der Studie von Lange et al

als auch in dieser Arbeit zeigten sich hohe Prävalenzen von NAbS bei Patienten mit den Krankheitsbildern CD, ODT und SPAS und im Vergleich dazu signifikant tiefere Raten von NAb-positiven Patienten in den Subgruppen BSP und FHS. Wichtig ist, dass die in die Studie von Lange et al eingeschlossenen Patienten ausschließlich sekundäre Therapieversager waren. Daher lässt sich im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit keine verlässliche Aussage über die Prävalenz von NAbS in einem realitätsnahen Patientenkollektiv machen. Aufgrund der Selektion bezüglich des Therapieansprechens lagen die ermittelten Prävalenzwerte in der Arbeit von Lange et al im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen auch deutlich höher (225 von 362 CD-Patienten mit NAbS (=62%), 20 von 35 SPAS-Patienten mit NAbS (=57%), 8 von 14 Patienten mit generalisierter Dystonie mit NAbS (=57%), 10 von 38 BSP-Patienten mit NAbS (=26%), und 6 von 16 FHS-Patienten mit NAbS (=38%)) [79]. In diesem Kontext lässt sich die von Fabbri et al gewonnen Erkenntnis, dass die in einer Studie bestimmte Prävalenz von NAbS stark vom Status des Therapieansprechens der eingeschlossenen Patienten beeinflusst wird, bestätigen [65].

#### **4.2.1 CD-Subgruppe**

Die größte Evidenz bezüglich der Entstehung und Prävalenz von NAbS unter Langzeittherapie mit BoNT existiert bisher bei Patienten mit CD. Exemplarisch sollen in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Mejia et al genannt werden. Mejia et al publizierten NAb-Prävalenzen von 8,9% bei einer durchschnittlichen Behandlungsdauer von 12 Jahren in einem Kollektiv, das sich aus verschiedenen Behandlungsindikationen zusammensetzte. Die aus diesen Ergebnissen anzunehmende Inzidenz liegt bei 0,75% pro Behandlungsjahr [85]. In einer anderen Studie wurde an einem Patientenkollektiv bestehend aus 212 CD-Patienten eine NAb-Prävalenz von 14,6% beschrieben. Die durchschnittliche Behandlungsdauer lag in dieser Studie bei 11,7 Jahren. Wichtig zu erwähnen ist, dass es sich bei den von Hefter et al untersuchten Patienten nicht um sekundäre Therapieversager handelte, sondern um Patienten, bei denen eine adäquate Wirkung nach BoNT-Injektion erzielt werden konnte. Aus diesen Daten ergibt sich eine Inzidenzrate von 1,26% pro Behandlungsjahr [68]. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene NAb-Prävalenz von 15,7% in der CD-Subgruppe deckt sich somit weitestgehend mit einigen der bisher publizierten Ergebnisse. Diese hohe Prävalenz lässt sich unter anderem durch die hohen durchschnittlich injizierten Einzeldosen in der CD-Subgruppe (641 uDU, siehe auch Tabelle 2) erklären. Wie in Kapitel 3.4 bereits erwähnt

handelt es sich bei der verwendeten Einzeldosis um einen der wichtigsten Einflussfaktoren auf die Entstehung von NAbS unter Injektions-Therapie mit BoNT. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen und denen der anderen, oben genannten Arbeiten, liegen auch einige Publikationen vor, in denen deutlich niedrige NAb-Prävalenzen in Kollektiven bestehend aus CD-Patienten beschrieben worden sind. Bei diesen handelt es sich jedoch jeweils um Studien, in denen die Behandlungsdauer im Vergleich zu unserer Arbeit und den oben genannten Publikationen deutlich kürzer war. Die in diesen Studien angegebenen NAb-Prävalenzen repräsentieren aufgrund der kurzen Behandlungszeiträume gleichwohl umgerechnete Inzidenzwerte von ungefähr 0,5%-2% pro 1-2 Behandlungsjahre [65-67].

#### **4.2.2 BSP-Subgruppe**

Nicht für alle Behandlungsindikationen liegt eine vergleichbar dichte Datenlage zur Prävalenz von NAbS unter Injektionstherapie mit BoNT vor. Dies gilt auch für die BSP-Subgruppe. In der Vergangenheit konnte an einem Kollektiv bestehend aus 102 BSP-Patienten unter Injektionstherapie mit inco-BoNT-A keine Formation von NAbS nachgewiesen werden [95]. Es ist wichtig hervorzuheben, dass die von Truong et al eingeschlossenen Patienten einer Selektion bezüglich des verwendeten Präparates unterlagen und ausschließlich mit inco-BoNT-A behandelt worden sind. Möglicherweise ist das fehlende Vorkommen von NAbS in dieser Studie durch die bereits vermutete, geringere Antigenität von inco-BoNT-A zu erklären [63]. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in welcher das verwendete Präparat als relevanter Einflussfaktor auf die Bildung von NAbS herausgestellt werden konnte, lässt sich diese Annahme einer geringeren Antigenität zumindest bestärken. In anderen Arbeiten wurden im Gegensatz dazu NAb-Prävalenzen von bis zu 26% angegeben, wobei in der schon in Kapitel 4.2 erwähnten Studie von Lange et al ausschließlich sekundäre Therapieversager eingeschlossen worden sind [79]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine NAb-Prävalenz von 5,6% in der 54 Patienten enthaltenden BSP-Subgruppe. Da in unserer Arbeit weder eine Selektion bezüglich des verwendeten Präparates noch bezüglich des Therapieansprechens stattgefunden hat, erscheint die ermittelte Antikörperprävalenz von 5,6% in der BSP-Subgruppe im klinischen Kontext realitätsnaher als bei den beiden anderen erwähnten Publikationen zu sein.

### **4.2.3 ODT-Subgruppe**

Wie zuvor bereits erwähnt, ist die Datenlage bezüglich der Prävalenz von NAbS unter Therapie mit BoNT lediglich in der CD-Patientengruppe sehr dicht. Dieses Problem, welches ebenfalls die Gruppe anderer dystoner Erkrankungen betrifft, wurde exemplarisch unter anderem schon von den Autoren einer Übersichtsarbeit und Metaanalyse zum Thema NAbS unter BoNT-Therapie diskutiert [65]. Die vorliegende Arbeit mag hier mit den Resultaten aus der ODT-Patientensubgruppe, welche 52 Patienten enthielt, einen weiteren wichtigen Beitrag zur Datenlage leisten. In dieser Subgruppe, welche Patienten mit segmentalen und multifokalen Dystonien enthielt, konnten NAb-Prävalenzen im Bereich von mehr als 15% herausgearbeitet werden. Eine mögliche Erklärung für die hohen Prävalenzwerte liefert die im Vergleich zu anderen Subgruppen mit niedrigen NAb-Prävalenzen (FHS und BSP) durchschnittlich höheren Einzeldosen pro Injektion. So lag die durchschnittliche Einzeldosis in der ODT-Subgruppe bei 356 uDU, im Vergleich dazu lag die durchschnittlich verwendete Einzeldosis in der FHS-Subgruppe bei lediglich 82 uDU (siehe auch Tabelle 2). Der signifikante Zusammenhang zwischen hohen verwendeten Injektions-Dosen und einem erhöhten Risiko für die Entstehung von NAbS konnte bereits in zahlreichen Arbeiten belegt werden [75, 78, 96, 97]. Etwas überraschend erscheint in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass in der ODT-Subgruppe die höchste NAb-Prävalenz aller Subgruppen (17,3%) nachgewiesen werden konnte, wobei die durchschnittlich injizierten Einzeldosen unterhalb denen in der CD- und SPAS-Subgruppe lagen (in der CD-Subgruppe durchschnittlich 641 uDU, in der SPAS-Subgruppe durchschnittlich 957 uDU). Weitere Studien zu NAb-Prävalenzen bei Patienten mit dystonen Erkrankungen wären wünschenswert, um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit besser einordnen zu können.

### **4.2.4 SPAS-Subgruppe**

Der therapeutische Effekt von BoNT-Injektionen wird im Fachbereich der Pädiatrie schon seit längerer Zeit zur Behandlung von Spastiken bei Kindern mit infantiler Cerebralparese genutzt. An pädiatrischen Patientenkollektiven konnten in Studien hohe NAb-Prävalenzen von bis zu mehr als 30% unter der Therapie mit BoNT gezeigt werden [69, 70]. Aufgrund dessen wurde beim therapeutischen Einsatz von BoNT bei der Behandlung von Kindern mit infantiler Cerebralparese bereits die Empfehlung ausgesprochen mit möglichst geringen Einzeldosen zu arbeiten, um die Entstehung von NAbS zu vermeiden. Es wurde ebenfalls darüber spekuliert, ob das niedrige Alter der

Patienten zu Beginn der Therapie eine Erklärung für die hohen NAb-Prävalenzen sein könnten [98]. Die Ergebnisse der Regressionsanalyse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass das Patientenalter zu Beginn der Therapie, im Gegensatz zur verwendeten Einzeldosis, kein relevanter Einflussfaktor auf die Entstehung von NAb ist (siehe Kapitel 3.4). Somit kann die Empfehlung Kindern mit niedrigen Dosierungen zu behandeln durch die Ergebnisse dieser Arbeit möglicherweise unterstützt werden, wobei erwähnt werden muss, dass es sich bei den von uns eingeschlossenen SPAS-Patienten um Erwachsene und nicht um Kinder handelte. Um das Problem hoher NAb-Prävalenzen in pädiatrischen Patientenkollektiven mit größerer Gewissheit bewerten zu können sollten größere Studien mit dem Fokus auf Kinder und junge Erwachsene unter BoNT-Injektionstherapie durchgeführt werden.

Interessanterweise stehen die hohen NAb-Prävalenzen bei Kindern mit infantiler Cerebralparese im Widerspruch zu den bisher gezeigten Prävalenzwerten von erwachsenen SPAS-Patienten unter BoNT-Therapie. In einer Metaanalyse von Fabbri et al wurden sieben Publikationen mit Daten zur Prävalenz von NAb bei erwachsenen Patienten mit Spastik nach einem Schlaganfall analysiert. Drei dieser Publikationen arbeiteten mit Patientenkollektiven, welche sich aus sekundären Therapieversagern zusammensetzten, vier der sieben Publikationen mit Therapieansprechern. In letzterer Gruppe zeigte sich eine NAb-Prävalenz von 0,7%, in der Gruppe der Therapieversager eine Prävalenz von 75,9% [65]. Die scheinbar niedrige Antigenität in der Behandlung von erwachsenen SPAS-Patienten wurde schon des Öfteren in der Vergangenheit beschrieben [67]. Diese Annahme steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Müller et al, welche eine Prävalenz von NAb von 12% an 42 erwachsenen SPAS-Patienten (bei einer durchschnittlichen Behandlungsdauer von 4,5 Jahren) zeigen konnten [99]. In der vorliegenden Arbeit lag die NAb-Prävalenz in der SPAS-Subgruppe bei 15,15% (bei einer durchschnittlichen Behandlungsdauer von 3,22 Jahren), was einer Inzidenz von 4,7% pro Jahr entspricht. Die vorliegenden Ergebnisse untermauern also, dass die Entstehung von NAb auch in der Therapie von erwachsenen SPAS-Patienten nicht vernachlässigt werden sollte, da die Prävalenzwerte mindestens genauso hoch zu sein scheinen, wie in der CD-Subgruppe. Entscheidend sind auch hier wieder die hohen durchschnittlichen Injektionsdosen, welche bei der Behandlung von SPAS-Patienten verwendet worden sind (durchschnittliche Einzeldosis in der SPAS-Subgruppe in der vorliegenden Arbeit: 957 uDU, zum Vergleich in der CD-Subgruppe: 641 uDU).

Unter erneuter Berücksichtigung des bereits mehrfach beschriebenen Zusammenhangs zwischen der verwendeten Injektionsdosis und der Entstehung von NAbs überraschen die vorliegenden Ergebnisse also nicht. Analog zu den Anmerkungen von Herrmann et al [98] sollte der Therapiegrundsatz möglichst niedrige BoNT-Dosierungen zu verwenden also möglicherweise auch in der Behandlung von erwachsenen Spastik Patienten in Betracht gezogen werden.

#### **4.2.5 FHS- Subgruppe**

In der vorliegenden Arbeit konnte in der, aus 47 Patienten bestehenden, FHS-Subgruppe kein einziger Patient mit NAbs nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass die durchschnittlich verwendete Einzeldosis in dieser Subgruppe im Vergleich mit den anderen Indikations-Subgruppen, die mit Abstand niedrigste war. So wurden in der FHS-Subgruppe durchschnittliche Einzeldosen von 82 uDU verwendet, im Vergleich dazu lag die ebenfalls niedrige durchschnittliche Einzeldosis in der BSP-Subgruppe immerhin bei 112 uDU. Auch in diesem Zusammenhang muss erneut auf den relevanten Einfluss der verwendeten Einzeldosis bei der Entstehung von NAbs unter BoNT-Therapie aufmerksam gemacht werden. Nichtsdestotrotz konnten in anderen Studien im Gegensatz zu unseren Ergebnissen auch bei FHS-Patienten NAbs nachgewiesen werden. Exemplarisch soll erneut die Arbeit von Lange et al genannt werden. In dieser wurde eine Prävalenz von 38% bei insgesamt 16 eingeschlossenen FHS-Patienten beschrieben [79]. Wie oben schon erwähnt lässt sich diese hohe Prävalenz wohl vor allem durch den selektierten Einschluss von Patienten mit STF erklären. Die vorliegende Arbeit liefert somit wahrscheinlich auch für die FHS-Subgruppe einen realitätsnahen Eindruck zur Einschätzung durchschnittlicher NAb-Prävalenzen, da keine Selektion vorgenommen worden ist.

### **4.3 Einflussfaktoren auf die Entstehung von NAbs:**

Generell stellen repetitive Injektionen eines Proteingemisches, wie BoNT eines ist, ein Risiko für die Entstehung von AK dar [59]. Bei der klinischen Anwendung von BoNT kann es zur Bildung von AK gegen verschiedene Proteine kommen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Entstehung von AK gegen therapeutisch relevante Proteine des Toxins untersucht. Man spricht in diesem Zusammenhang von NAbs, also potentiell den Therapieerfolg beeinflussende AK [6]. Um dieses Risiko einschätzen und minimieren zu können, wurden in der Vergangenheit bereits häufig mögliche Einflussfaktoren auf die

Bildung von NAbS unter einer Therapie mit BoNT untersucht. Die bisherigen Studien konnten diverse Risikofaktoren für die Entstehung von NAbS herausarbeiten. Das Intervall zwischen repetitiven Injektionen, die verwendete Dosis und die Anwendung von Booster-Injektionen wurden in zahlreichen Studien als relevanteste Einflussfaktoren identifiziert [65, 68, 76, 79, 86, 96]. Ebenfalls diskutiert wird weiterhin der Einfluss der verwendeten BoNT-Formulierung [100, 101]. In der vorliegenden Arbeit hatten die Einflussfaktoren Einzeldosis pro Injektion, das verwendete Präparat (mit in Kapitel 3.4 beschriebener Zensur) und die kumulative Lebenszeit-Dosis (ohne in Kapitel 3.4 beschriebene Zensur) einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Entstehung von NAbS (siehe Kapitel 3.4).

#### **4.3.1 Einflussfaktor verwendetes Präparat**

Frevert et al und Hefter et al [100, 101] legten in ihren Arbeiten bereits den Verdacht nahe, dass die Bildung von NAbS durch die verwendete BoNT-Formulierung beeinflusst werden könnte. Dem Präparat inco-BoNT-A (Xeomin®) wurde in diesem Zusammenhang aufgrund des Fehlens von Komplexproteinen eine geringere Antigenität zugesagt. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Hypothese zumindest bestärkt werden. In der Regressionsanalyse zur Ermittlung der Einflussfaktoren auf die Bildung von NAbS konnte das verwendete Präparat als Haupteinflussfaktor ermittelt werden (nach Zensur der mit ona- und abo-BoNT-A behandelten Patienten, siehe Kapitel 3.4). Die Tatsache, dass kein mit inco-BoNT-A behandelter Patient einen positiven NAb-Status zeigte, während die mit ona- oder abo-BoNT-A behandelte Patienten ähnliche NAb-Prävalenzen aufwiesen, legt die Vermutung nahe, dass das Präparat inco-BoNT-A eine niedrigere Antigenität aufweisen könnte. Nichtsdestotrotz sollten unsere Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden, da die Behandlungsdauer der eingeschlossenen, mit inco-BoNT-A behandelten Patienten, deutlich niedriger war als in den anderen beiden Präparat-Subgruppen. Interessant in diesem Zusammenhang war, dass ohne Zensur der langzeitbehandelten Patienten mit ona- und abo-BoNT-A der Einfluss des gewählten Präparates seine statistische Signifikanz verlor und die kumulative Lebenszeit-Dosis zum statistisch signifikanten Einflussfaktor wurde.

In anderen Arbeiten, exemplarisch von Fabbri et al und Lange et al [65, 79] konnte kein signifikanter Unterschied bei der Entstehung von NAbS zwischen den verschiedenen verwendeten Präparaten festgestellt werden. Das Thema, ob mit inco-BoNT-A (Xeomin®) bereits ein weniger immunogenes Präparat vorliegt, das möglicherweise in

der Behandlung von sekundären Therapieversagern eine große Rolle spielen könnte bzw. zum bevorzugten Einsatz kommen könnte, um STF zu vermeiden, bleibt kontrovers. Aufgrund der immensen klinischen Relevanz wären zu dieser Thematik größere Studien wünschenswert, um in Zukunft eine verlässlichere Antwort auf die Frage, ob es unter Langzeittherapie mit inco-BoNT-A tatsächlich zu einem verminderten Auftreten von NAbs kommt als unter Therapie mit den anderen verfügbaren Präparaten, geben zu können.

### **4.3.2 Einflussfaktor Einzeldosis pro Injektion**

In der Analyse der Einflussfaktoren auf die Bildung von NAbs fiel auf, dass sich die beiden Subgruppen BSP und FHS bezüglich der Therapiedauer nicht wesentlich von der CD-Subgruppe unterschieden. Alle drei Subgruppen wiesen eine durchschnittliche Behandlungsdauer von über fünf Jahren auf (siehe Tabelle 2 und Abb. 6). Beim Vergleich der BSP- und FHS-Subgruppen mit der CD-Subgruppe fielen jedoch die signifikant niedrigeren verwendeten Einzeldosen pro Injektion auf. So lag die durchschnittliche Einzeldosis in der FHS-Subgruppe bei 82 uDU, in der BSP-Subgruppe bei 112 uDU und in der CD-Subgruppe bei 641 uDU. Unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.4 genannten Ergebnisse unsere Regressionsanalyse überraschte die deutlich geringe Prävalenz von NAbs in der BSP und FHS-Subgruppe folglich nicht. Hier zeigte sich der enge Zusammenhang zwischen der durchschnittlich verwendeten Einzeldosis und der Entstehung von NAbs besonders eindrücklich. Besonders hervorzuheben ist, dass die verwendete Einzeldosis in der Regressionsanalyse sowohl mit, als auch ohne Zensur der Patienten unter Langzeittherapie mit ona- und abo-BoNT-A, als relevanter Einflussfaktor auf die Entstehung von NAbs nachgewiesen werden konnte. In der SPAS-Subgruppe, in welcher die höchsten durchschnittlich verwendeten Einzeldosen pro Injektion zum Einsatz kamen (957 uDU), kam es daher auch bei kürzerer durchschnittlicher Therapiedauer (durchschnittlich lediglich 3,22 Jahre, im Vergleich dazu lag die durchschnittliche Therapiedauer sowohl in der CD-, als auch in der BSP- und FHS-Subgruppe bei über 5 Jahren) zu einer vergleichbar hohen Prävalenz von NAbs wie in der CD-Subgruppe. Diese Ergebnisse, welche eine Dosisabhängigkeit bei der Entstehung von NAbs suggerieren, konnten die Erkenntnisse zahlreicher Studien bestätigen, in denen der Zusammenhang zwischen der Verwendung hoher Einzeldosen und einem erhöhten Risiko für die Entstehung von NAbs bereits beschrieben worden ist [75, 78, 96, 97].

Um diese Dosisabhängigkeit nochmals zu verdeutlichen, wurden die eingeschlossenen Patienten in unserer statistischen Analyse in verschiedene Dosis-Subgruppen unterteilt (0-350 uDU, 351-700 uDU, >700 uDU, siehe auch Kapitel 3.3). Es konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit NABs zu entwickeln bei durchschnittlichen Einzeldosen von mehr als 350 uDU höher lag als bei durchschnittliche Einzeldosen von unter 350 uDU. In der Hochdosis-Subgruppe (>700 uDU) konnte die höchste Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden NABs zu entwickeln. Diese Ergebnisse bestärken bereits bestehende Empfehlungen die verwendeten Einzeldosen während einer Langzeittherapie mit BoNT möglich gering zu halten, um der Entstehung von NABs vorzubeugen.

### **4.3.3 Einflussfaktor Injektionsintervall**

In bisherigen Studien konnte, wie oben bereits erwähnt, das Intervall zwischen den repetitiven Injektionen als einer der relevantesten Einflussfaktoren auf die Entstehung von NABs herausgearbeitet werden [65, 68, 76, 79, 86, 96]. Zu dieser Fragestellung ließ sich auf der Basis unserer Daten keine Aussage treffen, da das Intervall zwischen den Injektionen in unserem Patientenkollektiv konstant war und in einem Zeitraum von 12 bis 13 Wochen lag. Die standardisierten Injektionsintervalle lassen sich dadurch erklären, dass es sich bei den eingeschlossenen Patienten um ein Kollektiv aus einem klinischen Behandlungsszenario (Botulinumtoxin-Ambulanz der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Düsseldorf) handelte. Bisherige Studienergebnisse und Empfehlungen wurden in den Behandlungsschemata bereits berücksichtigt und umgesetzt. Die somit gegebene Standardisierung der Injektionsintervalle hatte den Vorteil, dass wir bei unseren Ergebnissen den Einfluss inkonstanter Intervalle zwischen den Injektionen als möglichen Störfaktor ausschließen konnten.

### **4.3.4 Einflussfaktoren Behandlungsdauer und kumulative Lebenszeitdosis**

Beim Vergleich von NAB-Prävalenzen verschiedener Studien fällt auf, dass die angegebenen Werte extrem schwanken und je nach Studie und untersuchtem Kollektiv zwischen 0,5% [66] und über 30% [69] liegen. Auffällig in diesem Zusammenhang ist, dass Studien, welche niedrige Prävalenzwerte angeben, häufig mit einer kurzen Untersuchungs- bzw. Behandlungs-Dauer vergesellschaftet sind. Exemplarisch soll hier auf die Metaanalyse von Naumann et al [66] eingegangen werden, in welcher indikationsübergreifende NAB-Prävalenzen von 0,5% angegeben worden sind. Die 2240

untersuchten Patienten erhielten durchschnittlich lediglich 3,8 Behandlungen. Bei üblichen Interinjektionsintervallen von 3-4 Monaten beträgt die Behandlungsdauer somit nur ungefähr ein Jahr. Ebenso zeigte eine Arbeit von Yablon et al [53] an einem Patientenkollektiv bestehend aus SPAS-Patienten sehr geringe NAb-Prävalenzen von 0,5%. Auch hier wurden vor allem Patienten mit sehr kurzer Behandlungsdauer (zwischen einer bis vier BoNT-Injektionen über 12 bis 42 Wochen) untersucht. Im Gegensatz dazu konnten beispielsweise in einer Arbeit von Hefter et al [68] in einem Patientenkollektiv, welches aus CD-Patienten bestand, NAb-Prävalenzen im Bereich von fast 15% nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass die durchschnittliche Behandlungsdauer in dem hierbei untersuchten Kollektiv bei fast 12 Jahren lag.

In der Regressionsanalyse unserer Daten wurde sowohl der Einflussfaktor kumulative Lebenszeitdosis als auch der Einflussfaktor Behandlungsdauer in Bezug auf die Entstehung von NAb untersucht. Hierbei kam es zu einem interessanten Ergebnis: Nach Zensur der Patienten unter Langzeittherapie mit ona- und abo-BoNT-A aufgrund der fehlenden Lizenzierung von inco-BoNT-A bis 2005 bzw. 2010 hatte die kumulative Lebenszeitdosis keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Bildung von NAb, jedoch das verwendete Präparat. Ohne diese Zensur konnte jedoch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der kumulativen Lebenszeitdosis und der Entstehung von NAb nachgewiesen werden. Für die Behandlungsdauer konnte trotz der Korrelation mit der kumulativen Lebenszeitdosis kein signifikanter Einfluss auf die Bildung von NAb nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass unter den mit inco-BoNT-A behandelten Patienten kein einziger Patient mit NAb nachgewiesen werden konnte, bei jedoch deutlich kürzerer Behandlungsdauer als bei den mit ona- oder abo-BoNT-A behandelten Patienten.

Generell scheint es beim Vergleich unterschiedlicher NAb-Prävalenzen in verschiedenen Studien durchaus relevant zu sein, auf eine ausreichend repräsentative Therapiedauer zu achten, wenn man die Erkenntnisse im klinischen Alltag anwenden möchte. Es gilt zu bedenken, dass nur Studien, in denen eine ausreichend lange Behandlungsdauer bzw. eine ausreichend hohe kumulative Lebenszeitdosis berücksichtigt worden ist, eine Aussage über mögliche Prävalenzen von NAb in einem realitätsnahen Patientenkollektiv unter BoNT-Langzeittherapie erlauben.

### **4.3.5 Einflussfaktor Krankheitsbild**

Beim Vergleich von NAb-Prävalenzen verschiedener Krankheitsbilder fällt auf, dass die Rate NAb-positiver Patienten in aus CD-Patienten bestehenden Kollektiven oft höher liegt als bei anderen untersuchten Indikationen [65, 67]. Es könnte die Vermutung aufgestellt werden, dass bei der BoNT-Therapie von CD-Patienten ein höheres Risiko für die Entstehung von NAbs besteht als bei der Behandlung von anderen Krankheitsbildern. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass wiederholte Injektion in die Halsmuskulatur in direkter Nachbarschaft zu den großen zervikalen Lymphknotenstationen eine stärkere Immunreaktion auslösen könnten als Injektionen in die Extremitäten, da die nächsten Lymphknoten hier weiter entfernt liegen [2]. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Hypothese jedoch nicht bestärkt werden. Es konnte kein signifikanter Einfluss des behandelten Krankheitsbildes auf die Entstehung von NAbs nachgewiesen werden. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz von NAbs in den beiden Subgruppen CD und SPAS vergleichbar hoch war. Beim Vergleich der beiden Subgruppen CD und SPAS muss jedoch auf die deutlich geringere Patientenzahl in der SPAS-Subgruppe aufmerksam gemacht werden. Auf Grundlage der aktuellen Daten lässt sich somit die Vermutung aufstellen, dass die zugrunde liegende Indikation und die dadurch gewählte Lokalisation der BoNT-Injektion keinen relevanten Einfluss auf die Entstehung von NAbs hat. Um diese Vermutung zu bestätigen wären jedoch größere Patientenzahlen in der SPAS-Subgruppe notwendig und für die Zukunft wünschenswert.

## **5 Zusammenfassung/Fazit:**

Abschließend sollen nochmals die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kurz zusammengefasst und mit den relevanten Fragestellungen (Kapitel 2.5) in Zusammenhang gebracht werden. Ebenfalls soll ein kurzes, für den klinischen Einsatz möglicherweise relevantes Fazit, welches sich aus den aktuellen Ergebnissen ergibt, gezogen werden.

Im gesamten, unselektionierten Patientenkollektiv konnten bei 83 von 596 Patienten NAbs nachgewiesen werden, was einer Prävalenz von 13,9% entspricht. Eines der wichtigsten Ziele dieser Arbeit war es, die relevanten Einflussfaktoren auf die Entstehung von NAbs unter BoNT-Langzeittherapie zu bestimmen. Mittels der binären

Regressionsanalyse konnte für folgenden Einflussfaktoren ein statistisch signifikanter Zusammenhang ermittelt werden:

- Die durchschnittliche Einzeldosis pro Injektion
- Das verwendete Präparat (mit in Kapitel 3.4 beschriebener Zensur)
- Die kumulative Lebenszeitdosis (ohne in Kapitel 3.4 beschriebene Zensur)

Alle anderen untersuchten Faktoren, wie die Behandlungsdauer, das Alter zu Beginn der Therapie oder das behandelte Krankheitsbild hatten in unserer Analyse keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Entstehung von NABs.

Ebenfalls sollten die Prävalenzen von NABs in den verschiedenen Indikations-Subgruppen untereinander verglichen werden. Hierbei ließ sich feststellen, dass in den Subgruppen, welche mit hohen durchschnittlichen Einzeldosen pro Injektion behandelt worden sind (CD, SPAS, ODT) hohe NAB-Prävalenzen auftraten, während in Subgruppen, in denen niedrige Einzeldosen zum Einsatz gekommen sind (BSP, FHS) niedrige NAB-Prävalenzen auftraten.

Des Weiteren sollten verschiedene Fragestellung (siehe Kapitel 2.5) beantwortet werden. Die erste Frage, ob die Verwendung von hohen Einzeldosen hohe NAB-Prävalenzen zur Folge hat, lässt sich durch die Ergebnisse der Regressionsanalyse, sowie die Tatsache, dass die höchsten NAB-Prävalenzen in den Subgruppen mit den höchsten verwendeten Einzeldosen auftraten, beantworten.

Bezüglich der zweiten Frage lässt sich festhalten, dass in den Subgruppen, die hohe Injektionsdosen erhalten haben (CD, SPAS, ODT) das Auftreten von NABs, im Vergleich zu den Subgruppen, welche niedrige Einzeldosen erhalten haben (FHS, BSP), signifikant erhöht war.

Die dritte Frage, ob in den bisher wenig untersuchten Patientengruppen ODT und SPAS ähnlich hohe NAB-Prävalenzen wie in der CD-Subgruppe auftreten, lässt sich auf Grundlage der aktuellen Daten bejahen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Frage zu beantworten, ob insbesondere das verwendete Präparat und das behandelte Krankheitsbild relevante Einflussfaktoren auf die Bildung von NABs darstellen. Die Analyse des Einflussfaktors verwendetes Präparat lieferte ein interessantes Ergebnis. Nach oben erwähnter Zensur (Kapitel 3.4) konnte ein zunächst signifikanter Zusammenhang zwischen dem verwendeten Präparat und der Entstehung von NABs nachgewiesen werden. Ohne die Zensur jedoch ging dieser signifikante Zusammenhang verloren. Somit kann auf Grundlage der vorliegenden Daten der Einfluss des verwendeten Präparates auf die Entstehung von NABs statistisch nicht

abschließend nachvollzogen werden. Die Tatsache, dass jedoch kein mit inco-BoNT-A behandelter Patient einen positiven NAb-Status aufwies, könnte auf eine, bereits vermutete, geringere Antigenität des Präparates hinweisen [100, 101]. Das behandelte Krankheitsbild hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Entstehung von NAbs.

Im Umgang mit Patienten, die sich in einer Langzeitbehandlung mit BoNT befinden, könnte aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit folgendes Fazit gezogen werden: Als wichtiger Einflussfaktor auf die Entstehung von NAbs bestätigte sich die verwendete Einzeldosis pro Injektion (in der Regressionsanalyse mit und ohne in Kapitel 3.4 beschriebene Zensur). Für den klinischen Einsatz kann, unabhängig von der Behandlungsindikation, der Grundsatz bestärkt werden eine möglichst geringe, noch effektive Injektions-Dosis zu wählen. Die Berücksichtigung dieses Grundsatzes könnte das Risiko der Entstehung von NAbs während einer BoNT-Langzeittherapie verhindern und somit eventuell auch dem Auftreten eines STF vorbeugen. Vor allem im Behandlungsfeld der Spastiken, in dem der aktuelle Trend zur Verwendung von hohen Einzeldosen geht, sollte man sich der möglichen Konsequenzen bewusst sein. Auch wenn anhand der vorliegenden Ergebnisse keine Aussage über den Einfluss der Inter-Injektionsintervalle getroffen werden kann, ist im Hinblick auf die bisherige Datenlage weiterhin zu empfehlen die Abstände zwischen den Injektionen so lang wie möglich zu halten. Ebenfalls sollte es zumindest in Betracht gezogen werden, Patienten, welche als besonders gefährdet angesehen werden NAbs zu produzieren und dadurch möglicherweise ein STF zu entwickeln, mit inco-BoNT-A zu behandeln, wenngleich die aktuellen Ergebnisse bezüglich einer möglicherweise geringeren Antigenität im Vergleich zu den anderen verfügbaren Präparaten keine abschließende Aussage erlauben.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Rossetto, O., M. Pirazzini, and C. Montecucco, *Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(8): p. 535-49.
2. Pirazzini, M., et al., *Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology*. Pharmacol Rev, 2017. **69**(2): p. 200-235.
3. Kerner, J., *Vergiftung durch verdorbene Würste*. Tübinger Blätter für Naturwissenschaften und Arzneykunde, 1817. **3**(1): p. 25.
4. Scott, A.B., *Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery*. Ophthalmology, 1980. **87**(10): p. 1044-9.
5. Jankovic, J., *Botulinum toxin: State of the art*. Mov Disord, 2017. **32**(8): p. 1131-1138.
6. Dressler, D. and H. Bigalke, *Immunological aspects of botulinum toxin therapy*. Expert Review of Neurotherapeutics, 2017. **17**(5): p. 487-494.
7. Escher, C.M., et al., *Botulinum toxin in the management of chronic migraine: clinical evidence and experience*. Ther Adv Neurol Disord, 2017. **10**(2): p. 127-135.
8. Petracca, M., et al., *Botulinum Toxin A and B in sialorrhea: Long-term data and literature overview*. Toxicon, 2015. **107**(Pt A): p. 129-40.
9. Kerner, J.A.C., *Neue Beobachtungen über die in Württemberg so häufig vorkommenden tödtlichen Vergiftungen durch den Genuß geräucherter Würste*. 1820: Osiander.
10. Van Ermengem, E., *Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus*. 1897: Veit.
11. Landmann, G., *Ueber die Ursache der Darmstadter Bohnen Vergiftung*. Hyg Rundsch, 1904. **14**: p. 449-452.
12. Leuchs, J., *Beiträge zur Kenntnis des Toxins und Antitoxins des Bacillus botulinus*. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, 1910. **65**(1): p. 55-84.
13. Bengtson, I.A., *Preliminary note on a toxin-producing anaerobe isolated from the larvae of Lucilia caesar*. Public Health Reports (1896-1970), 1922: p. 164-170.
14. Meyer, K. and J. Gunnison, *South African Cultures of Clostridium botulinum and parobotulinum. XXXVII: With a Description of Cl. botulinum Type D, n. sp.* The Journal of Infectious Diseases, 1929: p. 106-118.
15. Seddon, H., *Bulbar paralysis in cattle due to the action of a toxicogenic bacillus, with a discussion on the relationship of the condition to forage poisoning (botulism)*. Journal of Comparative Pathology and Therapeutics, 1922. **35**: p. 147-190.
16. BURGEM, A.S., F. DICKENS, and L.J. ZATMAN, *The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction*. J Physiol, 1949. **109**(1-2): p. 10-24.
17. SCOTT, A.B., A. ROSENBAUM, and C.C. COLLINS, *Pharmacologic weakening of extraocular muscles*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1973. **12**(12): p. 924-927.
18. Pape H, Kurtz A, Silbernagl S et al., Hrsg. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2014. doi:10.1055/b-002-98019, Kapitel Membranpotenzial und Signalübertragung in Zellverbänden
19. Dressler, D., *[Pharmacological aspects of therapeutic botulinum toxin preparations]*. Nervenarzt, 2006. **77**(8): p. 912-21.
20. Baldwin, M.R. and J.T. Barbieri, *Association of botulinum neurotoxins with synaptic vesicle protein complexes*. Toxicon, 2009. **54**(5): p. 570-4.
21. Hallett, M., *One man's poison--clinical applications of botulinum toxin*. N Engl J Med, 1999. **341**(2): p. 118-20.
22. Singh, B.R., *Botulinum neurotoxin structure, engineering, and novel cellular trafficking and targeting*. Neurotox Res, 2006. **9**(2-3): p. 73-92.
23. de Paiva, A., et al., *Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 3200-5.
24. Aoki, K.R., *Pharmacology and immunology of botulinum toxin serotypes*. J Neurol, 2001. **248** Suppl 1: p. 3-10.

25. Simpson, L.L., *Botulinum toxin: potent poison, potent medicine*. Hosp Pract (1995), 1999. **34**(4): p. 87-91; quiz 163.
26. Brashear, A., *Botulinum toxin type A in the treatment of patients with cervical dystonia*. Biologics, 2009. **3**: p. 1-7.
27. Frevert, J., *Xeomin is free from complexing proteins*. Toxicon, 2009. **54**(5): p. 697-701.
28. Jinnah, H.A., et al., *Botulinum toxin treatment failures in cervical dystonia: causes, management, and outcomes*. J Neurol, 2016. **263**(6): p. 1188-94.
29. Takamizawa, K., et al., *TLC immunostaining characterization of Clostridium botulinum type A neurotoxin binding to gangliosides and free fatty acids*. FEBS Lett, 1986. **201**(2): p. 229-32.
30. Lange, D.J., et al., *Distant effects of local injection of botulinum toxin*. Muscle Nerve, 1987. **10**(6): p. 552-5.
31. Dressler, D. and R. Benecke, *Autonomic side effects of botulinum toxin type B treatment of cervical dystonia and hyperhidrosis*. Eur Neurol, 2003. **49**(1): p. 34-8.
32. Erbguth, F., et al., *Systemic effect of local botulinum toxin injections unmasks subclinical Lambert-Eaton myasthenic syndrome*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1993. **56**(11): p. 1235-6.
33. Ramirez-Castaneda, J. and J. Jankovic, *Long-term efficacy, safety, and side effect profile of botulinum toxin in dystonia: a 20-year follow-up*. Toxicon, 2014. **90**: p. 344-8.
34. Colosimo, C., D. Tiple, and A. Berardelli, *Efficacy and safety of long-term botulinum toxin treatment in craniocervical dystonia: a systematic review*. Neurotox Res, 2012. **22**(4): p. 265-73.
35. Naumann, M. and J. Jankovic, *Safety of botulinum toxin type A: a systematic review and meta-analysis*. Curr Med Res Opin, 2004. **20**(7): p. 981-90.
36. Albanese, A., et al., *Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update*. Mov Disord, 2013. **28**(7): p. 863-73.
37. Schmidt, A., et al., *[Dystonia]*. Nervenarzt, 2008. **79 Suppl 2**: p. 53-63; quiz 64-5.
38. Defazio, G., et al., *Epidemiology of primary dystonia*. Lancet Neurol, 2004. **3**(11): p. 673-8.
39. Brashear, A., *The botulinum toxins in the treatment of cervical dystonia*. Semin Neurol, 2001. **21**(1): p. 85-90.
40. Phukan, J., et al., *Primary dystonia and dystonia-plus syndromes: clinical characteristics, diagnosis, and pathogenesis*. Lancet Neurol, 2011. **10**(12): p. 1074-85.
41. Jankovic, J., et al., *Cervical dystonia: clinical findings and associated movement disorders*. Neurology, 1991. **41**(7): p. 1088-91.
42. Steeves, T.D., et al., *The prevalence of primary dystonia: a systematic review and meta-analysis*. Mov Disord, 2012. **27**(14): p. 1789-96.
43. Albanese, A., et al., *EFNS guidelines on diagnosis and treatment of primary dystonias*. Eur J Neurol, 2011. **18**(1): p. 5-18.
44. Bressman, S.B., *Dystonia update*. Clin Neuropharmacol, 2000. **23**(5): p. 239-51.
45. Duvoisin, R.C., *Spasmodic torticollis: the role of surgical denervation*. Mayo Clin Proc, 1991. **66**(4): p. 433-5.
46. Hung, S.W., et al., *Long-term outcome of bilateral pallidal deep brain stimulation for primary cervical dystonia*. Neurology, 2007. **68**(6): p. 457-9.
47. Colosimo, C., et al., *Craniocervical dystonia: clinical and pathophysiological features*. Eur J Neurol, 2010. **17 Suppl 1**: p. 15-21.
48. Rosenstengel, C., et al., *Hemifacial spasm: conservative and surgical treatment options*. Dtsch Arztebl Int, 2012. **109**(41): p. 667-73.
49. Wang, A. and J. Jankovic, *Hemifacial spasm: clinical findings and treatment*. Muscle Nerve, 1998. **21**(12): p. 1740-7.
50. Knecht, S., S. Hesse, and P. Oster, *Rehabilitation after stroke*. Dtsch Arztebl Int, 2011. **108**(36): p. 600-6.
51. Sommerfeld, D.K., et al., *Spasticity after stroke: its occurrence and association with motor impairments and activity limitations*. Stroke, 2004. **35**(1): p. 134-9.

52. Dietz, V., [*Clinical treatment of spasticity--spastic movement disorders*]. *Nervenarzt*, 2013. **84**(12): p. 1508-11.
53. Yablon, S.A., et al., *Formation of neutralizing antibodies in patients receiving botulinum toxin type A for treatment of poststroke spasticity: a pooled-data analysis of three clinical trials*. *Clin Ther*, 2007. **29**(4): p. 683-90.
54. Turkel, C.C., et al., *Pooled analysis of the safety of botulinum toxin type A in the treatment of poststroke spasticity*. *Arch Phys Med Rehabil*, 2006. **87**(6): p. 786-92.
55. Brashear, A., et al., *Intramuscular injection of botulinum toxin for the treatment of wrist and finger spasticity after a stroke*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(6): p. 395-400.
56. Koman, L.A., B.P. Smith, and J.S. Shilt, *Cerebral palsy*. *Lancet*, 2004. **363**(9421): p. 1619-31.
57. Kukreja, R.V. and B.R. Singh, *Comparative role of neurotoxin-associated proteins in the structural stability and endopeptidase activity of botulinum neurotoxin complex types A and E*. *Biochemistry*, 2007. **46**(49): p. 14316-24.
58. Wang, L., et al., *Type A botulinum neurotoxin complex proteins differentially modulate host response of neuronal cells*. *Toxicon*, 2014. **82**: p. 52-60.
59. Dressler, D., *Clinical presentation and management of antibody-induced failure of botulinum toxin therapy*. *Mov Disord*, 2004. **19 Suppl 8**: p. S92-S100.
60. Siatkowski, R.M., et al., *Serum antibody production to botulinum A toxin*. *Ophthalmology*, 1993. **100**(12): p. 1861-6.
61. Schellekens, H., *Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins*. *Nephrol Dial Transplant*, 2005. **20 Suppl 6**: p. vi3-9.
62. Dressler, D. and H. Bigalke, *Botulinum toxin antibody type A titres after cessation of botulinum toxin therapy*. *Mov Disord*, 2002. **17**(1): p. 170-3.
63. Dressler, D., L. Pan, and F. Adib Saberi, *Antibody-induced failure of botulinum toxin therapy: re-start with low-antigenicity drugs offers a new treatment opportunity*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2018. **125**(10): p. 1481-1486.
64. Critchfield, J., *Considering the immune response to botulinum toxin*. *Clin J Pain*, 2002. **18**(6 Suppl): p. S133-41.
65. Fabbri, M., et al., *Neutralizing Antibody and Botulinum Toxin Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis*. *Neurotox Res*, 2016. **29**(1): p. 105-17.
66. Naumann, M., et al., *Meta-analysis of neutralizing antibody conversion with onabotulinumtoxinA (BOTOX(R)) across multiple indications*. *Mov Disord*, 2010. **25**(13): p. 2211-8.
67. Naumann, M., et al., *Immunogenicity of botulinum toxins*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2013. **120**(2): p. 275-90.
68. Hefter, H., D. Rosenthal, and M. Moll, *High Botulinum Toxin-Neutralizing Antibody Prevalence Under Long-Term Cervical Dystonia Treatment*. *Movement Disorders Clinical Practice*, 2016. **3**(5): p. 500-506.
69. Herrmann, J., et al., *Clinical impact of antibody formation to botulinum toxin A in children*. *Ann Neurol*, 2004. **55**(5): p. 732-5.
70. Koman, L.A., et al., *Botulinum toxin type a neuromuscular blockade in the treatment of equinus foot deformity in cerebral palsy: a multicenter, open-label clinical trial*. *Pediatrics*, 2001. **108**(5): p. 1062-71.
71. Dressler, D., *Clinical features of antibody-induced complete secondary failure of botulinum toxin therapy*. *Eur Neurol*, 2002. **48**(1): p. 26-9.
72. Hsiung, G.Y., et al., *Long-term efficacy of botulinum toxin A in treatment of various movement disorders over a 10-year period*. *Mov Disord*, 2002. **17**(6): p. 1288-93.
73. Bellows, S. and J. Jankovic, *Immunogenicity Associated with Botulinum Toxin Treatment*. *Toxins (Basel)*, 2019. **11**(9).
74. Pirazzini, M., et al., *Primary resistance of human patients to botulinum neurotoxins A and B*. *Ann Clin Transl Neurol*, 2018. **5**(8): p. 971-975.
75. Jankovic, J. and K. Schwartz, *Response and immunoresistance to botulinum toxin injections*. *Neurology*, 1995. **45**(9): p. 1743-6.

76. Greene, P., S. Fahn, and B. Diamond, *Development of resistance to botulinum toxin type A in patients with torticollis*. *Mov Disord*, 1994. **9**(2): p. 213-7.
77. Jankovic, J. and K.S. Schwartz, *Clinical correlates of response to botulinum toxin injections*. *Arch Neurol*, 1991. **48**(12): p. 1253-6.
78. Goschel, H., et al., *Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies--therapeutic consequences*. *Exp Neurol*, 1997. **147**(1): p. 96-102.
79. Lange, O., et al., *Neutralizing antibodies and secondary therapy failure after treatment with botulinum toxin type A: much ado about nothing?* *Clin Neuropharmacol*, 2009. **32**(4): p. 213-8.
80. Kessler, K.R. and R. Benecke, *The EBD test--a clinical test for the detection of antibodies to botulinum toxin type A*. *Mov Disord*, 1997. **12**(1): p. 95-9.
81. Birklein, F. and F. Erbguth, *Sudomotor testing discriminates between subjects with and without antibodies against botulinum toxin A--a preliminary observation*. *Mov Disord*, 2000. **15**(1): p. 146-9.
82. Nestor, M.S. and G.R. Ablon, *The Frontalis Activity Measurement Standard: a novel contralateral method for assessing botulinum neurotoxin type-A activity*. *J Drugs Dermatol*, 2011. **10**(9): p. 968-72.
83. Hanna, P.A. and J. Jankovic, *Mouse bioassay versus Western blot assay for botulinum toxin antibodies: correlation with clinical response*. *Neurology*, 1998. **50**(6): p. 1624-9.
84. Hefter, H., C. Spiess, and D. Rosenthal, *Very early reduction in efficacy of botulinum toxin therapy for cervical dystonia in patients with subsequent secondary treatment failure: a retrospective analysis*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2014. **121**(5): p. 513-9.
85. Mejia, N.I., K.D. Vuong, and J. Jankovic, *Long-term botulinum toxin efficacy, safety, and immunogenicity*. *Mov Disord*, 2005. **20**(5): p. 592-7.
86. Simpson, D.M., et al., *Assessment: Botulinum neurotoxin for the treatment of movement disorders (an evidence-based review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology*. *Neurology*, 2008. **70**(19): p. 1699-706.
87. Frevert, J., *Pharmaceutical, biological, and clinical properties of botulinum neurotoxin type A products*. *Drugs R D*, 2015. **15**(1): p. 1-9.
88. Scaglione, F., *Conversion Ratio between Botox(R), Dysport(R), and Xeomin(R) in Clinical Practice*. *Toxins (Basel)*, 2016. **8**(3).
89. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. *Immunochemistry*, 1971. **8**(9): p. 871-4.
90. Schuurs, A.H. and B.K. van Weemen, *Enzyme-immunoassay: a powerful analytical tool*. *J Immunoassay*, 1980. **1**(2): p. 229-49.
91. Bigalke, H. and A. Rummel, *Botulinum Neurotoxins: Qualitative and Quantitative Analysis Using the Mouse Phrenic Nerve Hemidiaphragm Assay (MPN)*. *Toxins (Basel)*, 2015. **7**(12): p. 4895-905.
92. Habermann, E., F. Dreyer, and H. Bigalke, *Tetanus toxin blocks the neuromuscular transmission in vitro like botulinum A toxin*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1980. **311**(1): p. 33-40.
93. Albrecht, P., et al., *High prevalence of neutralizing antibodies after long-term botulinum neurotoxin therapy*. *Neurology*, 2019. **92**(1): p. e48-e54.
94. Sesardic, D., et al., *Detection of antibodies against botulinum toxins*. *Mov Disord*, 2004. **19 Suppl 8**: p. S85-91.
95. Truong, D.D., et al., *Sustained efficacy and safety of repeated incobotulinumtoxinA (Xeomin((R))) injections in blepharospasm*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2013. **120**(9): p. 1345-53.
96. Kessler, K.R., M. Skutta, and R. Benecke, *Long-term treatment of cervical dystonia with botulinum toxin A: efficacy, safety, and antibody frequency. German Dystonia Study Group*. *J Neurol*, 1999. **246**(4): p. 265-74.
97. Borodic, G., et al., *Botulinum toxin therapy, immunologic resistance, and problems with available materials*. *Neurology*, 1996. **46**(1): p. 26-9.

98. Herrmann, J., et al., *Secondary non-response due to development of neutralising antibodies to botulinum toxin A during treatment of children with cerebral palsy*. *Neuropediatrics*, 2000. **31**(6): p. 333-4.
99. Muller, K., et al., *Prevalence of neutralising antibodies in patients treated with botulinum toxin type A for spasticity*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2009. **116**(5): p. 579-85.
100. Frevert, J. and D. Dressler, *Complexing proteins in botulinum toxin type A drugs: a help or a hindrance?* *Biologics*, 2010. **4**: p. 325-32.
101. Hefter, H., et al., *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. **2**(4).

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Philipp Albrecht und Prof. Dr. Dr. med. Harald Hefter für die hervorragende Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit und ganz besonders für die wirklich außergewöhnliche Geduld.

Des Weiteren möchte ich Dr. med. John-Ih Lee, Dr. Dietmar Rosenthal und Prof. Dr. med. Hans Bigalke meinen Dank äußern, die meine Arbeit durch ihre Unterstützung/Analysen vorangetrieben haben.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Lara Kern und Dr. Armin Scheffler für die kritische Durchsicht und die inspirierenden Anregungen bedanken.

Meinen Eltern danke ich für ihre unendliche Unterstützung während meines Studiums, meiner Arbeit an dieser Dissertation und meiner Assistenzarztzeit.