



SOCIETÀ ITALIANA DI FARMACOLOGIA

# TOSSINA BOTULINICA

Documento a cura di

Prof. Achille Patrizio Caputi

*Professore ordinario di Farmacologia, Direttore, U.O. di Farmacologia Clinica, Azienda Ospedaliera  
Universitaria G. Martino, Messina  
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Messina*

Prof. Francesco Rossi

*Professore ordinario di Farmacologia, Responsabile del Centro di Farmacovigilanza e  
Farmacoepidemiologia della Regione Campania  
Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Farmacologia "L. Donatelli", Seconda Università degli  
Studi di Napoli*

*Approvato dal Consiglio Direttivo SIF*

*25 febbraio 2013*

## TOSSINA BOTULINICA

In questa revisione non saranno prese in esame le specialità di Tossina Botulinica di *Clostridium Botulinum* Tipo A che hanno come indicazione terapeutica quella cosmetica.

### Introduzione

La storia inizia circa due secoli fa, ai primi del 1800, con l'isolamento della tossina botulinica da parte di un medico tedesco, il Dr Justinus Kerner (1786-1862). Nel 1940 la tossina viene purificata e comincia ad essere studiata per il suo potenziale uso farmacologico. Il valore terapeutico della tossina botulinica di tipo A viene riconosciuto nel 1989, quando con il nome commerciale "Oculinum" (successivamente ri-denominato Botox®) viene registrato negli Stati Uniti, da parte dell'FDA (*Food and Drug Administration*), per il trattamento del blefarospasmo associato a distonia e dello strabismo. Da allora, nel corso degli anni, sono state rese commercialmente disponibili differenti formulazioni di tossina botulinica (BT) di Tipo A, autorizzate, in funzione della formulazione, per differenti indicazioni terapeutiche quali il blefarospasmo, l'emispasmo facciale, la distonia cervicale, la spasticità post ictus, il piede equino nella paralisi cerebrale infantile e, più di recente, l'iperidrosi ascellare, l'emigrania cronica e l'incontinenza urinaria di origine neurogena.

La BT è altamente sicura ed efficace, principalmente perché il trattamento è somministrato localmente e a dosaggi molto bassi. La specificità del trattamento è data dall'iniezione locale che riduce, peraltro, l'esposizione sistemica (1).

### Costituzione

La BT, prodotta dal batterio anaerobico *Clostridium botulinum*, è un complesso costituito dalla neurotossina (BNT) e da proteine non tossiche (Figura 1). La neurotossina (BNT) naturale a sua volta consiste di una catena aminoacidica pesante (HC = heavy chain) di 100 kDa e di una catena leggera (LC = light chain) di 50 kDa legate fra loro da un ponte disolfuro. L'integrità di questo legame è essenziale per l'attività del complesso, rendendolo estremamente sensibile ai differenti fattori ambientali. La neurotossina (BNT) e le proteine associate formano una tossina botulinica (BT) con peso molecolare di 450 kDa (2,3). Le preparazioni di tossine botuliniche usate in terapia sono costituite dalla tossina botulinica e da eccipienti.

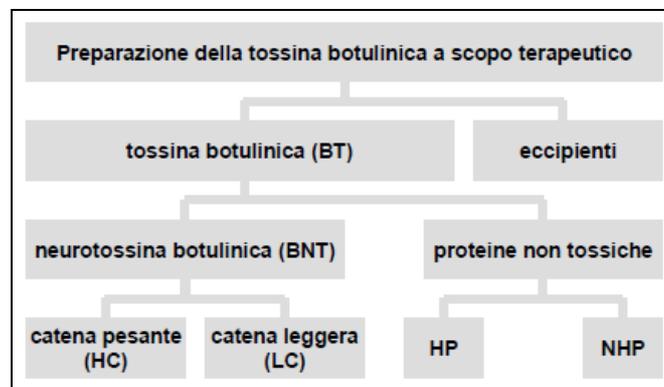


Figura 1. Preparazione della tossina botulinica (2).

Esistono 7 sierotipi di BT (A, B, C, D, E, F e G), ognuno dei quali possiede ulteriori sottotipi (es. il sottotipo A contiene 4 sottotipi distinti). Tutti i sierotipi hanno una struttura chimica simile e sono neurotossine, ad eccezione del sottotipo C2. Ogni tossina botulinica è inizialmente sintetizzata come prodotto di 150 kDa, ma l'attività biologica necessita di una proteolisi post-translazionale che scinde il polipeptide in due porzioni separate, rispettivamente di 100 kDa (catena pesante) e 50 kDa (catena leggera), che restano legate in maniera covalente fra loro da un singolo ponte disolfuro.

La BT-A esiste in natura come complesso costituito da un rivestimento di protezione di proteine cataliticamente inattive, chiamate nell'insieme "proteine associate alla neurotossina" (NAPs, neurotoxin-associated proteins). Le NAPs sono un insieme di 5 proteine, di cui 4 diverse emoagglutinine (HP, hemagglutinating proteins) ed una non emoagglutinina (NHP, non-hemagglutinating protein). Sono sintetizzate dal *Clostridium* e difendono la neurotossina dalla possibile distruzione da parte della attività gastrica dello stomaco (4-6).

Due tossine botuliniche associate ad un dimero formano una molecola con peso molecolare di 900 kDa (2,3). Tra le varie tossine solo quella contenuta nella specialità Botox® presenta la costituzione più simile al *Clostridium* prodotto in natura.

## Meccanismo d'azione

La tossina botulinica agisce pre-sinapticamente bloccando la liberazione del neurotrasmettitore acetilcolina a livello della giunzione neuromuscolare (7,8). Tre tappe sono coinvolte in questa inibizione (9): la prima in cui la tossina si lega rapidamente ed irreversibilmente all'accettore sulla superficie pre-sinaptica del nervo, la seconda in cui la tossina attraversa il plasmalemma ed entra nella terminazione nervosa (internalizzazione), la terza che disabilita il meccanismo di rilascio della acetilcolina (Figura 2).

### *Legame all'accettore*

La catena leggera della BT riconosce uno specifico accettore sulle pre-sinapsi delle terminazioni nervose colinergiche, legandovisi. Accettori per le BT sono presenti su tutti i neuroni colinergici e ciascun sierotipo si lega ad un suo specifico accettore, senza inibire il legame di altri sierotipi al proprio specifico accettore.

### *Internalizzazione*

Una volta legatosi all'accettore l'intera neurotossina entra nei terminali per endocitosi. A seguito dell'acidificazione dell'endosoma la catena pesante forma un canale nella membrana endosomiale e viene ridotto il ponte disolfurico fra le catene. La catena leggera, così liberata, trasloca nel *citosol*, dove esercita la sua azione enzimatica sulle proteine componenti il complesso SNARE [*solubile NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) attachment protein receptor*]. Studi condotti *in vitro*, su preparazioni di emidiaframma di topo esposto alla tossina radiomarcata, hanno mostrato che questo processo di internalizzazione è massimo dopo circa 90 minuti a 22°C (6,10).

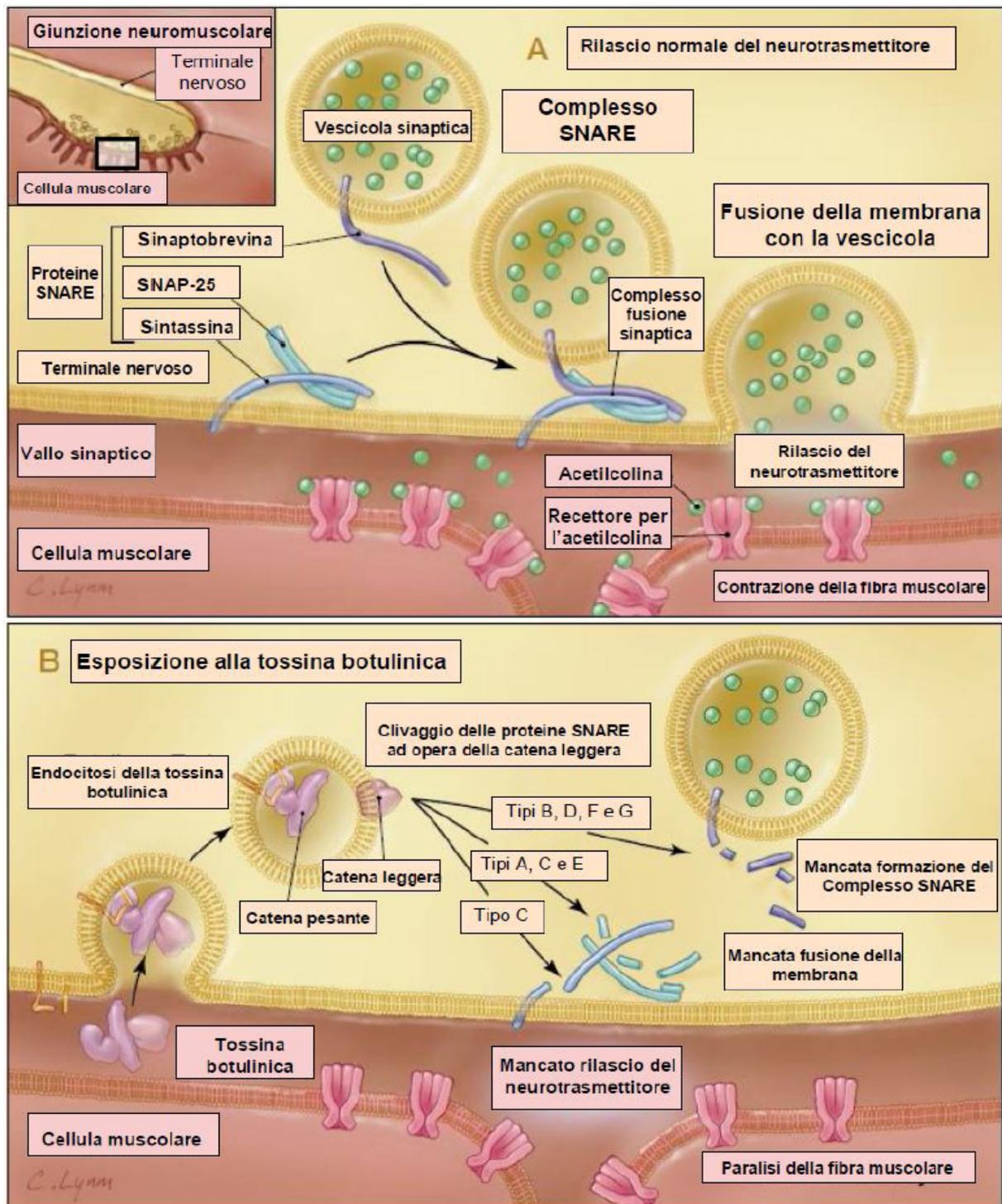
### *Inibizione del meccanismo di rilascio*

Il complesso SNARE regola l'attacco e la fusione delle vescicole sinaptiche alla membrana e la liberazione di acetilcolina. Nel complesso SNARE la sinaptobrevina, proteina associata alla vescicola (VAMP, vesicle-associated membrane protein), deve essere associata con la sintassina, una proteina integrata nella membrana cellulare. Tale associazione può essere diretta o mediata da interazioni con altri peptidi essenziali, quali SNAP-25 (25 kDa, *synaptosomal-associated protein*), NSF (N-ethyl-maleimide-sensitive factor) o alfa-, beta- e gamma-SNAP (*soluble NSF-attachment proteins*).

I vari sierotipi della tossina botulinica hanno specifici bersagli molecolari: la tossina A catalizza la scissione della molecola SNAP-25 a livello del legame glutamina197 ed arginina198, mentre quella B catalizza la scissione della VAMP fra i residui aminoacidici glutamina76 e fenilalanina77. Anche i sierotipi D, F e G hanno come substrato la VAMP, mentre i sierotipi C1 ed E la SNAP-25 (8).

La scissione di queste proteine distrugge la formazione di complessi SNARE funzionanti, prevenendo l'adesione e la fusione delle vescicole con la membrana presinaptica ed inibendo l'esocitosi dell'acetilcolina. In tal modo viene interrotta la conduzione del segnale dei neuroni colinergici coinvolti.

Pur mostrando tutti i 7 sierotipi lo stesso effetto biologico, ossia quello di inibire il rilascio dell'acetilcolina, si può evidenziare una prima differenza tra il sierotipo A e B in termini di bersaglio biologico (nel primo SNAP-25 e nel secondo VAMP).



**Figura 2.** Meccanismo d'azione della tossina botulinica. *Modificata da Arnon e coll. (9).*

Oltre alla ben nota azione sulle terminazioni nervose colinergiche, iniziano ad emergere evidenze che suggeriscono che le BT-A agiscano anche su altri terminali nervosi. E' stato, infatti, osservato, in studi pre-clinici, che la BT-A riduce il dolore inibendo la neurotrasmissione della sostanza P, del glutammato e del calcitonin gene related peptide. Sono, tuttavia, ancora contrastanti le evidenze secondo cui la BT possa avere, nell'uomo, un potenziale effetto benefico nel dolore neuropatico (11).

### Informazioni Regolatorie

Attualmente sono autorizzate e commercialmente disponibili tre formulazioni a base di tossina botulinica di Tipo A, per utilizzo in ambito terapeutico, con le indicazioni terapeutiche autorizzate di cui alla tabella 5, con le seguenti denominazioni commerciali (12):

BOTOX® 100 U Allergan – Titolare AIC Allergan Pharmaceutical Ireland  
DYSPORT® 500 U – Titolare AIC Ipsen SpA  
XEOMIN® 100 U DL50 – Titolare AIC Merz GmbH

Tutte e tre le sopra-citate specialità medicinali sono state autorizzate sulla base di tre differenti dossier regolativi ciascuno dei quali completo di dati farmaceutici, pre-clinici e clinici (*Full Application*), come farmaci biologici e, pertanto, ai sensi della Normativa Regolatoria Vigente in Europa ed in Italia, in materia di autorizzazione all'Immissione in Commercio, sono tre distinti farmaci *originator*, tra loro non biosimilari (13).

## Preparazione delle BT usate in terapia

Tutte le preparazioni di BT sono di origine biologica. La coltura di *Clostridium* viene tenuta in condizioni di anaerobiosi con una soluzione nutriente e a temperatura ottimale. Dopo 36 ore, quando la coltura ha raggiunto la sua crescita massima, i processi citolitici liberano il complesso botulinico progenitore che viene attivato da proteasi extracellulari. Dopo circa 72 ore viene raggiunta la concentrazione massima di BT e la coltura viene inattivata per acidificazione. In seguito la BT viene purificata.

I processi di produzione delle tossine botuliniche, così come le specifiche analitiche e le metodiche di determinazione dell'attività biologica, sono differenti e specifici per ciascuna delle formulazioni commercialmente disponibili a base di tossina botulinica di tipo A. I suddetti processi sono di proprietà dell'azienda produttrice, che ne detiene il brevetto. Infatti, il ceppo o lotto di *Clostridium* da cui ha origine la coltura cellulare è differente per ciascun produttore, così come il processo di purificazione che viene applicato quando la coltura ha raggiunto la concentrazione massima di BT. Questo implica che non esiste, ad oggi, un processo di produzione standard condiviso da tutte le aziende produttrici. Pertanto, ogni azienda produce un complesso BT differente da quello dell'altro produttore.

Dei 7 sierotipi di BT esistenti solo due sono stati approvati per l'uso clinico: quello maggiormente utilizzato è il sierotipo A (BT-A) ed in misura minore il sierotipo B (BT-B). Nella pratica clinica vengono impiegati soltanto questi due sierotipi per il loro elevato grado di potenza, la lunga durata d'azione e la capacità di essere rilasciati a livello locale.

Sono attualmente disponibili in commercio a scopo terapeutico 4 differenti specialità medicinali contenenti tossine botuliniche. Tre di queste sono a base di neurotossina botulinica di tipo A: Botox®, Dysport® e Xeomin®; una a base di neurotossina botulinica di tipo B: Neurobloc®/Myobloc®.

### Preparazione delle tossine contenenti il sierotipo A:

#### Preparazione del Botox®

Nella produzione del Botox® viene usato il metodo di cristallizzazione di Schantz (14,15) che porta alla formazione di un prodotto costituito esclusivamente di un complesso omogeneo di circa 900 kDa. La massa molecolare della neurotossina isolata è di 150 kDa (6,16). Le proteine accessorie comprendono le emoagglutinine non tossiche che stabilizzano l'attività biologica in vivo e permettono probabilmente al complesso di aderire al tessuto muscolare, agendo quindi come sostanza deposito-simile (1,17).

#### Preparazione del Dysport®

Dysport® è preparato mediante purificazione su colonna cromatografica che porta alla formazione di un prodotto che è eterogeneo nelle sue dimensioni con un peso molecolare di circa 400 kDa (16,18,19).

#### Preparazione del Xeomin®

Xeomin® contiene solo la forma 150 kDa di neurotossina e non contiene altre proteine complessanti, poiché sono rimosse completamente durante i processi di purificazione.

### Preparazione della tossina contenente il sierotipo B:

#### Preparazione del Myobloc®

Il Neurobloc®/Myobloc® è purificato tramite gel elettroforesi (*sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide*) che porta alla formazione di un polipeptide altamente purificato di 150 kDa. Tale polipeptide consiste della sola neurotossina, costituita dalla catena pesante e da quella leggera (20).

**Quindi, poiché l'intero processo di produzione (lotto o ceppo di *Clostridium*, processo di purificazione, ecc.) è differente per ciascuna azienda produttrice, le diverse formulazioni non sono da ritenersi interscambiabili.**

## Potenza delle varie preparazioni di BT

L'attività biologica, ovvero la potenza delle varie tossine, è espressa in termini di unità (U) di attività, che corrispondono alla mediana della dose letale ottenuta con iniezione intraperitoneale nel topo (IP-DL<sub>50</sub>) (21,22). Ogni produttore usa un proprio test di letalità: test di letalità Allergan, test di letalità Solstice, test di letalità Ipsen e test di letalità Merz.

A livello Internazionale, l'Organizzazione Mondiale della Sanità non ha definito un approccio standard per la misurazione delle Unità di tossina botulinica e, pertanto, non è disponibile una preparazione standard di riferimento Internazionale per la determinazione delle unità di tossina che sia utilizzabile per tutte le specialità medicinali a base di tossina botulinica di tipo A.

La non interscambiabilità tra le Unità di tossina botulinica è anche riportata al § 4.2. "Posologia e modalità di somministrazione" del Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto (RCP) autorizzato di ciascuna delle specialità medicinali a base di tossina botulinica di tipo A commercializzate (12).

Pertanto, non esiste parità fra una U di Botox® ed una U di Dysport® (22). Ci vorrebbero circa 3-6 unità di Dysport® per ottenere effetti terapeutici simili a quelli di un'unità di Botox® (22,23). Queste differenze nella letalità dipendono dal metodo di determinazione della potenza utilizzato dai produttori (24,25) ed i tentativi di standardizzazione da un lato non spiegano le differenze e dall'altro mettono in risalto che ogni metodo di preparazione e di formulazione porta ad avere prodotti con proprietà fisico-chimiche differenti (26,27). Nonostante tutto ciò ad oggi l'unico test approvato dalle Autorità Regolatorie a livello mondiale per stabilire la potenza della tossina botulinica di Tipo A è la DL<sub>50</sub> definita come la quantità di sostanza, per unità di peso corporeo, capace di provocare la morte del 50% della popolazione campione di cavie (27,28).

Recentemente Allergan ha ottenuto, per la propria specialità medicinale Botox®, l'autorizzazione da parte dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), per un test innovativo, alternativo alla DL<sub>50</sub>, di determinazione della potenza, denominato CBPA (*Cell Based Potency Assay*) completamente eseguito su colture cellulari *in vitro* (29). Tale test è specifico per la specialità medicinale BOTOX® e non è applicabile alle altre specialità medicinali a base di tossina botulinica.

A fronte di tali limitazioni della DL<sub>50</sub> è stato proposto nel 1994, con una lettera su *Lancet* (30), un metodo per definire la potenza della BT che si basa sulla debolezza muscolare localizzata. Si valuta la paralisi della zampa posteriore del topo dopo iniezione della BT nel muscolo gastrocnemio di una delle due zampe. Ciò permette un confronto diretto fra le varie formulazioni di BT misurando l'inizio dell'azione e la sua durata, l'efficacia massima e la migrazione (distribuzione/diffusione della tossina) dal sito dell'iniezione (7,31,32).

**Le preparazioni standard sono specifiche del singolo produttore e, per tale motivo, non vi è interscambiabilità tra le diverse specialità medicinali pur essendo tutte a base di tossina botulinica di tipo A.**

## Distribuzione delle diverse BT nel muscolo bersaglio

Il principio base della diffusione è che particelle con peso molecolare maggiore tendono a diffondere più lentamente in un mezzo acquoso equivalente di quelle con peso molecolare minore, a condizione che la carica delle molecole, la temperatura e la struttura molecolare generale siano le stesse. Questo principio può predire che la BT con più alto peso molecolare fuoriesce in misura minore dal muscolo bersaglio rispetto a quelle con peso molecolare inferiore.

E' possibile valutare la distribuzione/diffusione sia utilizzando BT radiomarcata con iodio 125 sia utilizzando la curva dose-risposta del gastrocnemio dopo somministrazione di differenti dosi di BT diverse.

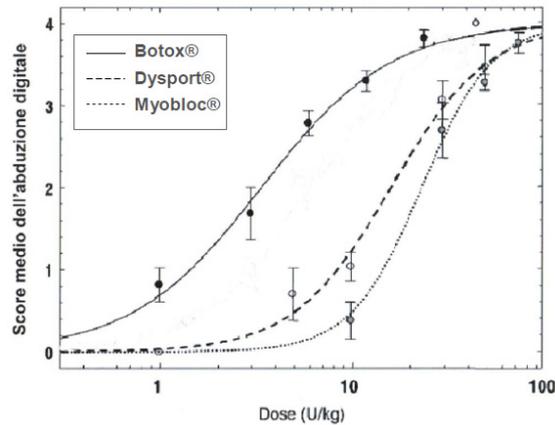
### *Studi con BT radiomarcata*

Nel muscolo gastrocnemio isolato di ratto sono stati condotti studi iniettando sia il complesso di 900 kDa radiomarcato con iodio e sia la neurotossina isolata di 150 kDa (33). Monitorando a vari intervalli la migrazione della tossina dalla sede della inoculazione, si è trovata una persistenza del complesso di 900 kDa radiomarcato di più di 24 ore rispetto alla permanenza della forma di 150 kDa. Poiché la maggioranza della radiomarcatura risulta presente nelle proteine accessorie, è stato suggerito che le emoagglutinine accessorie, rispetto alla neurotossina nuda, conferiscono il vantaggio di una maggiore permanenza nel muscolo.

**Le tossine a maggior peso molecolare persistono maggiormente nel sito d'iniezione.**

### *Studi dose-risposta (indagini pre-cliniche)*

Sono stati condotti degli studi valutando la paralisi muscolare unilaterale della zampa posteriore dopo iniezione nel muscolo gastrocnemio del topo delle differenti preparazioni di tossine a dosi diverse, ma in ugual volume (31). Con questo modello sperimentale pre-clinico è possibile creare delle curve dose-risposta (Figura 3) e studiare gli effetti sull'indebolimento muscolare locale (le dosi più basse che rappresentano la dose effettiva mediana o DE<sub>50</sub>) e gli effetti di diffusione sistemica (le dosi più elevate che rappresentano la DL<sub>50</sub>).



**Figura 3.** Curve dose-risposta per diverse formulazioni di tossina botulinica, valutate utilizzando la misurazione dell'abduzione digitale del topo. *Modificata da Aoki et al. (1).*

Tutte le formulazioni producono curve dose-risposta comparabili, ma le curve non risultano parallele, indicando differenze nei parametri farmacodinamici (efficacia e sicurezza).

Alla dose più bassa di Botox® (0.5 U/kg) si osserva un piccolo aumento dello score medio dell'abduzione digitale che raggiunge il massimo a due giorni dall'iniezione; aumentando le dosi vi è un aumento dell'abduzione indicante una aumentata debolezza muscolare che raggiunge il massimo dopo due giorni dalla iniezione (34). Le altre preparazioni di BT producono curve simili, ma le curve non risultano parallele. Il confronto delle curve permette, infatti, di affermare che Botox® ha la potenza maggiore, seguita da Dysport® e da Myobloc®.

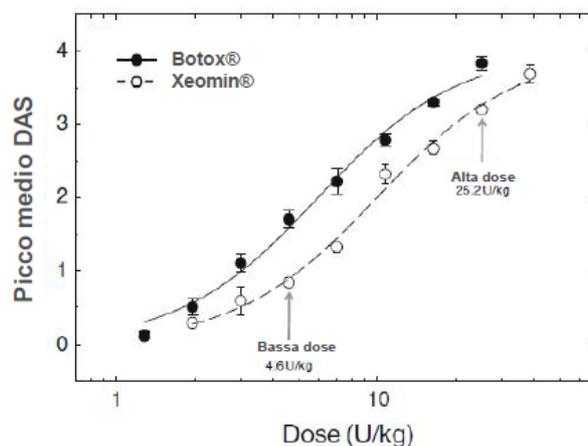
Determinando da queste curve dose-risposta la DE<sub>50</sub> (valore medio della debolezza muscolare indotta dalla tossina) delle differenti preparazioni risulta la seguente: Botox® 3.5 ± 0.58 U/kg, Dysport® 16.3 ± 1.6 U/kg e Myobloc® 23.7 ± 2.04 U/kg (Tabella 1).

Il rapporto fra DL<sub>50</sub> e DE<sub>50</sub> rappresenta il margine di sicurezza, ovvero sia la separazione fra la dose efficace e la dose che potrebbe portare alla fuoriuscita dal muscolo trattato e causare un effetto sistemico. I rapporti efficacia/tossicità risultano i seguenti: Botox®=19.8±3.38, Dysport®=10.3±1.09 e Myobloc® =4.35±0.39 (32,35) (Tabella 1).

**Tabella 1.** Parametri farmacologici delle diverse specialità medicinali (32).

Specialità medicinale	DE <sub>50</sub> (U/kg)	DL <sub>50</sub> (U/kg)	DL <sub>50</sub> /DE <sub>50</sub> (Margine di sicurezza)
Botox®	3.50 ± 0.58	69.2 ± 2.89	19.8 ± 3.38
Dysport®	16.3 ± 1.62	168 ± 6.29	10.3 ± 1.09
Myobloc®	23.7 ± 2.04	103 ± 2.55	4.35 ± 0.39

Un recente studio di Brown e coll. ha, invece, confrontato la DE<sub>50</sub> nel topo con la *Digit Abduction Score* (DAS) per Botox® e Xeomin®, evidenziando come siano necessarie 6 U di Botox® rispetto alle 10 U di Xeomin® per ottenere una DAS di 2 (36) (Figura 4).



**Figura 4.** Profilo dose-risposta (in termini di DAS) di Botox® e Xeomin® nel topo. *Modificata da Brown e coll. (36).*

Altri studi, condotti sugli animali, dimostrano che le preparazioni di tossina botulinica presentano differenti livelli di diffusione del prodotto e pertanto di eventi avversi a ciò correlati (23,37-39). Esiste anche uno studio condotto su un numero limitato di ratti (32 distribuiti in 4 gruppi, 8 ratti a gruppo) che non ha rilevato differenze nella diffusione delle tossine esaminate (40).

Poiché da un punto di vista clinico la comparsa di effetti collaterali sistemici non è un *outcome* appropriato, l'efficacia pre-clinica è stata valutata anche in termini di margine terapeutico. Tale margine terapeutico intramuscolare confronta la dose intramuscolare soglia (DT), ovvero quella che mostra la diffusione della tossina localizzata, rappresentata dalla atrofia del muscolo quadricipite con la  $DE_{50}$ . Questo margine risulta il seguente: Botox®=6.8, Dysport®=1.5 e Myobloc®=1.0. La graduatoria di questi valori è sovrapponibile alla graduatoria di efficacia (potenza) e indica che meno diffonde la tossina più è efficace e più è sicura. Ne consegue:

- Per Botox® la dose efficace intramuscolare ( $DE_{50}= 3.5 \pm 0.58$  U/kg) è ben distante sia dalla dose necessaria per una dispersione locale (DT=6.8) che dalla dose necessaria perché possa esserci una diffusione sistemica ( $DL_{50}= 69.2 \pm 2.89$ ).
- Per Dysport® la dose efficace intramuscolare ( $DE_{50}= 16.3 \pm 1.62$  U/kg) è molto più elevata ed il margine di sicurezza molto inferiore ( $DL_{50}/DE_{50}=10.3 \pm 1.09$ ). Ciò indica che un effetto sistemico può insorgere prima che sia raggiunta la massima efficacia.
- Per quel che riguarda Myobloc® la tossina sembra migrare dal muscolo molto rapidamente ed il margine terapeutico è molto basso (TD=1.0).
- Per Xeomin® non vi sono dati al riguardo.

Botox® sembra, pertanto, avere un margine di efficacia e sicurezza maggiore di quello delle altre BT.

Questi dati pre-clinici, che prendono in considerazione due formulazioni BT-A ed una formulazione BT-B, dimostrano che esse hanno profili di efficacia e sicurezza dissimili, inoltre le curve dose-risposta mettono in evidenza profili farmacologici non sovrapponibili (32,34).

**Trasferendo questi dati all'ambito clinico è, quindi, evidente che le diverse formulazioni non sono da considerarsi interscambiabili (vedi Paragrafo "Studi clinici ed efficacia").**

## Preparazioni di BT presenti in commercio

Sono attualmente disponibili in commercio a scopo terapeutico, come si è detto, 4 differenti specialità medicinali contenenti tossine botuliniche (Tabella 2). Tre di queste sono a base di neurotossina botulinica di tipo A: Botox®, prodotta da Allergan e inizialmente autorizzata negli USA nel 1989; Dysport®, prodotta da Ipsen e inizialmente autorizzata in UK nel 1991 e Xeomin®, prodotta da Merz e autorizzata inizialmente in Germania nel 2005. La sola specialità a base di neurotossina botulinica di tipo B è autorizzata negli USA, Canada e Corea come Myobloc® e in Europa come Neurobloc®.

In Europa, tutte le specialità medicinali autorizzate contenenti tossina botulinica di Tipo A e B come principio attivo rientrano nella stessa classificazione ATC (M03AX01), ovvero altri miorilassanti ad azione periferica. Tutte le specialità medicinali hanno, di fatto, lo stesso meccanismo d'azione e la stessa via di somministrazione.

Le formulazioni di tossina botulinica sono dei preparati biologici e, per definizione, i farmaci biologici sono molecole complesse di natura proteica estratte o purificate da organismi viventi. La complessità dei processi di produzione fa sì che la molecola finale sia un prodotto totalmente dipendente da ciascuna delle tappe di preparazione; piccoli cambiamenti (eccipienti, uso di nuove banche di cellule, ecc) possono comportare alterazioni clinicamente significative nel prodotto finale in termini di sicurezza ed efficacia e, quindi, di potenziale terapeutico.

**Tabella 2.** Caratteristiche delle specialità medicinali contenenti tossina botulinica. *Modificata da Albanese (35).*

Specialità medicinale	Botox®	Dysport®	Xeomin®	Neurobloc®
Produttore	Allergan (USA)	Ipsen (UK)	Merz (Germania)	Solstice Neurosciences (USA)
Sierotipo	A	A	A	B
Attività biologica	100 MU-A/fiala	500 MU-I/fiala	100 MU-U/fiala	1,0-2,5-10,0 kMU-E/fiala
Attività biologica specifica	60 MU-EV/ng BNT	100 MU-EV/ng BNT	167 MU-EV/ng BNT	5 MU-EV/ng BNT
Confezione, U/fiala	100	500	100	2500, 5000, 10000
SNARE target	SNAP-25	SNAP-25	SNAP-25	VAMP
Costituenti ed eccipienti	Emoagglutinine, Albumina 500 mcg, Sodio cloruro	Emoagglutinine, Albumina 125 mcg, lattosio	Albumina 1 mg, Saccarosio	Albumina 1 mg, Saccarosio
pH	7.4	7.4	7.4	5.6
Dimensione del complesso (kDa)	~ 900	~ 400	150	150
Processo di purificazione	Cristallizzazione	Cromatografia	Cromatografia	Cromatografia
Preparazione	Essiccamento a vuoto	Liofilizzazione	Liofilizzazione	Acidificazione
Conservazione	36 mesi, 2-8 °C	24 mesi, 2-8 °C	48 mesi, ≤ 25°C	36 mesi, 2-8 °C
Conservazione dopo ricostituzione	24 h, 2-8 °C	8 h, 2-8 °C	24 h, 2-8 °C	24 h, 2-8 °C

*BNT = neurotossina botulinica; MU-A = unità topo (test di letalità Allergan); MU-E = unità topo (test di letalità Solstice), MU-I unità topo (test di letalità Ipsen); MU-M = unità topo (test di letalità Merz); MU-EV = unità di equivalenza topo; 1MU-EV=1MU-A=1MU-M=3MU-I=40MU-E*

### **Preparazione farmaceutica**

Le tre specialità medicinali a base di tossina botulinica di Tipo A, ovvero Botox®, Dysport® e Xeomin®, sono preparate in polvere e devono essere ricostituite con una soluzione allo 0.9% di NaCl per essere iniettate. L'unica specialità medicinale a base di tossina botulinica di tipo B, ovvero Neurobloc®, è una preparazione disponibile in soluzione pronta all'uso.

### **Conservazione**

Xeomin® deve essere conservato a temperatura non superiore a 25 °C. Le altre tossine devono essere conservate in frigorifero a temperatura compresa tra +2 e +8 °C.

### **Durata della preparazione**

Il periodo di validità del prodotto finito è pari a:

36 mesi per Botox®

24 mesi per Dysport®

48 mesi per Xeomin®

36 mesi per Neurobloc®

### **pH**

E' uguale (7.4) per tutte, ad eccezione del Neurobloc®, il cui pH è acido. Questo pH acido è probabilmente la ragione per la quale circa il 50% dei pazienti cui è stata somministrata questa BT ha riferito dolore intenso (41).

### **Somministrazione**

Differisce in base alla formulazione e dipende dalle caratteristiche di diffusione. Come già detto, a seguito dell'iniezione la BT diffonde dal punto in cui viene depositata a velocità diversa a seconda della formulazione e del volume di diluizione usati. Questa diffusione può localizzarsi al tessuto bersaglio, ma anche allargarsi a muscoli adiacenti o lontani o, addirittura, portare ad un effetto sistemico, potendo la tossina entrare nella circolazione sanguigna o linfatica (42,43).

**Come in precedenza detto, le diverse specialità medicinali presentano differenze in termini di processo di produzione, potenza, distribuzione (persistenza nel sito di applicazione) e curva dose-risposta. Inoltre, sono differenti per struttura, peso molecolare, eccipienti, processi di purificazione e modalità di conservazione (Tabella 2) (35).**

### **Dose**

Le dosi che devono essere somministrate nelle varie indicazioni cliniche differiscono grandemente in base alla tossina utilizzata.

#### **Confronto Botox® e Dysport®**

La maggior parte delle pubblicazioni comparative riguarda Botox® e Dysport® e, di fatto, supportano la considerazione che una dose fissa di conversione non possa essere utilizzata quando si mettono a confronto i due prodotti e che vi è un *range* di rapporti di conversione che dipende dal paziente trattato e dall'indicazione terapeutica per la quale il prodotto è utilizzato. Molteplici pubblicazioni, che hanno messo a confronto Botox®/Dysport® per diverse indicazioni

terapeutiche, hanno riportato un rapporto di conversione 1:4-5; tuttavia alcune pubblicazioni hanno evidenziato rapporti inferiori o superiori fino a 1:11.

Da clinici esperti nel campo della terapia con BT sono state riportate diverse raccomandazioni sul rapporto fra le dosi di Botox® e Dysport® (**Tabella 3**):

**Tabella 3.** Sintesi degli studi che hanno confrontato rapporti diversi tra Botox® e Dysport®.

Indicazione o misura di outcome Autori	Rapporto tra Botox® e Dysport®	Confronto *
<b>Blefarospasmo</b>		
Marion e coll. (44)	1:3	Diretto
Nussgens and Roggenkamper (39)	1:4	Diretto
Sampaio e coll. (45)	1:4	Diretto
Bihari (46)	1:4-1:5	Diretto
Marchetti e coll. (47)	1:2-1:11	Indiretto
Bentivoglio e coll. (48)	1:1-1:13	Diretto
<b>Distonia cervicale</b>		
Durif (49)	1:5-1:6	Diretto
Odergren e coll. (22)	1:3	Diretto
Ranoux e coll. (41)	1:3 e 1:4	Diretto
Bihari (46)	1:4-1:5	Diretto
VandenBergh and Lison (50)	1:2,5	Diretto
Bhaumik and Behari (51)	1:4,6	Indiretto
Marchetti e coll. (47)	1:2-1:11	Indiretto
<b>Spasmo emifacciale</b>		
Marion e coll. (44)	1:3	Diretto
Bihari (46)	1:4-1:5	Diretto
VandenBergh and Lison (50)	1:2,5	Diretto
<b>Spasticità</b>		
Rasmussen (52)	1:4	Diretto
Bhakta e coll. (53)	1:4-1:5	Indiretto
Hesse e coll. (54)	1:5	Indiretto

\* Confronto diretto: studi che hanno valutato rapporti testati;

Confronto indiretto: studi clinici che hanno utilizzato entrambi i prodotti.

#### Confronto Botox® e Xeomin®

Sono, invece, solo due gli studi clinici che hanno confrontato Xeomin® e Botox®: si tratta di due studi di non inferiorità, in doppio cieco, entrambi della durata di 16 settimane, condotti su pazienti affetti da blefarospasmo e distonia cervicale, rispettivamente (55,56). In entrambi gli studi è stato scelto un rapporto di conversione di 1:1 e non sono state riscontrate differenze statisticamente significative in termini di efficacia e sicurezza tra i due prodotti. Va considerato che il rapporto di conversione scelto per i due studi non era un rapporto pre-determinato e, pertanto, non consente di sostenere un rapporto di equivalenza di dosi.

Tuttavia, dall'analisi delle schede tecniche delle due specialità medicinali emergono differenze sensibili nei dosaggi necessari per l'effetto terapeutico delle due tossine per la spasticità post ictus dell'arto superiore (12) (**Tabella 4**).

**Tabella 4.** Dosaggi raccomandati nelle schede tecniche di Botox® e Xeomin® per l'effetto terapeutico nella spasticità post ictus dell'arto superiore.

	Botox® (Unità Allergan)	Xeomin® (Unità DL <sub>50</sub> )	Rapporto
Flessore profondo delle dita	15-50	40-100	1:2
Flessore superficiale delle dita	15-50	40-100	1:2
Flessore radiale del carpo	15-60	25-100	1:1,7
Flessore ulnare del carpo	10-50	20-100	1:2
Adduttore del pollice	20	5-30	1:1,5
Flessore profondo delle dita	20	10-50	1:2,5

Queste differenze nelle schede tecniche confermano la non applicabilità del rapporto di conversione di 1:1 tra Botox® e Xeomin®.

#### Confronto Xeomin® e Dysport®

In uno studio di confronto tra Xeomin® e Dysport®, è stato proposto un rapporto tra le dosi pari a 1:3 (57).

Risulta evidente che tra gli esperti non esiste consenso sul rapporto tra le dosi. Curve dose-risposta ovviamente non possono essere generate con le BT nell'uomo per ragioni etiche ed i risultati clinici dipenderanno quindi dalla dose.

**Quindi, le dosi di una data preparazione non possono essere convertite con quelle di un'altra preparazione. Anche questo aspetto sottolinea la non interscambiabilità tra le varie tossine.**

#### **Durata dell'azione**

Secondo quanto riportato in diverse pubblicazioni, la durata media del Botox® è pari a circa 4.5 mesi (*range* 2–6 mesi), con un trend verso l'aumento della durata quando si utilizzano dosi più alte (**58,59**). La durata aumenta con trattamenti ripetuti di Botox®. In particolare, nello studio di Lagalla e coll., senza modificare la dose nel corso di 2 anni di trattamenti per la spasticità dell'arto superiore, la durata è aumentata da 3.9±1.2 mesi a 7.0±2.2 mesi (**60**). Nello studio di Gordon e coll., il 61% dei pazienti trattati per la spasticità dell'arto superiore aveva una durata compresa tra 12 e 15 settimane, il restante 39% aveva una durata superiore, ma non oltre le 24 settimane (**61**).

Dysport® sembra avere una durata d'effetto più breve in base alla misurazione degli intervalli tra i trattamenti secondo le valutazioni effettuate sia dai pazienti sia dai medici (media 3.9 mesi e mediana 3.3 mesi) (**62,63**).

**Anche la durata d'azione è un fattore di distinzione tra le varie neurotossine. Pertanto, anche questo aspetto avvalorava la non interscambiabilità tra le tossine.**

#### **Indicazioni d'uso**

Vi sono differenze significative tra le diverse specialità medicinali in termini di indicazioni terapeutiche autorizzate sia tra i vari Paesi che nell'ambito dello stesso territorio nazionale (**Tabella 5**). Botox® rappresenta la specialità medicinale con il maggior numero di indicazioni terapeutiche autorizzate. E' importante ricordare che un farmaco è utilizzato in maniera appropriata se l'indicazione d'uso è presente in scheda tecnica (*in label*). Laddove non presente, si tratta di un uso *off label*, anche quando un'indicazione d'uso è autorizzata nella scheda tecnica di altre specialità contenenti tossina botulinica.

**La non corrispondenza tra le indicazioni autorizzate, come si evince dalla tabella 5, sottolinea ulteriormente la non interscambiabilità delle varie tossine.**

**Tabella 5.** Indicazioni terapeutiche autorizzate in Italia delle differenti specialità medicinali contenenti tossina botulinica (**12**).

<b>Specialità medicinale</b>	<b>Indicazioni terapeutiche autorizzate</b>
Botox®	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Blefarospasmo</li> <li>- Spasmo emifacciale e distonie focali associate</li> <li>- Distonia cervicale (torcicollo spasmodico)</li> <li>- Spasticità focale:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- associata a deformità dinamica del piede equino dovuta a spasticità in pazienti pediatrici deambulanti con paralisi cerebrale, di due anni di età o superiore</li> <li>- del polso e della mano in pazienti colpiti da ictus cerebrale</li> </ul> </li> <li>- Iperidrosi primaria persistente e severa delle ascelle che interferisce con le normali attività quotidiane ed è resistente al trattamento topico.</li> <li>- Incontinenza urinaria in pazienti affetti da iperattività neurogena del muscolo detrusore della vescica causata da lesioni stabilizzate del midollo spinale a partire dalla regione cervicale fino ai livelli inferiori o a sclerosi multipla</li> <li>- Sollievo sintomatico in pazienti adulti che soddisfano i criteri diagnostici per emicrania cronica (cefalee di durata ≥ 15 giorni al mese di cui almeno 8 con emicrania) e che hanno mostrato una risposta insufficiente o sono intolleranti ai farmaci per la profilassi</li> </ul>
Dysport®	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Blefarospasmo</li> <li>- Spasmo emifacciale</li> <li>- Distonia cervicale (torcicollo spasmodico)</li> <li>- Spasticità muscolare degli arti superiori ed inferiori causata da ictus</li> <li>- Deformità da piede equino causata da pazienti pediatrici, di due anni di età o più, affetti da paralisi cerebrale</li> </ul>
Xeomin®	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Blefarospasmo</li> <li>- Distonia cervicale di forma prevalentemente rotazionale (torcicollo spasmodico)</li> <li>- Spasticità post-ictus dell'arto superiore che si presenta con polso flessore e pugno chiuso nell'adulto</li> </ul>
Neurobloc®	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Distonia cervicale (torcicollo)</li> </ul>

## Studi clinici ed efficacia

L'efficacia e la sicurezza clinica delle diverse BT dipendono, sulla base degli studi sugli animali, dalla loro distribuzione nell'organo bersaglio e quindi: a) dalla struttura della molecola; b) dal volume dell'iniezione; c) dalla formulazione e diffusione.

### Confronto tra Botox® e Dysport®

Sono riportati di seguito, a seconda dell'indicazione terapeutica (vedi **Tabella 3**), alcuni studi in cui il confronto tra le tossine Botox® e Dysport® è stato condotto partendo da un rapporto di dose predeterminato o meno al fine di verificare la comparabilità dei loro effetti.

**Marion e coll. (44)** hanno condotto uno studio di confronto, selezionando 74 pazienti, di cui 37 con *blefarospasmo* idiopatico e 37 con *spasmo emifacciale*. I pazienti hanno risposto in maniera positiva e ripetutamente al Dysport® per almeno 12 mesi. I pazienti erano i controlli di se stessi. Sono state iniettate dosi crescenti di Botox® fino ad una risposta paragonabile a quella indotta dal Dysport®. E' stato iniettato sempre lo stesso volume di ciascuna tossina e per avere una dose maggiore di Botox® è stato utilizzato meno diluente. L'iniziale diluizione con 4 ml di soluzione salina forniva una risposta sufficiente solo in meno del 50% dei pazienti. Anche le diluizioni con 3 ml, 2.5 ml e 2 ml inducevano una risposta inferiore al 50%. Solo la diluizione con 1.5 ml determinava una risposta soddisfacente in tutti i pazienti così come con Dysport® senza la comparsa di eventi indesiderati (es. ptosi e diplopia). Il numero totale di iniezioni nei pazienti con blefarospasmo era 59, mentre 52 con spasmo emifacciale. Alcuni pazienti sono stati sottoposti a più iniezioni, ma sempre con un intervallo di 3 mesi tra un'iniezione e l'altra. La diluizione finale con 1.5 ml di soluzione salina forniva una concentrazione di 67 U/ml per Botox® e 200 U/ml per Dysport® e, quindi, un rapporto tra le dosi di 1:3 per avere un effetto clinico paragonabile.

**Nussgens and Roggenkamper (39)** hanno condotto uno studio in doppio cieco su 212 pazienti con *blefarospasmo*. Hanno utilizzato un rapporto tra le dosi di Botox® e Dysport® pari a 1:4. Ciascun paziente ha ricevuto un'iniezione con Botox® e una con Dysport® con un ordine randomizzato. Tutti i pazienti avevano in precedenza ricevuto una media di 15.3 somministrazioni precedenti di BT-A; inoltre erano stati ben educati a descrivere e a rilevare i parametri di efficacia e sicurezza. I risultati di tale studio non hanno evidenziato differenze statisticamente significative nella durata e nell'efficacia tra i due gruppi. I pazienti trattati con Dysport® presentavano una durata dell'effetto pari a 8.03 settimane rispetto a 7.98 settimane nei pazienti esposti a Botox®. In questo studio l'incidenza di eventi avversi è risultata maggiore in misura statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) nel gruppo trattato con Dysport® (24%) rispetto a quello esposto a Botox® (17%), soprattutto a causa della maggiore incidenza di ptosi nel gruppo trattato con Dysport® (6.6%) rispetto a quello esposto a Botox® (1.4%).

**Sampaio e coll. (45)** hanno condotto uno studio a gruppi paralleli in cieco su 91 pazienti con *blefarospasmo* o *spasmo emifacciale*. È stato utilizzato un rapporto tra le dosi di Botox® e Dysport® pari a 1:4, ma sono state impiegati diversi volumi di diluizione (2.5 ml per una fiala di 500 Unità di Dysport® e 4 ml per una fiala di 100 Unità di Botox®). Nessuno dei pazienti era stato in precedenza trattato con una tossina botulinica e l'efficacia è stata valutata utilizzando il Blepharospasm Rating Scale (64). I risultati di questo studio non hanno evidenziato differenze statisticamente significative nell'efficacia e nella durata dell'effetto tra i due gruppi. I pazienti trattati con Dysport® presentavano una durata dell'effetto pari a 12.8 settimane rispetto a 13.1 settimane nei pazienti esposti a Botox®. In questo studio era permesso ai pazienti di avere un'iniezione di richiamo se non erano soddisfatti con l'effetto delle iniezioni iniziali. Nel gruppo trattato con Dysport® un numero superiore di pazienti (24%) ha richiesto iniezioni di richiamo rispetto al gruppo esposto a Botox® (12%), indicando che i pazienti erano trattati con dosi di Dysport® non sufficienti (sottodosaggio). In questo studio l'incidenza di eventi avversi è risultata sovrapponibile tra i due gruppi (50% nel gruppo trattato con Dysport® versus 47% nel gruppo esposto a Botox®). Ciò è probabilmente da ascrivere al sottodosaggio nel gruppo esposto a Dysport®.

**Bihari (46)** ha condotto uno studio valutando comparativamente l'efficacia e la sicurezza di entrambe le preparazioni. Si tratta di uno studio comparativo *open label* con un singolo braccio, crossover, condotto su 48 pazienti, di cui 27 con *blefarospasmo*, 12 con *distonia cervicale/torcicollo* e 9 con *spasmo emifacciale*. Ogni paziente ha ricevuto una somministrazione di Dysport® ed è stato valutato per un periodo di 12 settimane, seguita da una somministrazione di Botox® e poi da un secondo periodo di valutazione di 12 settimane. Entrambi i prodotti sono stati diluiti in modo tale che i volumi di iniezione fossero gli stessi in ciascuna sessione e venissero somministrati negli stessi siti di iniezione. Nei pazienti con blefarospasmo sono stati utilizzati 120 U di Dysport® e 30 U di Botox® (rapporto 1:4), in quelli con distonia cervicale 654 U Dysport® e 130 U di Botox® (rapporto 1:5) e nei soggetti con spasmo emifacciale 78 U di Dysport® e 16 U di Botox® (rapporto 1:5). La valutazione è stata eseguita al basale e poi a 3 e a 12 settimane utilizzando il *Jankovic Rating Scale* e il *Toronto Western Spasmodic Torticollis Rating Scale* (TWSTRS). I pazienti tenevano anche un diario in cui registrare quando l'efficacia svaniva e se insorgevano effetti collaterali. I risultati indicano che Botox® migliora in misura maggiore e statisticamente significativa i sintomi e con una durata significativamente più lunga. Inoltre, nel gruppo trattato con Botox® non sono stati registrati effetti collaterali, mentre

il 40% dei pazienti (19/48) in trattamento con Dysport® ha presentato effetti collaterali. Sebbene questi risultati mostrino un migliore tasso di risposta associato a Botox®, in base ad un rapporto tra le dosi pari a 1:4 nei soggetti con blefarospasmo e a 1:5 in quelli con distonia cervicale e con spasmo emifacciale, va tenuto conto che lo studio non è solo *open label*, ma che l'ordine con cui sono state effettuate le iniezioni era fisso (prima un'iniezione con Dysport®; poi dopo 12 settimane una seconda iniezione con Botox®), per cui potrebbe essere stato soggetto a *bias*. Pertanto, è più appropriato considerare gli studi controllati che permettono un confronto diretto tra diversi rapporti tra dosi tra Botox® e Dysport®.

**Marchetti e coll. (47)** hanno condotto uno studio osservazionale multinazionale di tipo retrospettivo (*Retrospective Evaluation of the Dose of Dysport and BOTOX in the Clinical Management of Cervical Dystonia and Blepharospasm [REAL DOSE]*) in 6 centri europei, selezionando dalle cartelle cliniche pazienti affetti da *blefarospasmo* e *distonia cervicale*, di età superiore a 18 anni, che avevano assunto Dysport® e Botox® per almeno 1 anno prima o dopo la sostituzione di un farmaco con l'altro. Dei 422 pazienti selezionati, 114 sono stati inclusi nell'analisi. Dei 114 pazienti, 70 erano affetti da distonia cervicale e 44 da blefarospasmo. E' stato osservato un ampio intervallo di rapporto tra le dosi da 2:1 a 11:1. Il 31% dei pazienti che passava da Dysport® a Botox® rientrava nell'intervallo 5:1 – 6:1; il 30% nell'intervallo 4:1 – 5:1 e solo il 21% nell'intervallo 3:1 – 4:1. Nel sottogruppo dei 94 pazienti passati da Dysport® a Botox®, il rapporto medio tra le dosi era di 4.44:1, mentre nel sottogruppo dei 20 pazienti passati da Botox® a Dysport® era di 1:4.6. La maggior parte delle reazioni avverse è stata osservata nel gruppo trattato con Dysport® (11.0%) rispetto a quello trattato con Botox® (4.25%). Nel gruppo dei pazienti con distonia cervicale la reazione avversa più frequente era la disfagia, mentre nel gruppo con blefarospasmo era la ptosi. Alla luce dell'ampio intervallo di rapporto tra le dosi, Marchetti e coll. sono dell'opinione che le due tossine non sono interscambiabili poiché non è applicabile un semplice fattore di conversione tra le dosi.

**Bentivoglio e coll. (48)** hanno pubblicato uno studio condotto per valutare il rapporto Dysport®/Botox® (D/B ratio), esaminando in modo retrospettivo oltre 2.000 trattamenti effettuati con le due specialità. In un periodo compreso tra il 1986 e il 2003, sono stati presi in esame retrospettivamente tutti i soggetti con *blefarospasmo* (BS) e *spasmo emifacciale* (HFS) trattati con Botox® o Dysport® in almeno due trattamenti consecutivi. Nel periodo considerato, sono stati inclusi 236 pazienti (BS 128, HFS 108) e 2006 trattamenti (BS 1.341; HFS 665). In 56 casi di pazienti con BS (44%) e in 31 con HFS (28.7%) si è reso necessario passare da una specialità ad un'altra per diverse ragioni. Tra i trattamenti per BS, sono state riscontrate 41 coppie di trattamento con un passaggio da Botox® a Dysport® (n=30) o da Dysport® a Botox® (n=11). Tra i trattamenti per HFS, sono state riscontrate 10 coppie di trattamento con un passaggio da Botox® a Dysport® (n=6) o da Dysport® a Botox® (n=4). È stato stimato un rapporto medio di circa 4, anche se è emerso un ampio *range* di valori. Tale aspetto probabilmente è correlato alla variabilità tra i soggetti.

**Odergren e coll. (22)** hanno condotto, su 73 pazienti con *distonia cervicale* rotazionale, uno studio a gruppi paralleli in doppio cieco. Tutti i pazienti avevano ricevuto 4 precedenti somministrazioni di Botox® prima di entrare nello studio. Sono stati trattati con Botox® 35 pazienti e con Dysport® 38. Il rapporto di dosi fra Botox® e Dysport® è stato pari a 1:3, il volume delle somministrazioni era fisso, ma non era fissa la sede di iniezione per muscolo. I risultati di tale studio non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra i due gruppi in base alla riduzione dello score Tsui (Dysport® 4.8 e Botox® 5) e nella durata dell'effetto (Dysport® 83.9 giorni e Botox® 80.7 giorni). In questo studio l'incidenza di eventi avversi è risultata simile tra i due gruppi (58% nel gruppo trattato con Dysport® versus 69% in quello esposto a Botox®).

**Ranoux e coll. (41)** hanno pubblicato uno studio crossover in doppio cieco in 3 periodi condotto su 54 pazienti con *distonia cervicale*. Prima di essere arruolati nello studio tutti i pazienti avevano ricevuto 2 precedenti somministrazioni di Botox®. Sono stati utilizzati rapporti tra le dosi di Botox® e Dysport® pari a 1:4 e 1:3. Sito di iniezione, muscolo iniettato e volume utilizzato sono risultati uguali per tutti i pazienti. I risultati di tale studio hanno evidenziato, in maniera statisticamente significativa, risultati clinici migliori per entrambe le dosi di Dysport® rispetto al Botox® in base alla riduzione dello score Tsui (Dysport® con rapporto 1:3 = 4.32; Dysport® con rapporto 1:4 = 4.89; Botox® = 3.22; p<0.05) ed alla riduzione della scala di dolore (Dysport® con rapporto 1:3 = 4.41; Dysport® con rapporto 1:4 = 5.37; Botox® = 2.59; p<0.05). È stato anche riportato che la durata media dell'effetto era maggiore di 25 giorni nel gruppo trattato con Dysport® con rapporto 1:4 rispetto al gruppo esposto a Botox® (p=0.02). L'incidenza degli eventi avversi era maggiore nel gruppo trattato con Dysport® (36% nel gruppo con rapporto 1:4 e 33% in quello con rapporto 1:3 versus 18% nel gruppo esposto a Botox®). Tale differenza era principalmente dovuta ad una maggiore incidenza di disfagia, astenia e disfonia nei gruppi esposti a Dysport®.

**Bhaumik e coll. (51)** hanno condotto uno studio su 17 (13 uomini e 4 donne) pazienti affetti da *distonia cervicale* e sottoposti a 29 sedute di tossina botulinica (Botox® o Dysport®). La dose media a livello del muscolo sternocleidomastoideo era di 210 ± 53.47 U di Dysport® e 46 ± 18.97 U di Botox® (ossia un rapporto di circa 4:1). Dopo iniezione, la risposta è stata osservata dopo una media di 9.7 ± 5.7 giorni e la durata media dell'effetto era di

15.56 ± 7.13 settimane. Un miglioramento significativo della disfagia si è osservato dopo 25 delle 29 sedute (86%). Gli Autori concludono che il trattamento con la tossina è sicuro ed efficace per il trattamento della distonia cervicale.

**Bhakta e coll. (53)** hanno condotto uno studio al fine di valutare gli effetti del trattamento e il profilo di sicurezza di Botox® e Dysport® in pazienti con grave *spasticità* agli arti superiori in seguito ad infarto. Sono stati reclutati 17 pazienti (8 uomini e 9 donne) con un'età media di 54,5 anni (16.3-68.5) e trattati con una singola iniezione intramuscolare di tossina (Botox® 200 MU e Dysport® 1000 MU, ossia in rapporto 1:5). Sono stati osservati benefici nell'arco di 2 settimane con una durata dell'effetto fino a 11 mesi. Non sono insorti particolari effetti indesiderati.

**Hesse e coll. (54)** hanno revisionato diversi studi clinici condotti in pazienti affetti da *spasticità* e trattati con Botox® e Dysport®, in cui si è evidenziato che l'iniezione intramuscolare di Dysport® 500-1500 U o Botox® 100-300U (rapporto tra le dosi di 5:1) può ridurre reversibilmente la spasticità agli arti inferiori e superiori. Tuttavia, gli studi in questione sono controllati con placebo, per cui non vi è alcun confronto diretto tra le due tossine.

**Sampaio e coll. (23)**, in una metanalisi pubblicata nel 2004, in cui è stata utilizzata la metodologia della Cochrane Review, hanno identificato 4 studi clinici comparativi (Sampaio, Odergren, Ranoux e Nussgens) di elevata qualità che hanno esaminato l'impiego della tossina botulinica in indicazioni neurologiche (*blefarospasmo*, *spasmo emifacciale* e *distonia cervicale*). Di questi studi, due hanno utilizzato un rapporto 1:4, uno un rapporto 1:3 ed in un altro studio sono stati impiegati come rapporti 1:3 e 1:4 in bracci separati. In questa analisi, gli Autori sono giunti alla conclusione che il rapporto 1:4 era troppo elevato mentre il rapporto 1:3 si avvicinava alla "bioequivalenza". Ciò non può essere considerato al di sopra di ogni ragionevole dubbio in quanto non sono stati stabiliti i margini definiti "a priori" degli intervalli di confidenza ed i parametri variavano in maniera significativa.

#### **Confronto tra Botox® e Xeomin®**

Sono stati condotti due studi clinici in pazienti con blefarospasmo e distonia cervicale che hanno messo a confronto Botox® e Xeomin®. Tali studi hanno dimostrato una non inferiorità nell'efficacia e nessuna differenza statisticamente significativa negli effetti collaterali quando è stato utilizzato un rapporto tra le dosi pari a 1:1 di Xeomin® rispetto a Botox® (55,56).

Nei suddetti trial il rapporto di conversione tra le dosi utilizzate (1:1) si è basato su uno studio di neurofisiologia condotto su 14 volontari sani, in cui era stata confrontata l'efficacia bloccante di 4 Unità di Xeomin® con quella associata a 4 Unità di Botox® sul muscolo estensore breve delle dita (65).

#### **Confronto tra Botox®, Dysport® e Myobloc®**

**Chapman e coll. (66)** hanno effettuato una revisione di 70 studi (randomizzati e controllati, prospettici e retrospettivi) riguardanti Botox®, Dysport® e Myobloc®. La dose media totale, utilizzata per il trattamento dei pazienti affetti da *distonia*, variava da 60 U a 374 U per Botox®, da 125 U a 1200 U per Dysport® e da 579 U a 19853 U per Myobloc®. Botox® è stato associato ad una percentuale significativamente più bassa (10.5%) di disfagia rispetto a Dysport® (26.8%), mentre Myobloc® era maggiormente associato a secchezza delle fauci (3.2-90.0%), anche se, a causa di un numero non sufficiente di studi, non è stato possibile il confronto statistico con le altre due tossine. La durata dell'effetto differisce tra le varie tossine (Botox® originale>Myobloc®>Botox® attuale>Dysport®). Secondo gli Autori, questa analisi evidenzia un profilo di tollerabilità diverso per le varie tossine e suggerisce che tali prodotti devono essere usati sulla base delle caratteristiche specifiche di ciascuna BT (dose, efficacia e sicurezza).

### **Sicurezza delle preparazioni disponibili**

Il profilo di diffusione delle diverse formulazioni della tossina è di estremo interesse poiché ne influenza la sicurezza dopo il trattamento. Ovviamente una attenta valutazione delle caratteristiche delle varie formulazioni può minimizzare questo rischio.

Nella maggior parte degli studi e delle revisioni relative al profilo di sicurezza dei prodotti a base di BT-A, gli eventi avversi di solito sono stati classificati in diverse categorie: reazioni a livello del sito di iniezione, disturbi oculari, neurologici e generali (nasofaringite, nausea, diarrea, artralgia, etc.).

In uno studio randomizzato in doppio cieco, in cui sono stati messi a confronto Botox® e Xeomin®, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative negli eventi avversi (67) e simili conclusioni sono state tratte in una revisione pubblicata in letteratura (68). In quest'ultimo studio gli Autori concludono affermando che i prodotti disponibili attualmente utilizzati sono molto simili per quanto riguarda il meccanismo e la durata d'azione e sono caratterizzati da un'elevata efficacia e da un'incidenza relativamente bassa di eventi avversi. Tuttavia, per ottenere il

massimo risultato con il minimo rischio di eventi avversi, i medici devono essere consapevoli delle differenze nei rapporti di conversione della dose tra i prodotti in quanto non sono interscambiabili.

La minore incidenza di eventi avversi osservati con Botox® negli studi clinici comparativi (46) è supportata dai dati di farmacovigilanza (1). In Brasile, l'Agencia Nazionale di Vigilanza Sanitaria ha riscontrato una maggiore incidenza di eventi avversi associati a trattamento con Dysport® (69). Nel periodo compreso tra gennaio 2003 e giugno 2006, in Brasile sono state vendute 124.813 fiale di Botox® e 70.810 di Dysport®. Il trattamento è risultato associato a 113 eventi avversi per Botox® e 414 per Dysport®, rispettivamente 1 evento/1000 fiale versus 6/1000 fiale. Questo tasso è stato confrontato con quanto riscontrato con una formulazione cinese di BT (*Prosigne Lanzhou Institute of Biological Products, China*) che è risultato associato ad un tasso pari a 4 eventi/1000 fiale.

Anche nel database dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*) è stato riscontrato un tasso maggiore di eventi avversi associato al trattamento con Dysport®.

In base ai dati acquisiti nell'arco di 5 anni da Francia, Germania, Italia, Spagna e Regno Unito, il tasso di segnalazione associato a tutte le indicazioni delle tossine è risultato in eccesso di  $7 \times 10^{-5}$  eventi per fiala di Dysport® venduta e  $3 \times 10^{-5}$  eventi per fiala di Botox® venduta (70).

L'incidenza di specifici eventi avversi in seguito al trattamento della distonia cervicale, come menzionato nel Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto dei diversi Paesi, è sintetizzata nella **Tabella 6**.

**Tabella 6.** Sintesi degli eventi avversi nello studio di Ranoux (41).

	<b>Botox®</b>	<b>Dysport® 1:3</b>	<b>Dysport® 1:4</b>
Dose media (range)	105 U (70–180)	315 U (210–540)	420 U (280–720)
Tutti gli eventi avversi	18%	33%*	36%**
Disfagia	4%	16%	17%
Astenia	4%	4%	13%
Disfonia	0%	6%	6%

\*Botox® versus Dysport® ( $p=0.06$ ); \*\*Botox® versus Dysport® ( $p=0.03$ ).

La disfagia rappresenta l'evento avverso maggiormente riportato e viene osservato con una maggiore incidenza a seguito del trattamento con Dysport®. Altri eventi includono vertigini, disturbi della vista, debolezza muscolare e secchezza delle fauci, tutti riportati con maggiore frequenza nei pazienti trattati con Dysport® rispetto a quelli esposti a Botox®.

Per quanto riguarda Neurobloc/Myobloc®, poiché la BT di tipo B ha un minor effetto sulla trasmissione colinergica neuromuscolare rispetto agli effetti sull'innervazione autonoma colinergica (ghiandole salivari, sudoripare, lacrimali e muscolatura liscia), il profilo di tollerabilità del sierotipo B è sostanzialmente differente dal sierotipo A. Anche basse dosi di BT di tipo B possono produrre frequenti eventi avversi autonomi (es. secchezza delle fauci, irritazione corneale, difficoltà nell'accomodazione e irritazione delle mucose nasali e genitali) (66). Pertanto, l'uso terapeutico del sierotipo B è limitato o può essere previsto solo in caso di fallimento terapeutico per immunogenicità al sierotipo A (20).

Non vi sono dati pubblicati disponibili relativamente a Xeomin®.

#### *Immunogenicità*

Una risposta immune è una possibile reazione avversa quando si iniettano prodotti contenenti proteine. Tale possibilità è certamente maggiore nel caso di iniezioni di dose elevate (es. distonia cervicale) rispetto a quando si usano quelle minori (es. blefarospasmo). Tale reazione immune può scaturire dalla formazione di anticorpi neutralizzanti verso la neurotossina con conseguenza perdita di efficacia della terapia. Lee e coll. (71) hanno dimostrato che le emoagglutinine che sono parte sia del Botox® che del Dysport® possono aumentare la risposta immune con la conseguente formazione di anticorpi portando anche all'aumento di concentrazione di interferone e interleuchina-6 (72). Tuttavia, una metanalisi che ha preso in considerazione l'impiego del Botox® in diverse indicazioni (2240 pazienti) riporta che la frequenza di formazione di anticorpi è molto bassa (dallo 0.28%, allo 0.49%) e che quindi sono veramente pochi coloro per i quali la terapia diventa inefficace (non *responders*) (73). Questa bassa incidenza di non *responders* a tutte le BT è confermata anche da altri studi (74,75).

La quantità di tossina che deve essere somministrata nelle varie sessioni di trattamento è varia e ciò è in primo luogo dovuto all'incidenza con cui le differenti preparazioni portano allo sviluppo di anticorpi neutralizzanti. Ciò è particolarmente vero per il Myobloc®, che richiede l'impiego di dosi elevate per raggiungere effetti clinici (76,77).

**Gli studi relativi all'efficacia e sicurezza delle diverse formulazioni contenenti la tossina botulinica sono sostanzialmente di non inferiorità e non chiariscono quale sia realmente il giusto rapporto tra le dosi per comparare gli effetti ottenuti da ciascuna di esse. Ciò avvalorava il fatto che non è possibile interscambiare le varie formulazioni semplicemente mediante un fattore di conversione e che tutti i fattori presi in considerazione nei precedenti paragrafi rendono uniche le singole specialità. Non vi sono, pertanto, elementi sufficienti per confrontare l'efficacia e la tollerabilità delle varie BT.**

## Differenze di classificazione delle diverse BT da parte delle Agenzie Regolatorie

Ad oggi, tutte le specialità medicinali a base di tossina botulinica, rientrano nella medesima classificazione ATC assegnata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, ovvero M03AX01 **(78)**. Il sistema di classificazione ATC è un sistema alfanumerico basato sul principio che ad ogni preparato farmaceutico è associato un solo codice. Nel sistema di classificazione ATC, i farmaci sono suddivisi in gruppi sulla base degli organi o apparati su cui agiscono e delle loro proprietà chimiche, farmacologiche e terapeutiche. La classificazione si articola su 5 livelli, di cui l'ultimo identifica il principio attivo.

Preparati che non possono essere inequivocabilmente classificati in un determinato gruppo sono codificati al IV livello con la lettera X, e questo è proprio il caso della codifica delle specialità medicinali a base di tossina botulinica; in aggiunta sostanze che ricadono in uno stesso IV livello ATC non devono essere considerate equivalenti dal punto di vista farmaco-terapeutico se i loro profili di meccanismo d'azione, effetti terapeutici e reazioni avverse differiscono. Di fatto, il sistema ATC non è da considerare come una classificazione strettamente terapeutica ed uno stesso principio attivo può ricevere più di un codice ATC se sono presenti prodotti chiaramente differenti per indicazione terapeutica, dosaggio e via di somministrazione. Per i farmaci in continua evoluzione è necessaria una regolare revisione della classificazione ATC; tuttavia prima di apportare modifiche alla classificazione è importante valutare i potenziali rischi per gli utilizzatori ed i benefici che tale variazione comporterebbe ed è comunque regola comune cercare di ridurre al minimo il numero di variazioni.

In tale ottica, pertanto, sono ad oggi ancora classificati con la stessa classe ATC sia i prodotti a base di tossina botulinica A (Botox®, Dysport® e Xeomin®) che quelli a base di tossina botulinica B (Neurobloc®), pur presentando caratteristiche differenti come già evidenziato nelle precedenti sezioni.

La FDA americana nel 2009 ha emesso e pubblicato sul proprio sito web un avviso di sicurezza attraverso il quale veniva disposto che tutte le tossine botuliniche commercialmente disponibili negli Stati Uniti dovevano essere identificabili in modo univoco con una denominazione comune specifica per ciascuna delle specialità medicinali in commercio. Quanto sopra al fine di minimizzare il rischio di errori medici correlati alla mancanza di intercambiabilità delle unità di tossina botulinica presenti in ciascuna formulazione **(79)**.

In funzione di ciò, le tossine botuliniche commercializzate negli USA sono attualmente denominate:

- Onabotulinumtoxin A (OnaA, nome commerciale Botox®)
- Abobotulinumtoxin A (AboA, nome commerciale Dysport®),
- Incobotulinumtoxin A (IncoA, nome commerciale Xeomin®).
- RimabotulinumtoxinB (nome commerciale Myobloc® - tossina botulinica di Tipo B).

Le suddette denominazioni sono riportate anche nei rispettivi fogli illustrativi autorizzati delle diverse specialità medicinali. Pertanto, la differente denominazione della FDA consente di confermare che le tossine botuliniche sono prodotte secondo diversi processi biologici, sono ottenute da differenti tecniche di isolamento e purificazione e derivano da diversi ceppi di *Clostridium Botulinum*.

Anche l'Agenzia Regolatoria canadese (Health Canada) ha pubblicato, nel mese di gennaio 2013, un comunicato in cui ha dichiarato di aver richiesto alle aziende produttrici di tossina botulinica (di tipo A e B) modifiche alla scheda tecnica relative alla non intercambiabilità delle diverse specialità. Il nome della tossina contenuta nelle diverse specialità ancora non è stato modificato, ma le aziende hanno un anno di tempo per apportare le dovute modifiche alla scheda tecnica **(80)**.

Pertanto, il più importante beneficio di una nuova denominazione/classificazione anche a livello Europeo, sulla base di quanto fatto dalla FDA e di ciò che è stato avviato dal Health Canada, consisterebbe nel dare una precisa identità alle differenti preparazioni di tossina botulinica, anche con l'aspettativa di migliorare il loro utilizzo nella pratica clinica **(35)**. La stessa Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), in accordo con l'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA), ha divulgato nel mese di febbraio 2013 importanti informazioni riguardanti la specialità NeuroBloc® (tossina botulinica di tipo B) e i rischi associati all'uso *off-label*, ad es. l'uso in bambini o in pazienti con malattia neuromuscolare significativa o l'uso di dosi superiori a quelle raccomandate. L'AIFA ha, quindi, raccomandato agli operatori sanitari di utilizzare tale specialità esclusivamente come indicato in scheda tecnica **(81)**.

## Conclusioni

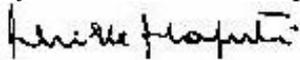
In conclusione, le BT contenute nelle diverse formulazioni disponibili sul mercato, pur avendo ad oggi a livello europeo la stessa denominazione e la stessa classificazione ATC, devono essere considerate diverse tra loro e, quindi, tutte preparazioni biologiche "originator" e, quindi, non intercambiabili. Le ragioni della non intercambiabilità sono riassunte come segue:

- diverso processo di produzione (lotto di partenza, preparazione, purificazione, conservazione, ecc.),
- diversa struttura,
- diverso peso molecolare,

- diversa distribuzione/diffusione,
- diversa curva dose-risposta,
- diverso rapporto  $DL_{50}/DE_{50}$ ,
- diversa potenza,
- diversa durata d'azione,
- diverso margine terapeutico,
- diverso profilo di efficacia e sicurezza,
- diversa composizione in eccipienti,
- diverso dosaggio,
- diverse indicazioni terapeutiche autorizzate.

**Si può, pertanto, concludere, sulla base di tutto quanto evidenziato nel presente documento, che tra le differenti formulazioni a base di tossina botulinica attualmente disponibili non vi è sovrapposibilità in senso assoluto né per i pazienti *naive* né per i pazienti in continuità terapeutica.**

*Prof. Achille Patrizio Caputi*



*Prof. Francesco Rossi*



## Bibliografia

1. Aoki KR, et al. Using translational medicine to understand clinical differences between botulinum toxin formulations. *Eur J Neurol* 2006; 13 Suppl 4: 10-9.
2. Dressler D, Hallett M. Immunological aspects of Botox, Dysport and Myobloc/NeuroBloc. *Eur J Neurol* 2006; 13 Suppl 1: 11-5.
3. Dressler D, Benecke R. Pharmacology of therapeutic botulinum toxin preparations. *Disabil Rehabil* 2007; 29: 1761-8.
4. Frevort J, Dressler D. Complexing proteins in botulinum toxin type A drugs: a help or a hindrance? *Biologics* 2010; 4: 325-32.
5. Chen F, Kuziemko GM, et al. Biophysical characterization of the stability of the 150-kilodalton botulinum toxin, the nontoxic component, and the 900-kilodalton botulinum toxin complex species. *Infect Immun* 1998; 66: 2420-5.
6. Hambleton P. Clostridium botulinum toxins: a general review of involvement in disease, structure, mode of action and preparation for clinical use. *J Neurol* 1992; 239: 16-20.
7. Foster KA, et al. Botulinum neurotoxin - from laboratory to bedside. *Neurotox Res* 2006; 9: 133-40.
8. Setler P. The biochemistry of botulinum toxin type B. *Neurology* 2000; 55 12 Suppl 5: S22-8.
9. Arnon SS, et al. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 2001; 285: 1059-70.
10. Black JD, Dolly JO. Interaction of 125I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 1986; 103: 535-44.
11. Francisco GE, et al. Do botulinum toxins have a role in the management of neuropathic pain? A focused review. *Am J Phys Med Rehabil* 2012; 91: 899-909.
12. Scheda tecnica di: Botox®, Dysport®, Xeomin®. Disponibile sul sito [www.codifa.it](http://www.codifa.it).
13. Direttiva 2001/83/CE come emendata; DLgs 219/2006 e successive modificazioni ed integrazioni.
14. Lietzow MA, et al. Subunit stoichiometry of the Clostridium botulinum type A neurotoxin complex determined using denaturing capillary electrophoresis. *Protein J* 2008; 27: 420-5.
15. Schantz EJ, Johnson EA. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol Rev* 1992; 56: 80-99.
16. Inoue K, et al. Molecular composition of Clostridium botulinum type A progenitor toxins. *Infect Immun* 1996; 64: 1589-94.
17. Johnson EA, Bradshaw M. Clostridium botulinum and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon* 2001; 39: 1703-22.
18. Hambleton P, et al. Production, purification and toxoiding of clostridium botulinum type A toxin. In: Lewis GE ed. *Biomedical Aspects of Botulism*. New York: Academic Press 1981; 247-60.
19. Dysport®: FDA approval. Disponibile sul sito [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_doc/nda/2009/125274s000\\_ChemR.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_doc/nda/2009/125274s000_ChemR.pdf).
20. Callaway JE. Botulinum toxin type B (Myobloc®): pharmacology and biochemistry. *Clin Dermatol* 2004; 22:23-8.
21. Huang W, et al. Pharmacology of botulinum toxin. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43 (2 Pt 1): 249-59.
22. Odegren T, et al. A double blind, randomised, parallel group study to investigate the dose equivalence of Dysport and Botox in the treatment of cervical dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 6-12.
23. Sampaio C, et al. Clinical comparability of marketed formulations of botulinum toxin. *Mov Disord* 2004; 19 Suppl 8: S129-36.
24. McLellan K, et al. Therapeutic botulinum type A toxin: factors affecting potency. *Toxicon* 1996; 34: 975-85.
25. Pearce LB, et al. Measurement of botulinum toxin activity: evaluation of the lethality assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 128: 69-77.
26. Hambleton P, Pickett AM. Potency equivalence of botulinum toxin preparations. *J R Soc Med* 1994; 87: 719.
27. Pearce LB, et al. Pharmacologic characterization of botulinum toxin for basic science and medicine. *Toxicon* 1997; 35: 1373-412.
28. Schantz EJ, Johnson EA. Dose standardisation of botulinum toxin. *Lancet* 1990; 335: 421.
29. Gazzetta Ufficiale n. 84 del 10/04/2012.
30. First ER, et al. Dose standardisation of botulinum toxin. *Lancet* 1994; 343: 1035.
31. Aoki KR. Preclinical update on BOTOX® (botulinum toxin type A)-purified neurotoxin complex relative to other botulinum neurotoxin preparations. *European Journal of Neurology* 1999; 6 Suppl 4: S3-S10
32. Aoki KR. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. *Toxicon* 2001; 39: 1815-20.
33. Tang-Lui DD, et al. Intramuscular injection of 125I-botulinum neurotoxin-complex versus 125I-botulinum-free neurotoxin: time course of tissue distribution. *Toxicon* 2003; 42: 461-9.
34. Aoki KR. Botulinum neurotoxin serotypes A and B preparations have different safety margins in preclinical models of muscle weakening efficacy and systemic safety. *Toxicon* 2002; 40: 923-8.

35. Albanese A. Terminology for preparations of botulinum neurotoxins: what a difference a name makes. *JAMA* 2011; 305: 89-90.
36. Brown M, et al. Comparative evaluation of the potency and antigenicity of two distinct BoNT/A-derived formulations. *J Neural Transm* 2013; 120: 291-8.
37. Dressler D, Benecke R. Autonomic side effects of botulinum toxin type B treatment of cervical dystonia and hyperhidrosis. *Eur Neurol* 2003; 49: 34-8.
38. Moreau SM, et al. A randomized comparative study of Dysport vs Botox in primary palmar hyperhidrosis. *Br J Dermatol* 2003; 149: 1041-5.
39. Nüssgens Z, Roggenkämper P. Comparison of two botulinum-toxin preparations in the treatment of essential blepharospasm. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997; 235: 197-9.
40. Dodd SL, et al. A comparison of the spread of three formulations of botulinum neurotoxin A as determined by effects on muscle function. *Eur J Neurol* 1998; 5: 181-6.
41. Ranoux D, et al. Respective potencies of Botox and Dysport: a double blind, randomised, crossover study in cervical dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72: 459-62.
42. Lange DJ, et al. Distant effects of locally injected botulinum toxin: a double-blind study of single fiber EMG changes. *Muscle Nerve* 1991; 14: 672-5.
43. Olney RK, et al. Neuromuscular effects distant from the site of botulinum neurotoxin injection. *Neurology* 1988; 38: 1780-3.
44. Marion MH, et al. Dose standardisation of botulinum toxin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 59: 102-3.
45. Sampaio C, et al. DYSBOT: a single-blind, randomized parallel study to determine whether any differences can be detected in the efficacy and tolerability of two formulations of botulinum toxin type A--Dysport and Botox--assuming a ratio of 4:1. *Mov Disord* 1997; 12: 1013-8.
46. Bihari K. Safety, effectiveness, and duration of effect of BOTOX after switching from Dysport for blepharospasm, cervical dystonia, and hemifacial spasm dystonia, and hemifacial spasm. *Curr Med Res Opin* 2005; 21: 433-8.
47. Marchetti A, et al. Retrospective evaluation of the dose of Dysport and BOTOX in the management of cervical dystonia and blepharospasm: the REAL DOSE study. *Mov Disord* 2005; 20: 937-44.
48. Bentivoglio AR, et al. Retrospective evaluation of the dose equivalence of Botox(®) and Dysport (®) in the management of blepharospasm and hemifacial spasm: a novel paradigm for a never ending story. *Neurol Sci* 2012; 33: 261-7.
49. Durif D. Clinical bioequivalence of the current commercial preparations of botulinum toxin. *European Journal of Neurology* 1995; 2: 17-18.
50. Vanden Bergh PY, Lison DF. Dose standardization of botulinum toxin. *Advances in Neurology* 1998; 78: 231-235.
51. Bhaumik S, Behari M. Botulinum toxin A--injection for cervical dystonia. *J Assoc Physicians India* 1999; 47: 267-70.
52. Rasmussen LN. Botulinum toxin. Use in the treatment of spasticity in children. *Ugeskr Laeger* 2000; 162: 6557-61.
53. Bhakta BB. Use of botulinum toxin in stroke patients with severe upper limb spasticity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61: 30-5.
54. Hesse S, et al. Botulinum toxin A treatment of adult upper and lower limb spasticity. *Drugs Aging* 2001; 18: 255-62.
55. Roggenkamper P, et al. Efficacy and safety of a new Botulinum Toxin Type A free of complexing proteins in the treatment of blepharospasm. *J Neural Transm* 2006; 113: 303-12.
56. Benecke R, et al. A new botulinum toxin type A free of complexing proteins for treatment of cervical dystonia. *Neurology* 2005; 64: 1949-51.
57. Prager W, et al. Treatment of crow's feet with two different botulinum toxin type A preparations in split-face technique. *Hautarzt* 2011; 62: 375-9.
58. Carruthers A, et al. Dilution volume of botulinum toxin type A for the treatment of glabellar rhytides: does it matter? *Dermatol Surg* 2007; 33 (1 Spec No.): S97-104.
59. Flynn TC. Botulinum toxin: examining duration of effect in facial aesthetic applications. *Am J Clin Dermatol* 2010; 11: 183-99.
60. Lagalla G, et al. Post-stroke spasticity management with repeated botulinum toxin injections in the upper limb. *Am J Phys Med Rehabil* 2000; 79(4): 377-84; quiz 391-4.
61. Gordon MF, et al; BOTOX Poststroke Spasticity Study Group. Repeated dosing of botulinum toxin type A for upper limb spasticity following stroke. *Neurology* 2004; 63: 1971-3.
62. Ascher B, et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy and safety of 3 doses of botulinum toxin A in the treatment of glabellar lines. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 223-33.
63. Ascher B, et al. Botulinum toxin A in the treatment of glabellar lines: scheduling the next injection. *Aesthet Surg J* 2005; 25: 365-75.
64. Fahn S. Clinical variants of idiopathic torsion dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989; Suppl: 96-100.
65. Jost WH, et al. Efficacy and tolerability of a botulinum toxin type A free of complexing proteins (NT 201) compared with commercially available botulinum toxin type A (BOTOX) in healthy volunteers. *J Neural Transm* 2005; 112: 905-13.

66. Chapman MA, et al. Comparison of botulinum neurotoxin preparations for the treatment of cervical dystonia. *Clin Ther* 2007; 29: 1325-37.
67. Wabbels B, et al. Double-blind, randomised, parallel group pilot study comparing two botulinum toxin type A products for the treatment of blepharospasm. *J Neural Transm* 2011; 118: 233-9.
68. Sattler G. Current and future botulinum neurotoxin type A preparations in aesthetics: a literature review. *J Drugs Dermatol* 2010; 9: 1065-71.
69. National Health Surveillance Agency (Brazil). Disponibile sul sito <http://www.anvisa.gov.br>.
70. World Health Organization. Disponibile sul sito <http://www.who.int>.
71. Lee JC, et al. Production of anti-neurotoxin antibody is enhanced by two subcomponents, HA1 and HA3b, of Clostridium botulinum type B 16S toxin-haemagglutinin. *Microbiology* 2005; 151 (Pt 11): 3739-47.
72. 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: 213-8.
73. Naumann M, et al. Meta-analysis of neutralizing antibody conversion with onabotulinumtoxinA (BOTOX®) across multiple indications. *Mov Disord* 2010; 25: 2211-8.
74. Dressler D, et al. Antibody-induced failure of botulinum toxin a therapy in cosmetic indications. *Dermatol Surg* 2010; 36 Suppl 4: 2182-7.
75. Eisele KH, et al. Immunogenicity of NT201 (Xeomin1) in Cynomolgus monkeys following high-dose injections. *Mov Disord* 2008; 23 Suppl 1: S15.
76. Aoki KR, Guyer B. Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions. *Eur J Neurol* 2001; 8 Suppl 5: 21-9.
77. Aoki KR. Pharmacology and immunology of botulinum toxin type A. *Clin Dermatol* 2003; 21: 476-80.
78. ATC structure and principles WHO Collaborating Centre. Disponibile sul sito [www.whooc.no/atc/structure\\_and\\_principles/if](http://www.whooc.no/atc/structure_and_principles/if). Introduction to drug utilization research "WHO International Working Group for Drug Statistics Methodology WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology 2003.
79. US Food and Drug Administration. FDA gives update on botulinum toxin safety warnings; established names of drugs changed. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm175013.htm>.
80. Health Canada. New Labelling Information for all Botulinum Toxin Products: Botox/Botox Cosmetic, Dysport, Xeomin/Xeomin Cosmetic and Myobloc. Disponibile all'indirizzo: [http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/advisories-avis/2013/2013\\_07-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/advisories-avis/2013/2013_07-eng.php).
81. Nota informativa importante concordata con le Autorità Regolatorie Europee e l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA). NeuroBloc (tossina botulinica di tipo B): rischi associati all'uso off-label. Febbraio 2013. Disponibile sul sito: [www.aifa.gov.it](http://www.aifa.gov.it).