

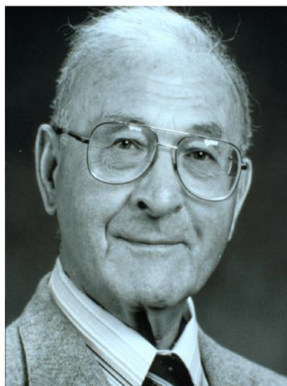
תסמונת אנגלמן – מהקליניקה אל טיפולים סימפטומטיים וגנטיים פוטנציאליים

ד"ר גלי חבצלת-היימר,
מנהלת מרפאת האנגלמן,
היחידה לנורולוגיה של הילד,
בית החולים ספרא לילדים,
המרכז הרפואי המשולב שיבא

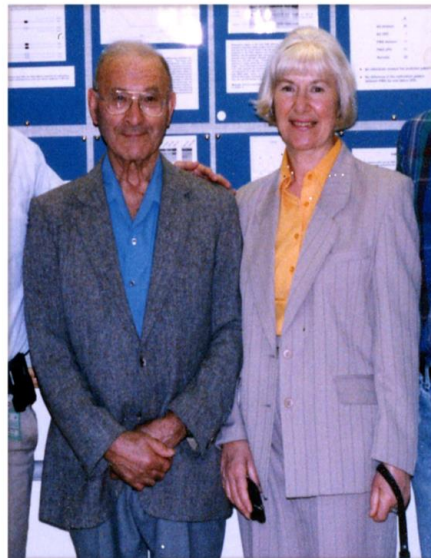
כנס משפחות תסמונת אנגלמן
המרכז הרפואי המשולב שיבא,

23/06/2016

Dr. Harry Angelman (1915-1996) and his wife, Audrey (1936-1999)



Harry and Audrey attended several ASF meetings and Audrey corresponded with many US families.



❖ תסמונת אנגלמן - קרויה ע"ש ד"ר הרי אנגלמן, רופא ילדים באנגליה

❖ ב-1965 – מאמר המתאר 3 ילדים עם תמונה דומה:
הליכה קופצנית, העדר שפה, נטייה לצחוק יתר ופרכוסים

❖ קרא לילדים – PUPPET CHILDREN ורק בהמשך השם הוחלף

אפידמיולוגיה

❖ שכיחות התסמונת ~ 1/15,000 לידות

❖ בארץ היקף משוער: מעל 400 ילדים ומבוגרים

❖ בנים ובנות בשכיחות דומה

❖ האבחנה נעשתה לרוב בין 2-5 ש', כשמאפייני העיכוב ההתפתחותי של השנה הראשונה והמראה נעשים ברורים וספציפיים יותר. **היום אפילו יותר מוקדם...**

❖ ב- 2005 נקבעו קריטריונים אבחנתיים

קריטריונים קבועים (consistent) – מופיעים ב-100% מהחולים

1. איחור התפתחותי משמעותי

2. הפרעת תנועה הכוללת:

הפרעה בשיווי משקל (אטקסיה), הליכה קופצנית ורעד גס בתנועת הגפיים

3. מאפיינים התנהגותיים ייחודיים:

חייכניים, פעלתניים, נטייה להתרגשות יתר מלווה בהרמת הידיים ותנועות נפנוף.

4. קושי שפתי ניכר: כמעט ואין שימוש במילים, יכולות ההבנה גבוהות מההבעה.

מרכיבים הנמצאים בשכיחות גבוהה (מעל 80%)

1. האטה בעליה בהיקפי הראש.

- מתבטאת במיקרוצפליה קלה עד גיל שנתיים (ה.ר בד"כ תקינים בלידה)

2. פרכוסים.

- לרוב מופיעים לפני גיל 3 שנים.

- יש נטיית יתר לפרכוסים בחום.

- חומרתם לרוב יורדת עם הגיל אך הפרכוסים נמשכים גם לבגרות

3. תרשים EEG טיפוסי.

- יכול להופיע גם בשנתיים הראשונות לחיים עוד לפני הפרכוסים והמרכיבים האחרים ולא בהתאמה לפרכוסים

קריטריונים קשורים לתסמונת (20-80%)

מראה אופייני –

1. השטחה אחורית של הגולגולת (בראכיפליה)

2. לשון בולטת

3. נטייה להוצאת והכנסת לשון המביאה לקשיי מציצה/בליעה

4. לסת תחתונה בולטת (פרוגנטיזם) – נהייה יותר בולט עם הגיל

5. פה רחב עם שיניים "מרוחקות"

6. נטייה לפזילה

7. עור, שיער וצבע עיניים בהירים יחסית לבני משפחה אחרים (רק במקרי החסר בכרומוזום 15)

8. עקמת בגיל מבוגר יותר

קריטריונים קשורים לתסמונת (20-80%) – המשך

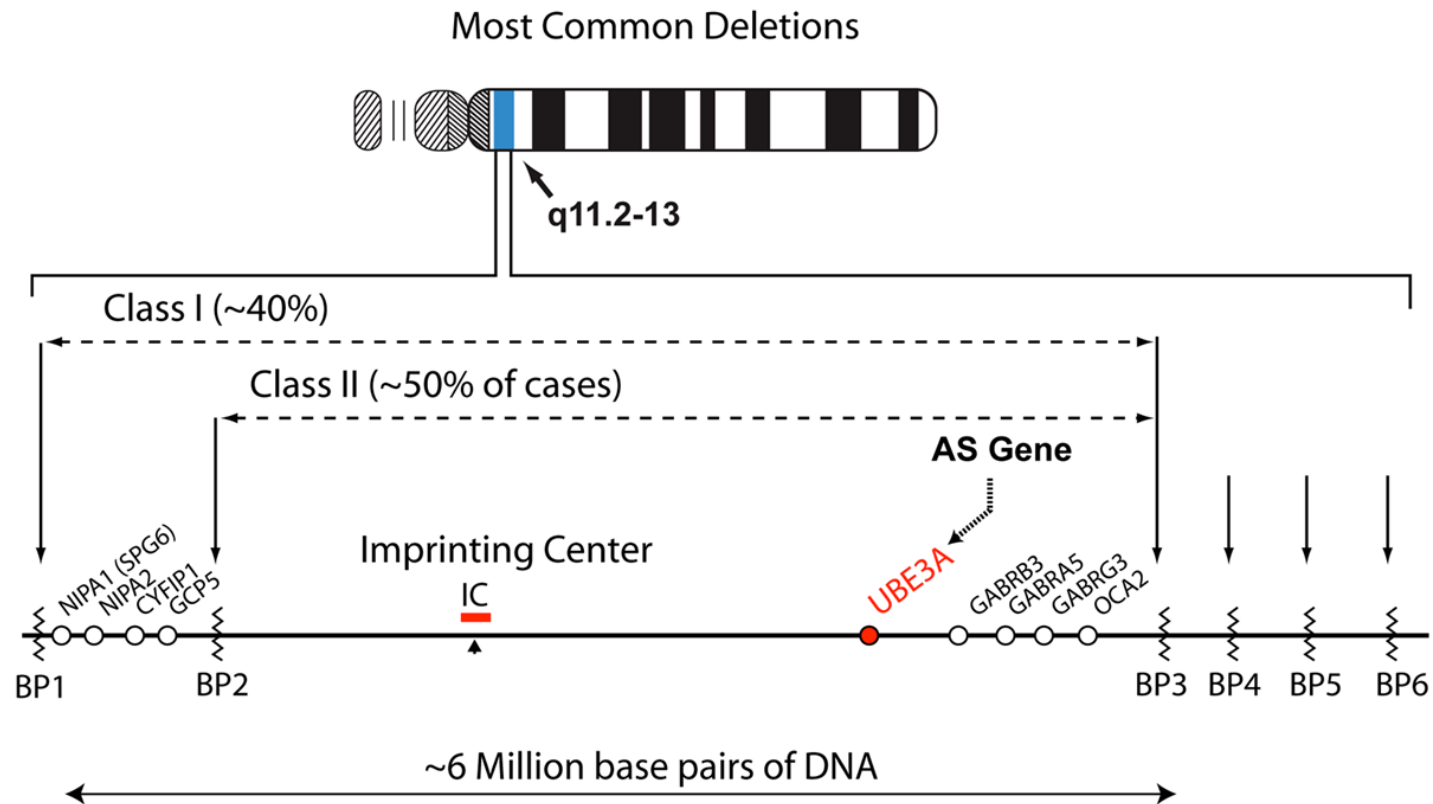
מאפיינים נוירולוגיים והתנהגותיים -

1. היפוטוניה אקסיאלית ניכרת בינקות (טונוס גפיים יתכן גבוה)
2. קשיי אכילה ו- GERD בינקות
3. עצירות
4. ריור יתר
5. נטייה להכנסת חפצים לפה
6. הפרעת שינה (קשיי הרדמות, יקיצות מרובות, סה"כ שינה מועטה)
7. משיכה למים ולחפצים מרשרשים
8. הליכה על בסיס רחב וקצות האצבעות
9. נטייה להרמת ידיים כפופות בהליכה
10. החזרים גידיים ערים

The diagram illustrates the hierarchy of genetic material. On the left, a **Chromosome** is shown as a large, X-shaped structure composed of two sister chromatids. A bracket indicates that a portion of the chromosome contains a specific **DNA** molecule, represented by a double helix. This DNA molecule is further divided into two regions labeled **Gene 1** and **Gene 2**. A final bracket shows that these genes are composed of specific sequences of nucleotides, represented by colored blocks (A, T, C, G) in a grid.

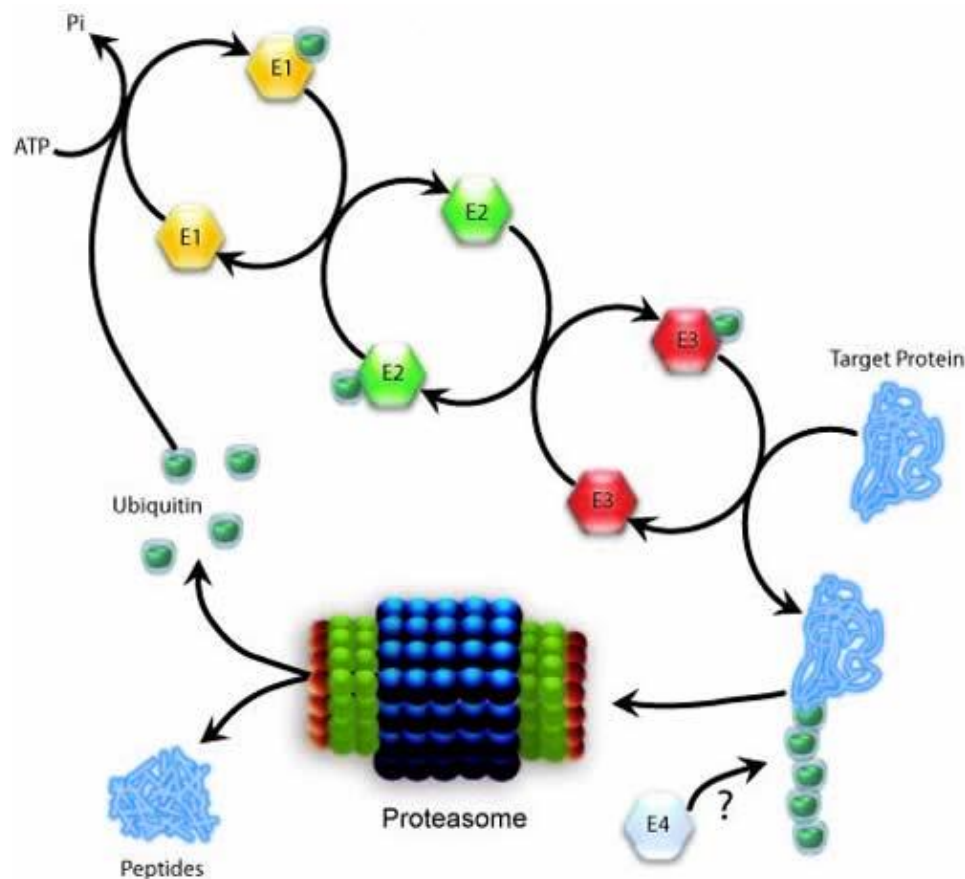
הבסיס הגנטי בתסמונת אנגלמן - המשך

החסר הגנטי בתסמונת אנגלמן – נמצא על כרומוזום 15 האימהי



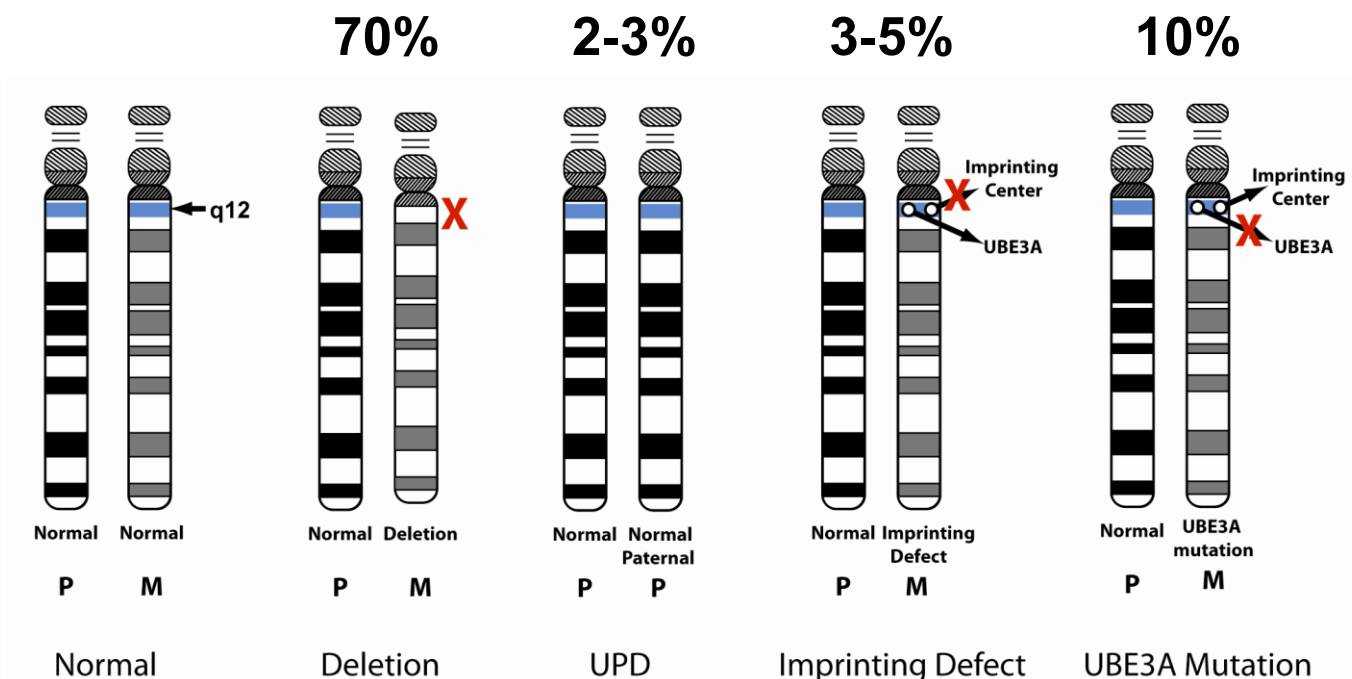
הבסיס הגנטי לתסמונת אנגלמן - המשך

UBE3A אחראי על סימון חלבונים המיועדים לפירוק



הבסיס הגנטי לתסמונת אנגלמן - המשך

בכל המנגנונים הגנטיים העותק האבהי של UBE3A שמור



טיפול לאפילפסיה

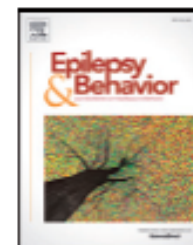
עדכונים מהעולם - מאמר ממאי 2016:



Contents lists available at ScienceDirect

Epilepsy & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yebeh



Seizure treatment in Angelman syndrome: A case series from the Angelman Syndrome Clinic at Massachusetts General Hospital

Elias A. Shaaya, Olivia R. Grocott, Olivia Laing, Ronald L. Thibert *

Angelman Syndrome Clinic, Department of Neurology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, United States



טיפולים לאפילפסיה - המשך

❖ מחקר רטרוספקטיבי על תיקי חולים בין השנים 2008-2015

❖ סה"כ 153 ילדים ובוגרים

❖ מתוכם "נפסלו": 7 – היעדר אבחנה גנטית, 7- קיום אבחנה גנטית

נוספת, 49 – לא היו במעקב קבוע, 5 – קיום תופעות לא אפילפטיות ממסכות.

❖ נותרו 85 חולים: - גילאי 3-38 (ממוצע 12.4 שנים)

- 48 זכרים, 37 נקבות

טיפולים לאפילפסיה - המשך

- ❖ 63 מתוך ה-85 חולים (74%) סבלו מאפילפסיה
- ❖ סוגי הפרכוסים – טונים קלונים כללים, מיוקלונים, אטונים, אבסנס, IS
- ❖ פילוג שכיחות האפילפסיה בין הסוגים הגנטיים השונים:

Table 1

Subject distribution among genetic subtypes and epilepsy rates.

Genetic diagnosis	With seizures	Without seizures	Total
Deletion	49 (88%)	7 (22%)	56 (66%)
UBE3A	8 (57%)	6 (43%)	14 (16%)
UPD	4 (40%)	6 (60%)	10 (12%)
Imp center	2 (40%)	3 (60%)	5 (6%)
Totals:	63 (74%)	22 (26%)	85

טיפולים לאפילפסיה - המשך

❖ פירוט התרופות השונות ומידת יעילותן:

Table 2

Breakdown of change in seizure frequency for the different treatments.

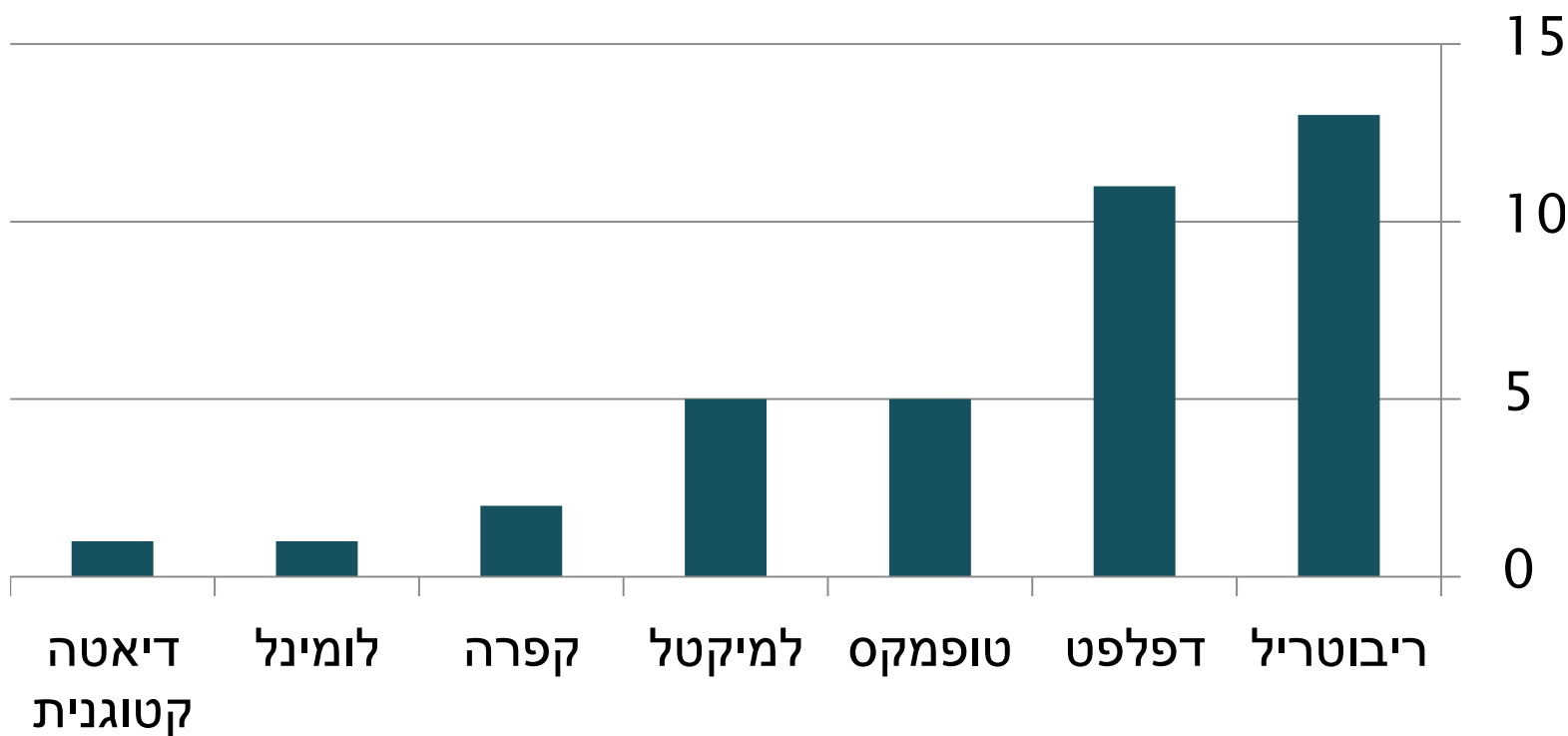
Treatment	No change	Less than 50%	Between 50 and 90%	Greater than 90%
VPA	0	0	8 (33.3%)	16 (66.7%)
LEV	0	0	5 (14.3%)	36 (87.8%)
LTG	0	0	2 (11.1%)	16 (88.9%)
CLB	2 (7.1%)	0	2 (6.9%)	27 (93.1%)
TPM	0	1 (12.5%)	4 (50%)	3 (37.5%)
CLZ	0	0	3 (50%)	3 (50%)
LGIT	0	0	2 (16.7%)	10 (83.3%)

VPA = דפלפט, LEV = קפרה, LTG = למיקטל, CLB = פריזיום, TPM = טופמקס,

CLZ = ריבוטריל, LGIT = דיאטה קטוגנית

טיפול לאפילפסיה - המשך

טיפולים אנטיאפילפטיים במרפאה שלנו:



טיפולים לאפילפסיה – טיפולים "טבעיים"

"טבעי" הוא לא בהכרח עם פחות תופעות לוואי מתרופה סינטטית!!!



טיפול לאפילפסיה – דיאטה קטוגנית

KETOGENIC DIET



❖ מדובר על דיאטה עתירת בשומנים (80-90%)
ודלה בפחמימות (10-20%).

❖ לפי מאמר נוכחי – ב- 10 מתוך 12 (83%) הביא להורדת פרכוסים
ביותר מ 90% וב- 2 נוספים להפחתה של יותר מ-50%.

❖ במאמר אחר מ 2012 – ב 5 מתוך 6 חולים (83%) הייתה הפחתה של
יותר מ 80% בפרכוסים. (Thibert et al, Epilepsia 2012)

❖ מרפאת האנגלמן בהולנד מתחילה בימים אלו מחקר נוסף לגבי דיאטה
קטוגנית לאפילפסיה באנגלמן.

טיפול לאפילפסיה – דיאטה קטוגנית

KETOGENIC DIET



חסרונות:

1. קשה ליישום עבור המשפחה
2. קל מאוד לשבירה (צריכה חד פעמית של ביסקוויט יכולה לקלקל את האפקט למספר ימים)
3. יתכנו בעיות בריאותיות לטווח ארוך – הפרעות גדילה, כבד שומני, יתר כולסטרול ושומנים, פגיעה בצפיפות עצם, אבני כילייה ועוד.
4. בד"כ מדובר על תוספת לתרופות אנטיפרוסיות ולא לבד

טיפולם לאפילפסיה – קנביס רפואי



❖ מחקרים עדכניים בודקים יעילותו בטיפול באפילפסיה בילדים



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Seizure

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yseiz



CBD-enriched medical cannabis for intractable pediatric epilepsy
The current Israeli experience



Michal Tzadok^{a,1,*}, Shimrit Uliel-Siboni^{b,1}, Ilan Linder^c, Uri Kramer^b, Orna Epstein^d,
Shay Menascu^b, Andrea Nissenkorn^a, Omer Bar Yosef^a, Eli Hyman^d, Dorit Granot^e,
Michael Dor^f, Tali Lerman-Sagie^c, Bruria Ben-Zeev^a

טיפולם לאפילפסיה – קנביס רפואי



תוצאות המחקר הישראלי:

❖ 130 מטופלים בין גיל 1-32 ש' טופלו במשך לפחות 3 חודשים

❖ לכולם אפילפסיה עמידה

- בכולם היה כישלון עם לפחות 5 תרופות

- ב-60% היה כישלון של מעל 10 תרופות

- ב-40% היה כישלון גם של דיאטה קטוגנית וקוצב וגאלי

❖ מעל 90% עם פגיעה קוגניטיבית ברקע

❖ הוחרגו חולים עם הפרעות התנהגות קשות או הפרעות פסיכיאטריות

טיפולים לאפילפסיה – קנביס רפואי



תוצאות המחקר הישראלי - המשך:

- 5% - ללא פרכוסים כלל
- 15% ירידה של מעל 75% בפרכוסים
- 12% ירידה של 50-75% בפרכוסים
- 26% - ירידה פחות מ 50% בפרכוסים
- 30% - ללא שינוי בפרכוסים
- 12% החמרה בפרכוסים

תופעות חיוביות:

- 24% שיפור בקשב והתנהגות
- 15% שיפור בשינה
- 11% שיפור בתיאבון

תופעות לואי:

- 12% - ישנוניות
- 5% - ירידה בתיאבון
- 7% - אגרסיביות או עצבנות

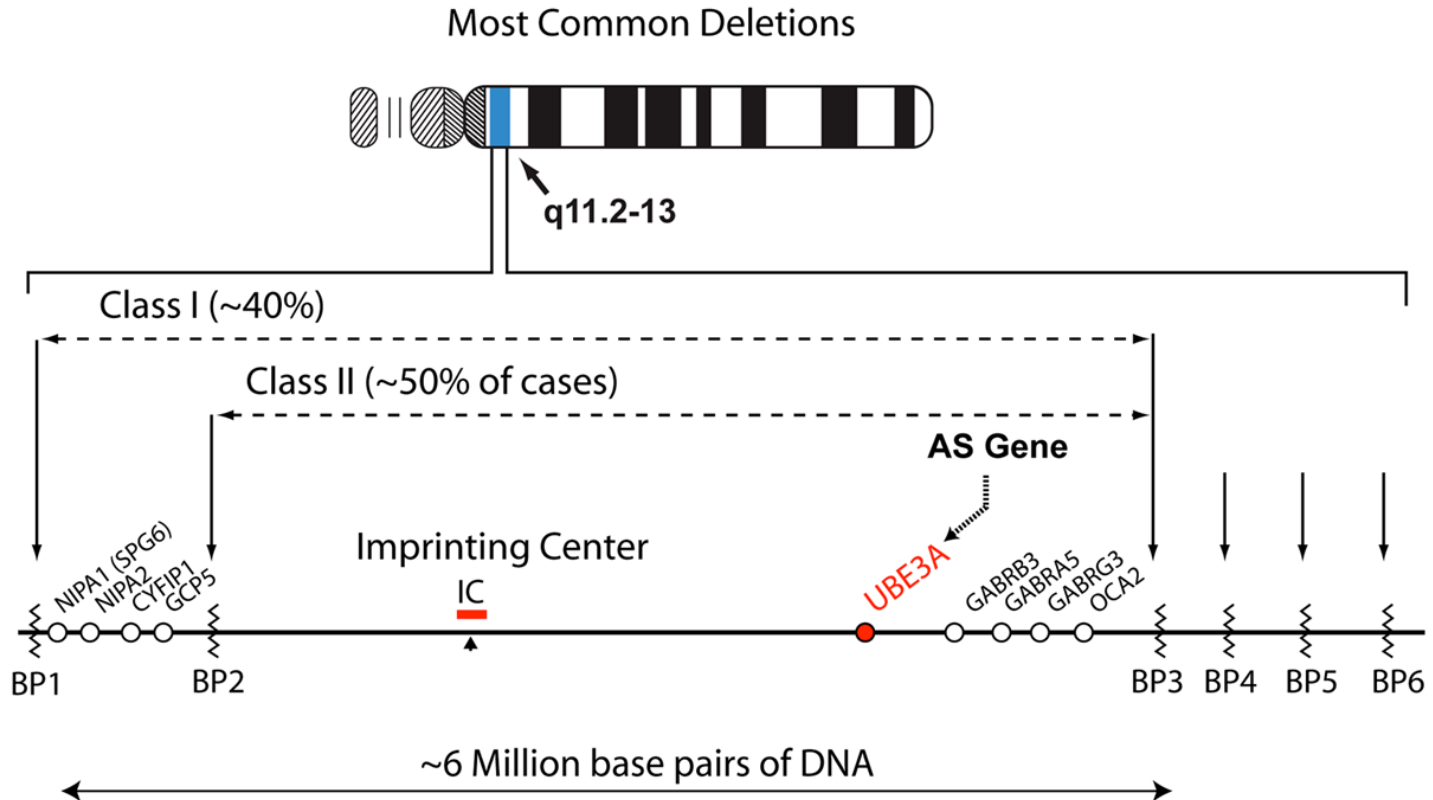
טיפולם לאפילפסיה – קנביס רפואי



חסרונות:

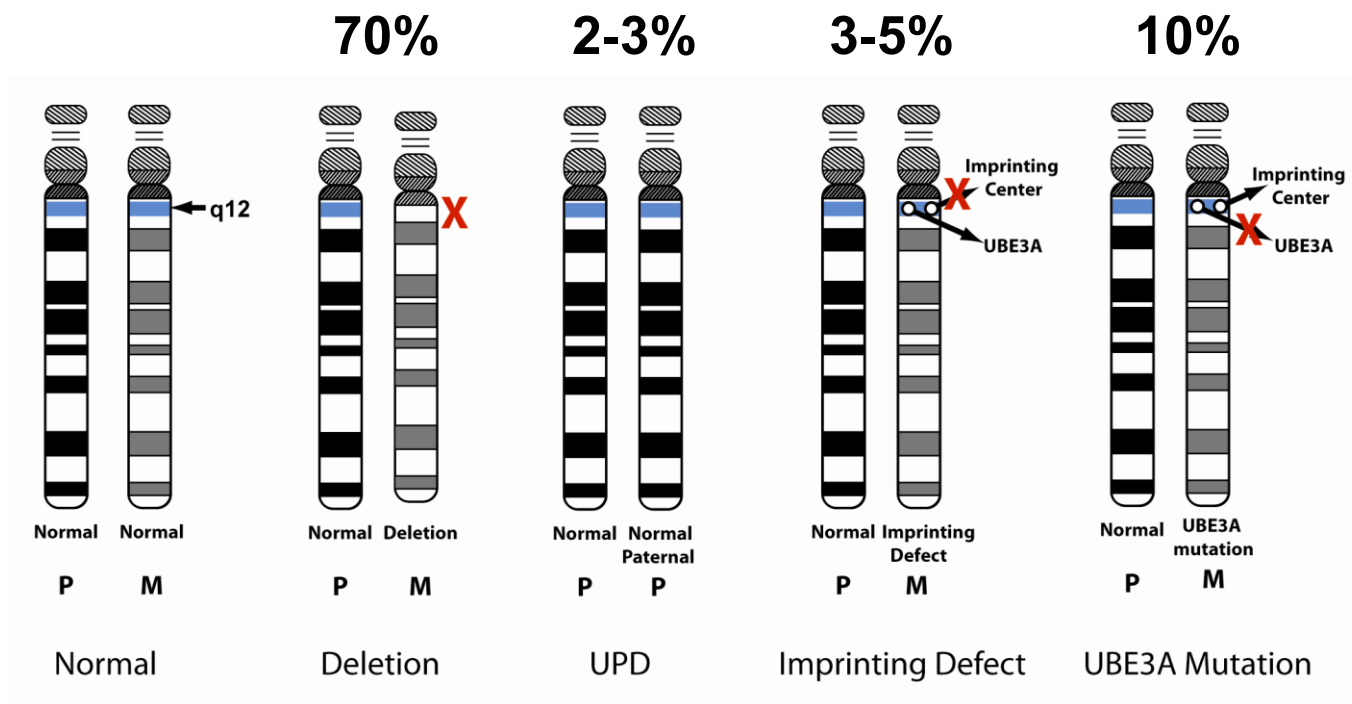
- ❖ רוב התכשירים מכילים בעיקר CBD אך גם כמויות קטנות של THC
- ❖ בעיית אספקה, ריכוז משתנה בין הפקות שונות, אין מדידת רמות בדם
- ❖ היעדר ניסיון מספק בטיפול בילדים בטווח ארוך (THC יכול לגרום פגיעה בזיכרון, בפגיעה בפוריות והפרעות פסיכיאטריות)
- ❖ אפשרות של החמרה בפרכוסים ו"התרגלות" של הגוף במקרים אחרים

הבסיס הגנטי בתסמונת אנגלמן - תזכורת

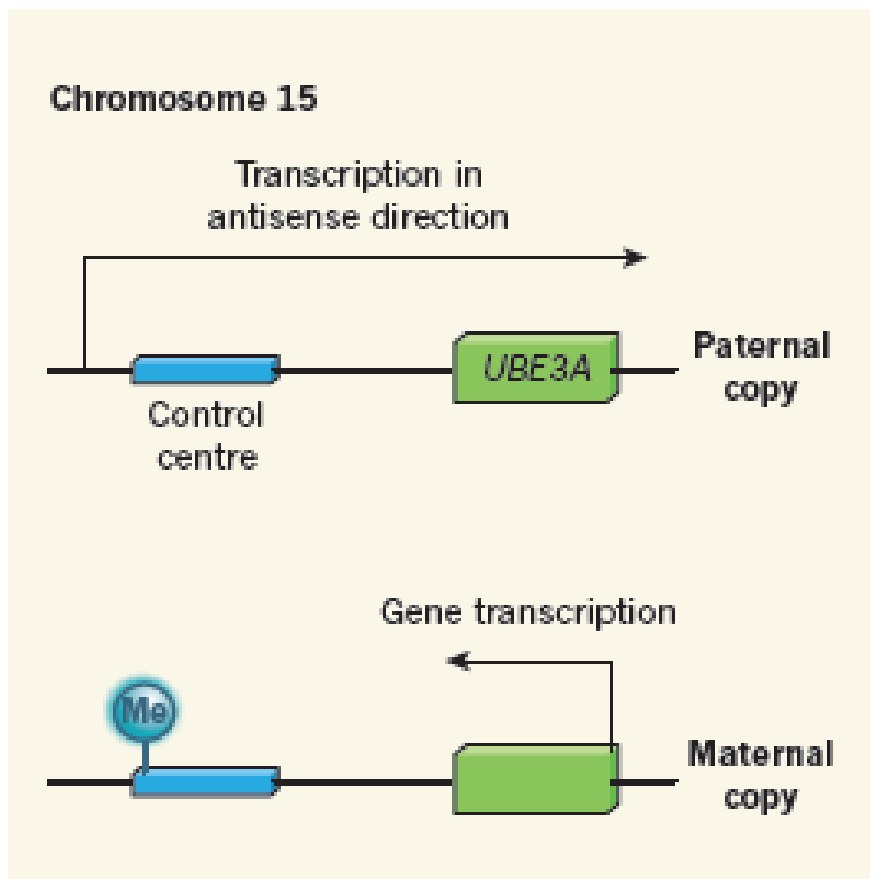


הבסיס הגנטי לתסמונת אנגלמן - תזכורת

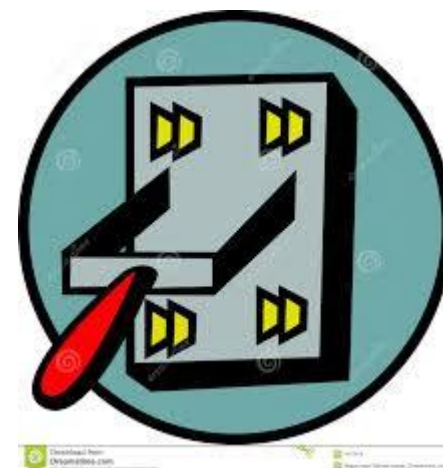
בכל המנגנונים הגנטיים העותק האבהי של UBE3A שמור אך מושחק



הבסיס הגנטי לתסמונת אנגלמן - תזכורת



ההשתקה של העותק
האבהי של הגן UBE3A
מתבצעת ע"י antisense



טיפולים גנטיים פוטנציאליים

2 אסטרטגיות:

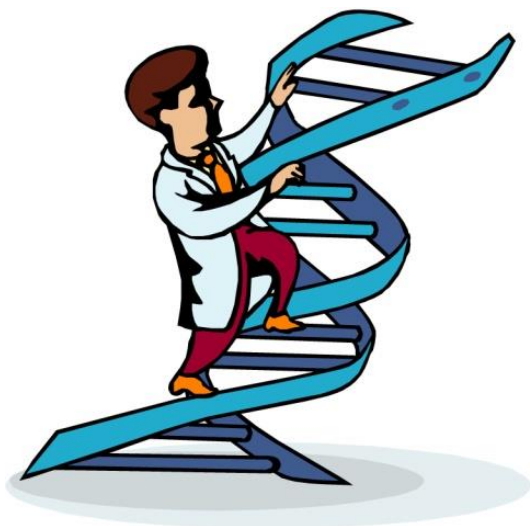
❖ החדרת עותק תקין של UBE3A

❖ ביטול ההשתקה הטבעית של הגן האבהי:

- מחקר ה- Topotecan

- מחקר ה- Antisense oligonucleotides

- מחקר ה- Zinc Fingers



טיפולים גנטיים פוטנציאליים – "Fire" – FAST Integrative Research Environment





החדרת עותק תקין של UBE3A - תזכורת למחקר של Ed Weeber

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Adeno-Associated Virus-Mediated Rescue of the Cognitive Defects in a Mouse Model for Angelman Syndrome

Jennifer L. Daily^{1,4}, Kevin Nash^{1,4}, Umesh Jinwal^{2,4}, Todd Golde^{5,6}, Justin Rogers^{1,4}, Melinda M. Peters^{1,4}, Rebecca D. Burdine³, Chad Dickey^{4,7}, Jessica L. Banko^{4,7}, Edwin J. Weeber^{1,4*}

1 Department of Molecular Pharmacology and Physiology, University of South Florida, Tampa, Florida, United States of America, **2** Department of Pharmacy, University of South Florida, Tampa, Florida, United States of America, **3** Department of Neuroscience, Princeton University, Princeton, New Jersey, United States of America, **4** University of South Florida Health Byrd Alzheimer's Institute, Tampa, Florida, United States of America, **5** McKnight Brain Institute, University of Florida, Gainesville, Florida, United States of America, **6** Center for Translational Research in Neurodegenerative Diseases, University of Florida, Gainesville, Florida, United States of America, **7** Department of Molecular Medicine, University of South Florida, Tampa, Florida, United States of America

החדרת עותק תקין של UBE3A - תזכורת למחקר של Ed Weeber

- ❖ יצרו ע"י הנדסה גנטית וירוס המכיל בתוכו עותק תקין של UBE3A
- ❖ הזריקו את הוירוס ישירות למח בעכברים בוגרים עם תסמונת אנגלמן
- ❖ ההזרקה הייתה לאזור במח שאחראי על למידה וזיכרון (היפוקמפוס) אך לא לאזור שאחראי על מוטוריקה עדינה.
- ❖ הראו שיפור ניכר במבחנים של למידה וזיכרון אך לא במוטוריקה העדינה.
- ❖ הראו שיפור בתפקוד החשמלי של תאי העצב הקשור ללמידה.

החדרת עותק תקין של UBE3A - עידכונים למחקר של Ed Weeber

❖ בהודעה לתקשורת בינואר 2016 באתר ה- FAST מודיעים על כוונה של חברת Agilis Biotherapeutics לבצע מחקר קליני המתבסס על העבודה של Ed Weeber.

❖ קיבלו לאחרונה הכרה של "orphan drug status" מה - FDA.

❖ במרץ 2016 – נערך outcome measure consortium ביוזמת החברה

❖ לו"ז צפוי:

- עד סוף 2016 אופטימיזציה של וקטור המותאם לאדם
- במהלך 6-12 חודשים נוספים – בדיקות בטיחות במודלים שונים של חיות
- במקביל:
- בודקים את דרך ההחדרה האופטימאלית למח (ניקור מתני, הזרקה ישירה)
- מכינים את פרוטוקול הניסוי
- בהמשך (כמה זמן?) ייצור וקבלת אישור FDA...

מחקר ה- Topotecan

Dr. Benjamin Philpot and Dr.
Marc Zylka, North Carolina
University



מחקר ה- Topotecan - המשך

ינואר 2012:

❖ הזרקה של Topotecan (כימותרפיה) לעכברים עם תסמונת אנגלמן הביאה לביטול ההשתקה של הגן האבהי.

LETTER

doi:10.1038/nature10726

Topoisomerase inhibitors unsilence the dormant allele of *Ube3a* in neurons

Hsien-Sung Huang^{1*}, John A. Allen^{2*}, Angela M. Mabb¹, Ian F. King¹, Jayalakshmi Miriyala¹, Bonnie Taylor-Blake¹, Noah Sciaky², J. Walter Dutton Jr¹, Hyeong-Min Lee², Xin Chen³, Jian Jin³, Arlene S. Bridges⁴, Mark J. Zylka^{1,5,6}, Bryan L. Roth^{2,5,6,7,8} & Benjamin D. Philpot^{1,5,6}

מחקר ה- Topotecan - המשך

- ❖ הזרקה של Topotecan ישירות למח בעכברים עם פגם ב- UBE3A (הגן של תסמונת אנגלמן) למשך שבועיים
- ❖ הורידה את ביטוי ה- antisense והעלתה ביטוי של UBE3A האבהי ללא השפעה על המתילציה במרכז ההחתמה
- ❖ האנזים האבהי שהתבטא היה בעל פעילות תקינה
- ❖ ההשפעה נותרה גם 12 שבועות מסיום הטיפול ב- Topotecan

מחקר ה- Topotecan - עידכונים

- ❖ בהמשך נמצא כי ההשפעה נותרה גם לאחר שנה מתום ההזרקות
- ❖ השפעת ה- Topotecan נבדקה על IPS שגודלו מחולים ונמצאה דומה לזו שהייתה בעכברים
- ❖ נבדקו 49 גנים נוספים הפועלים במנגנון ההחתמה ורק ה- UBE3A הושפע מה- Topotecan

מחקר ה- Topotecan - חסרונות

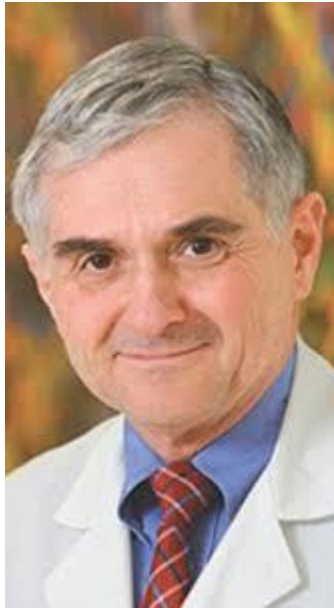
בעיות:

- ❖ רעילות - דיכוי פעילות סינפטית
- ❖ חדירות נמוכה של מחסום הדם-מח (BBB) ולכן ניתן ישירות לנוזל ה-CSF בזריקות לעמוד השדרה.
- ❖ פיזור בלתי אחיד במח
- ❖ טרם נוסה על חיות לבדיקת שיפור התנהגותי

מחקר ה- Topotecan – תוכניות עתידיות

- ❖ עובדים בשיתוף פעולה עם 2 מהמובילים בעולם בפיתוח תכשירים שהם מעכבי טופואיזומרז (Prof. Mark Cushman – אינדיאנה, NIH - Dr. Yves Pommier) ויש כבר כ- 30 תכשירים בעלי פעילות דומה הנבדקים כעת ל – אפקט ומשך השפעה, חדירות ופיזור אחיד במח, רעילות)
- ❖ לאחר שימצאו חומרים קנדידטים טובים יעשו הערכה התנהגותית בחיות.
- ❖ לא פורסמו עידכונים חדשים לגבי מחקר זה

מחקר ה- Antisense oligonucleotide



Arthur L. Beaudet – a professor of molecular and human genetics at Baylor College of Medicine



מחקר ה- Antisense oligonucleotide

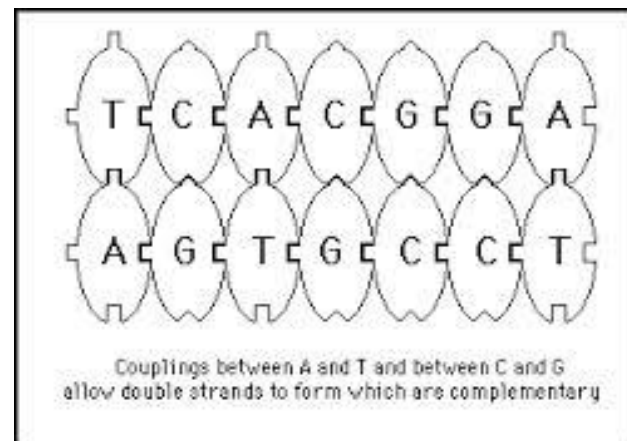
התוצאות פורסמו ב nature בפבואר 2015

LETTER

doi:10.1038/nature13975

Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA

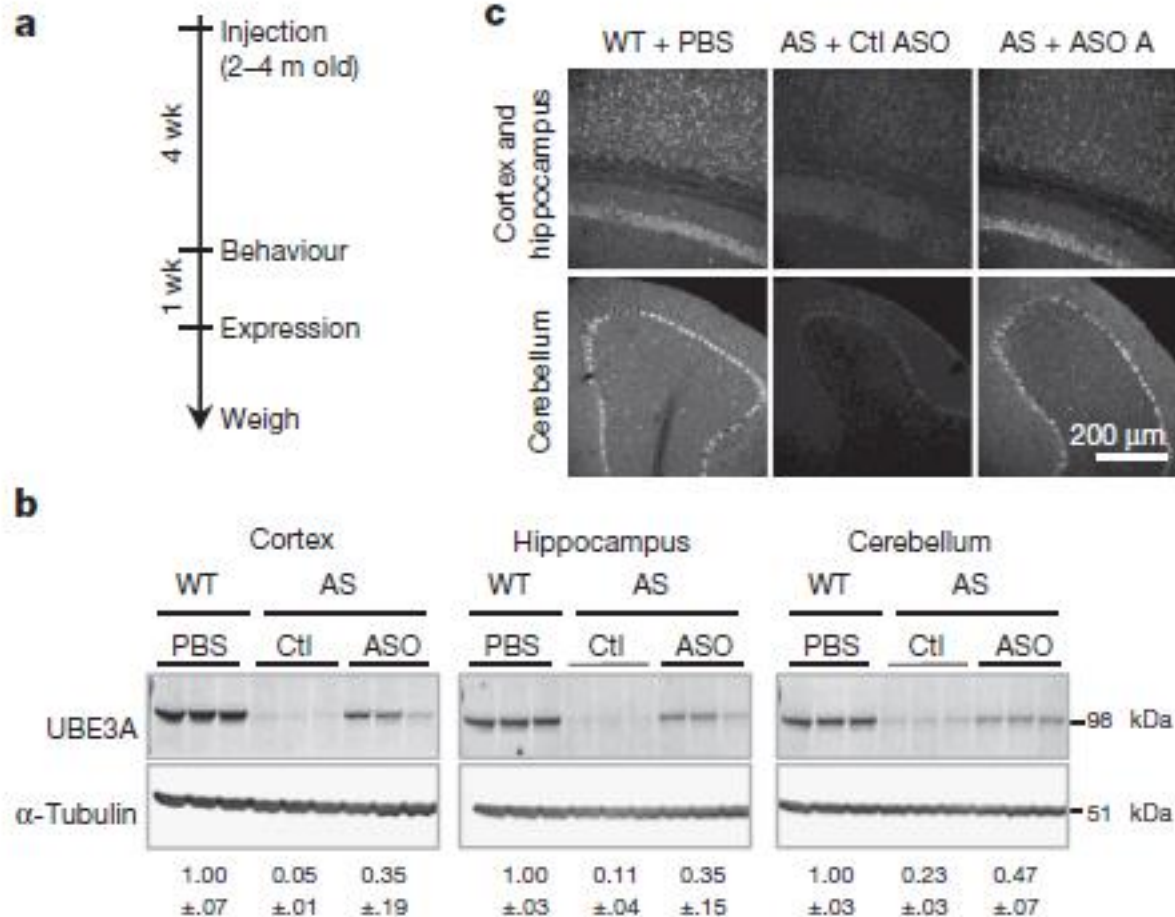
Linyan Meng^{1*}, Amanda J. Ward^{2*}, Seung Chun², C. Frank Bennett², Arthur L. Beaudet¹ & Frank Rigo²



Antisense oligonucleotide - המשך

- ❖ דרך תרביות נוירונים של עכבר אותר רצף של אוליגונוקלאוטידים הנקשרים ל- Antisense של ה- UBE3A בעכבר (ASOs)
- ❖ הזרקת ה- ASOs לנוזל חוט השדרה בעכברי תסמונת אנגלמן בני 2-4 ח' הביאה לירידה ברמת ה- Antisense ועליה בביטוי של ה- UBE3A האבהי.
- ❖ הביטוי המוגבר היה בכל אזורי המח.
- ❖ האפקט נשאר עד 5 חודשים לאחר הזרקת בודדת לפני שנעלם

Antisense oligonucleotide - המשך



Antisense oligonucleotide - המשך

חסרונות:

- ❖ מצריך הזרקה לנוזל חוט השדרה פעם בכמה חודשים.
לא צופה שתהיה בעתיד דרך מתן אחרת.
- ❖ עליית הביטוי של UBE3A האבהי הייתה פחות מאשר ב-WT ומנסים למצוא דרך לגרום לעליה משמעותית יותר בביטוי.
- ❖ הפנוטיפ בעכבר השתפר רק חלקית.
- ❖ טרם נבדק על תאים הומאנים וכעת עובדים למצוא ASOs התואמים ל-Antisense בבני אדם
- ❖ במאמר סקירה מהשנה – כותב Beaudet שעדיין בעבודה

מחקר ה- Zinc fingers



David Segal – an associate professor in protein engineering, UC Davis Genome Center





מחקר ה- Zinc fingers

original article

Official journal of the American Society of Gene & Cell Therapy

*MT*Open

Protein Delivery of an Artificial Transcription Factor Restores Widespread Ube3a Expression in an Angelman Syndrome Mouse Brain

Barbara J Bailus¹, Benjamin Pyles¹, Michelle M McAlister¹, Henriette O'Geen¹, Sarah H Lockwood¹, Alexa N Adams¹, Jennifer Trang T Nguyen¹, Abigail Yu¹, Robert F Berman² and David J Segal¹

¹Genome Center, MIND Institute, and Department of Biochemistry and Molecular Medicine, University of California, Davis, California, USA;

²Department of Neurological Surgery, University of California, Davis, California, USA

Segal et al, Molecular therapy, march 2016

מחקר ה- Zinc fingers - המשך



- ❖ ייצרו באופן מלאכותי פקטורי שיעתוק אשר מצד אחד מוצמדים ל- Zinc fingers המזהים את ה- UBE3A או ה- Antisense שלו ומצד שני מוצמדים לחלבונים קטנים "חודרי ממברנות".
- ❖ ניסו הגברת שיעתוק של ה- UBE3A או עיכוב שיעתוק של ה- Antisense. הגישה השנייה הייתה יותר מוצלחת.

מחקר ה- Zinc fingers - המשך

❖ הזריקו לפריטונאום (בטן) של עכברים עם תסמונת אנגלמן, גילו את הראש והראו ע"י סמן פלורוסנטי שהחלבון המלאכותי התפזר יפה בכל המח.

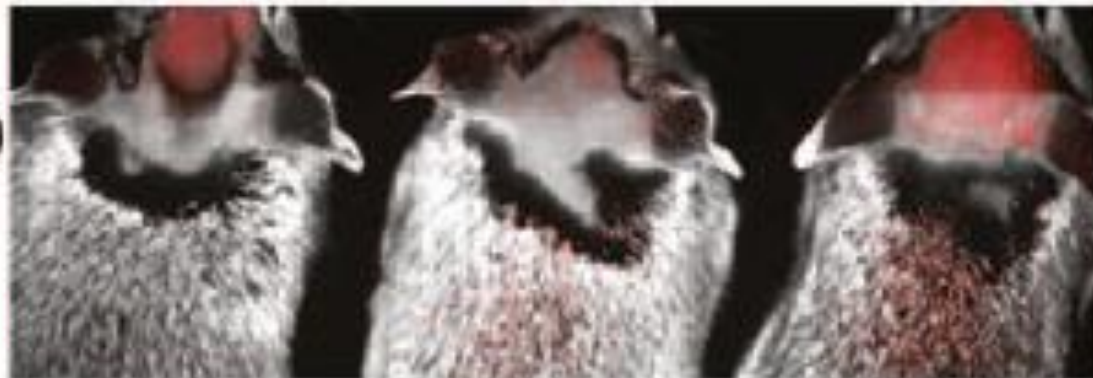
b



TAT-S1

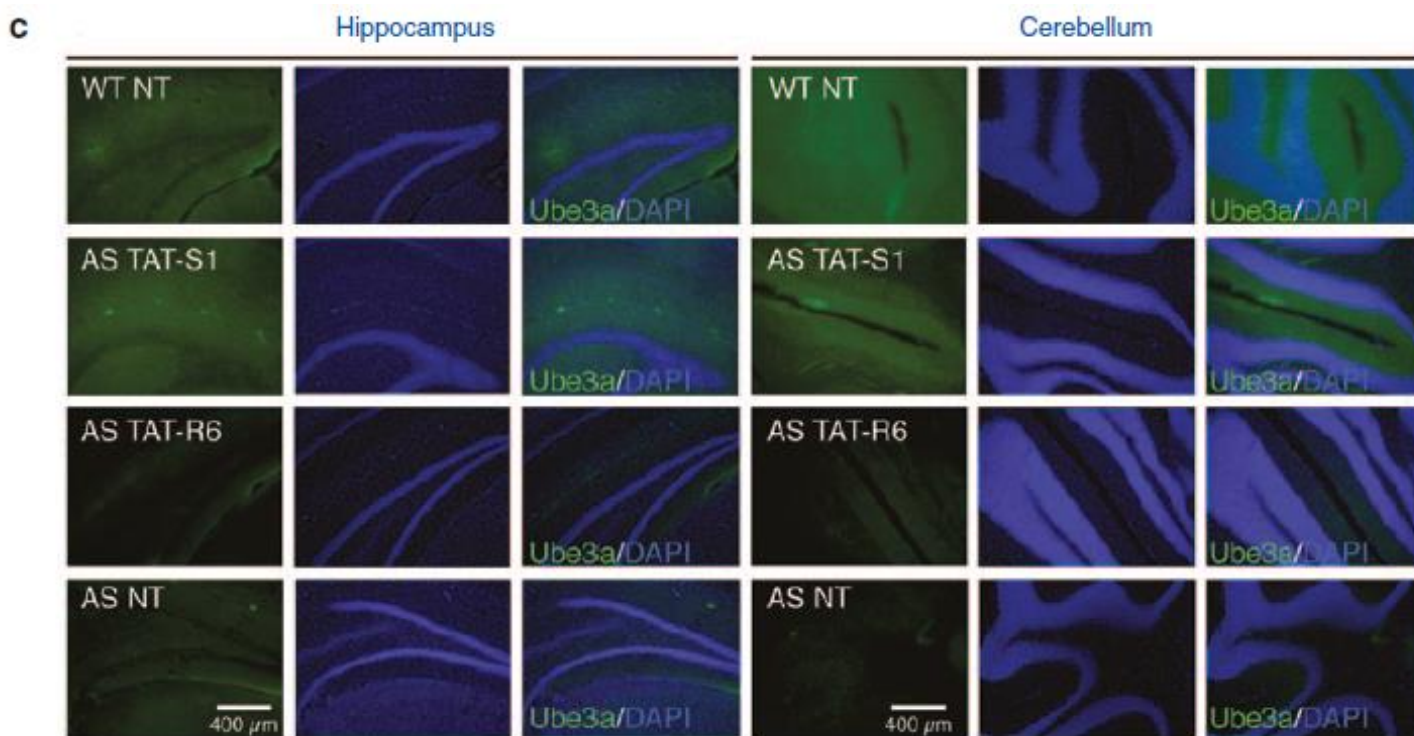
Mock

TAT-R6



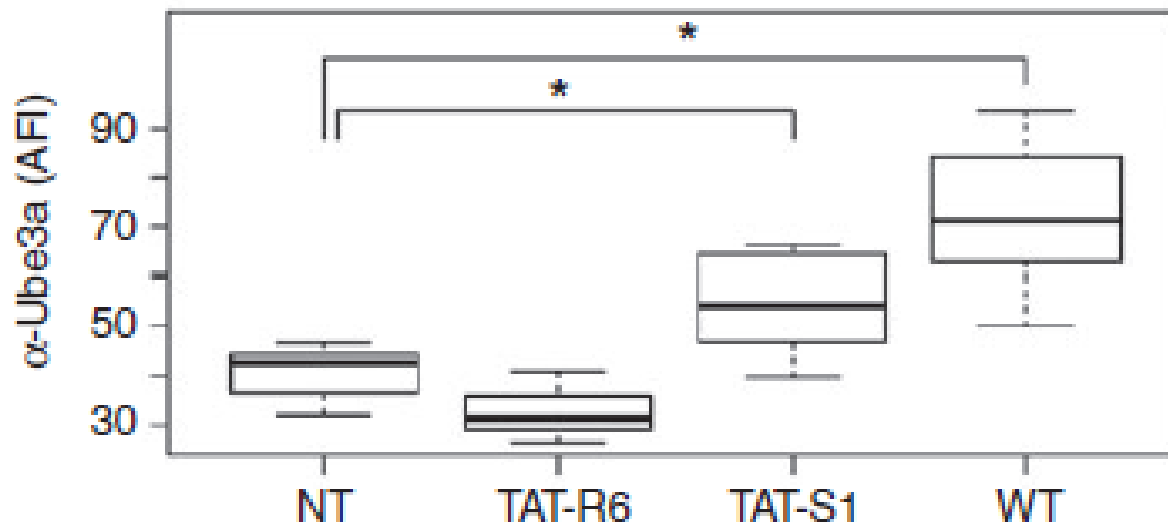
מחקר ה- Zinc fingers - המשך

❖ בהמשך הראו שיש עליה בביטוי של ה- UBE3A האבהי (אבל לא של חלבונים אחרים), גם בהיפוקמפוס (זיכרון) וגם בצרבלום (תנועה).



מחקר ה- Zinc fingers - המשך

d



❖ הודגם שיפור קל אך לא מובהק במבחנים התנהגותיים (קבירת גולות, טיפוס על סולם וריצה על מוט).

מחקר ה- Zinc fingers - המשך

יתרונות:

- ❖ יש חדירות טובה למח גם כשמזריקים לבטן ויש פיזור טוב במח
- ❖ בשל ספציפיות לתאי עצב בוגרים לא אמור לגרום לביטוי עודף של UBE3A ברקמות אחרות בגוף

חסרונות:

- ❖ העלייה בכמות החלבון הייתה חלקית בלבד
- ❖ גם השיפור הקליני היה קל בלבד.
- ❖ דרושות הזרקות חוזרות (במחקר הזריקו 3 פעמים בשבוע במשך חודש, 13 הזרקות) ויש חשש שתפתח אלרגיה לחלבון

מחקר ה- Zinc fingers - המשך

תכניות לעתיד:

❖ כעת נמצאים בתהליך יצירה של עכבר ראשון מסוגו עם חסר כמו בחולים. אמור לתת פנוטיפ יותר דומה לחולים.

❖ רוצים ליצר גם מודל של תסמונת אנגלמן בחזירים (בשיתוף עם Scott Dindot מטקסס).

❖ מתכננים לבדוק את החלבון המלאכותי על IPS מחולים.

❖ מנסים לייצר אפקט קבוע שלא יצריך הזרקות חוזרות מרובות.

