

Charlene:

Guten Tag. Guten Abend. Ich bin Charlene Son Rigby, die Präsidentin und Mitbegründerin der STXBP1-Stiftung. Ich freue mich darauf, unsere Forschungs-Webinar Reihe fortzusetzen. Diese Webinar Reihe ist Teil des STXBP1-Bewusstseins-Monats, der den ganzen September über stattfindet. Und heute heißen wir Jacqueline Burré, Debra Abramov, Noah Guiberson und Zach Grinspan willkommen. Jacqueline Burré, PhD, erhielt 2003 ihr Diplom in Biochemie von der Goethe-Universität in Frankfurt, Deutschland, und schloss ihr Doktoratsstudium in Biochemie und Neurobiologie ab. Für ihre Postdoc-Ausbildung trat sie in das Labor von Thomas Südhof an der University of Texas Southwestern und später an der Stanford University in Kalifornien ein. Im Jahr 2014 trat Dr. Burré dem Brain and Mind Research Institute der Weill Cornell Medicine in New York bei, wo ihr Labor frühe pathologische Ereignisse an der Synapse untersucht, die neurologische Störungen und Degenerationen auslösen. Dr. Zachary Grinspan, MD, MS ist Direktor des pädiatrischen Epilepsie-Programms bei Weill Cornell Medicine und dem New York Presbyterian Komanski Children's Hospital am Weill Cornell Medical Center. Er ist auch Assistenzprofessor für Pädiatrie und Population Health Sciences und hat einen Master of Science in Biostatistik. Darüber hinaus ist Dr. Grinspan der leitende Prüfarzt des pädiatrischen Epilepsie-Lerngesundheitsystems. PELHS ist ein nationaler Versuch, elektronische Daten für mehr als 10 akademische medizinische Zentren zu sammeln, um Projekte in den Bereichen Qualitätsverbesserung, vergleichende Wirksamkeit, Überwachung, Epidemiologie und gesundheitswissenschaftliche Forschung zu unterstützen. Ich möchte dem Cornell-Team für seine engagierte Arbeit im Bereich STXBP1 danken und dafür, dass es in großem Umfang zusammengearbeitet hat, um den ersten Arzneimittelkandidaten, der für STXBP1 in Frage kommt, von der Identifizierung der Verbindung 4-Phenylbutyrat bis zum baldigen Start des klinischen Versuchspiloten zu bringen. Bevor wir mit den Präsentationen beginnen, werden Sie sicher Fragen an unsere Referenten haben. Bitte klicken Sie auf die Q und A Schaltfläche am unteren Rand Ihres Zoom-Bildschirms und geben Sie dann Ihre Frage in diesem Fenster ein. Wir werden die Fragen bis zum Ende aller Präsentationen zurückstellen. Jetzt übergebe ich an Jacqueline.

Jacqueline:

Hallo zusammen. Debbie, wenn Sie sich den Bildschirm teilen könnten, wäre das großartig. Also vielen Dank, Charlene, für die freundliche Einführung. Vielen Dank an alle, die mitgemacht haben.



STXBP1 patient review & Targeted therapeutic strategies

Jacqueline Burré, Ph.D.
Noah Guiberson, M.Sc.
Debra Abramov, B.S.
Zachary Grinspan, M.D.



Wie Charlene bereits erwähnte, möchten mein Team und ich Ihnen ein Update über unsere Versuche geben, den Mechanismus zu definieren, der den STXBP1-Enzephalopathien zugrunde liegt, und vor allem über unser Ziel, gezielte therapeutische Ansätze zu entwickeln. Die nächste Folie, bitte. Ich werde damit beginnen, unser Team vorzustellen,

Overview

- Introduction to the team
- STXBP1 patient review
- STXBP1-targeted therapeutic approaches
- Update on the pilot clinical trial for 4-phenylbutyrate

damit Sie eine Vorstellung davon bekommen, wer daran arbeitet. Dann wird Debbie über eine Patientenrezension sprechen, die wir kürzlich veröffentlicht haben. Noah wird weiterhin kurz unsere Erkenntnisse über Krankheitsmechanismen und die drei chemischen Chaperone zusammenfassen, die wir bisher identifiziert haben. Und dann wird Debbie weiterhin unsere jüngsten Versuche beschreiben, kleine Moleküle zu identifizieren, die spezifisch gegen STXBP1 gerichtet sind. Und ich schließe mit einem kurzen Überblick über unsere laufenden und zukünftigen Studien. Und dann wird Dr. Grinspan mit der Aktualisierung unserer klinischen Pilotstudie schließen. Die nächste Folie, bitte. Wie Charlene bereits erwähnt hat, habe ich meinen Dokortitel in Biochemie erworben, und schon damals war ich sehr daran interessiert, wie Nervenzellen miteinander kommunizieren.

Introduction to the team



Jacqueline Burré

- 2006 Ph.D. in Biochemistry from Goethe University, Germany
- 2007-2014 Postdoc with Dr. Thomas C. Südhof at UTSW and Stanford University
- since 2014 Assistant Professor, Weill Cornell Medicine



scientopia.org

Debbie, wenn Sie bitte noch eine Folie anklicken. So, wir konzentrieren uns hier besonders auf diesen hier hervorgehobenen Bereich, der als Synapse bezeichnet wird. Das sind also die Kontaktstellen zwischen Nervenzellen, und dort sprechen sie miteinander. Und innerhalb dieser Struktur haben Sie kleine Bläschen, die hier in grün dargestellt sind. Sie werden synaptische Vesikel genannt und sie sind mit Chemikalien gefüllt, die im Wesentlichen die Transmitter sind und die die Neuronen zum Sprechen bringen. Und in diesem Prozess hier habe ich meine ganze Karriere verbracht. Ich habe an Alpha-Synuklein gearbeitet, das mit der Parkinson-Krankheit in Verbindung steht. Und sobald ich mein Labor begann, dachte ich, wir hätten die Werkzeuge, um STXBP1 zu untersuchen, und viele Mutationen im STXBP1 wurden veröffentlicht. Ich dachte also, wir hätten ein fantastisches Instrumentarium, um anzugehen, was schief läuft, wenn dieses Protein mutiert ist. Okay, die nächste Folie bitte.

Introduction to the team



Jacqueline Burré

- 2006 Ph.D. in Biochemistry from Goethe University, Germany
- 2007-2014 Postdoc with Dr. Thomas C. Südhof at UTSW and Stanford University
- since 2014 Assistant Professor, Weill Cornell Medicine



Noah Guy Lewis Guiberson

- 2015 B.S. in Molecular & Cellular Biology/Neuroscience from Johns Hopkins University
- 2015 M.S. in Neuroscience from Johns Hopkins University
- since 2015 Neuroscience graduate student

Nachdem ich in mein Labor angefangen hatte zu arbeiten, bekundete Noah kurz darauf, dass er Interesse hatte sich dem Labor anzuschließen. Ich konnte ihn kaum noch aus dem Labor herausbekommen. Er war so fasziniert davon, an dem Projekt zu arbeiten, dass er vom ersten Tag an bleiben wollte und nicht seine andere Kursarbeit machen wollte. Er arbeitet also sehr engagiert an STXBP1. Er hat unsere Anstrengungen bei der Identifizierung dessen, was falsch ist, wenn das Protein mutiert ist, ziemlich angeführt. Er hat auch unsere Ergebnisse angeführt, im Wesentlichen bei der Identifizierung der drei chemischen Chaperone. Und eines davon ist 4-Phenylbutyrat, das jetzt in diese klinische

Pilotstudie geht. Noah ist genau wie ich ein Grundlagenforscher und sehr gespannt darauf, in Zukunft ein eigenes Labor zu betreiben.

Introduction to the team



Jacqueline Burré

- 2006 Ph.D. in Biochemistry from Goethe University, Germany
- 2007-2014 Postdoc with Dr. Thomas C. Südhof at UTSW and Stanford University
- since 2014 Assistant Professor, Weill Cornell Medicine



Noah Guy Lewis Guiberson

- 2015 B.S. in Molecular & Cellular Biology/Neuroscience from Johns Hopkins University
- 2015 M.S. in Neuroscience from Johns Hopkins University
- since 2015 Neuroscience graduate student



Debra Abramov

- 2014 B.S. in Molecular Biophysics and Biochemistry from Yale University
- since 2015 M.D./Ph.D. student

Und dann haben wir Debbie, sie kam kurz darauf in das Labor. Debbie ist eine Doktorandin. Sie hat also die Last und die Aufregung, Medizinerin und Wissenschaftsdoktorin zu werden. Sie hat mich tatsächlich intensiv gebeten, einen Vortrag in diesem Programm halten zu dürfen, weil sie von unseren Studien fasziniert ist. So leitet sie im Wesentlichen die Bemühungen im Bereich der kleinen Moleküle, über die sie Ihnen heute ein wenig erzählen wird und über die wir ebenfalls sehr, sehr aufgeregt sind. Wir sind erst kürzlich dem New York Presbyterian Hospital angegliedert und unser Dekan bemüht sich die Forschung sozusagen ans Krankenbett zu bringen, und Joe hat mir auch die Hand gereicht.

Introduction to the team



Jacqueline Burré

- 2006 Ph.D. in Biochemistry from Goethe University, Germany
- 2007-2014 Postdoc with Dr. Thomas C. Südhof at UTSW and Stanford University
- since 2014 Assistant Professor, Weill Cornell Medicine



Noah Guy Lewis Guiberson

- 2015 B.S. in Molecular & Cellular Biology/Neuroscience from Johns Hopkins University
- 2015 M.S. in Neuroscience from Johns Hopkins University
- since 2015 Neuroscience graduate student



Debra Abramov

- 2014 B.S. in Molecular Biophysics and Biochemistry from Yale University
- since 2015 M.D./Ph.D. student



Joseph Chiaro

- 2014 Mbiotech, University of Pennsylvania
- 2018 M.D., The Philadelphia College of Osteopathic Medicine
- since 2018 Pediatric & Pediatric Neurology Residency, Weill Cornell Medicine/NYP

Er ist also Assistenzarzt in der pädiatrischen Neurologie, und er ist auch sehr interessiert an translationalen Bemühungen und insbesondere an STXBP1. Er wird also damit beginnen, alle unsere Wirkstoffe an einem ganzen Tier zu testen. Und zu guter Letzt gibt es Subhash, der vor kurzem eingestellt wurde.

Introduction to the team

Jacqueline



Jacqueline Burré

- 2006 Ph.D. in Biochemistry from Goethe University, Germany
- 2007-2014 Postdoc with Dr. Thomas C. Südhof at UTSW and Stanford University
- since 2014 Assistant Professor, Weill Cornell Medicine



Noah Guy Lewis Guiberson

- 2015 B.S. in Molecular & Cellular Biology/Neuroscience from Johns Hopkins University
- 2015 M.S. in Neuroscience from Johns Hopkins University
- since 2015 Neuroscience graduate student



Debra Abramov

- 2014 B.S. in Molecular Biophysics and Biochemistry from Yale University
- since 2015 M.D./Ph.D. student



Joseph Chiaro

- 2014 Mbiotech, University of Pennsylvania
- 2018 M.D., The Philadelphia College of Osteopathic Medicine
- since 2018 Pediatric & Pediatric Neurology Residency, Weill Cornell Medicine/NYP



Subhash Sinha

- 1987 Ph.D. In Medicinal Chemistry, Banaras Hindu University, India
- 1987-1994 Postdoctoral training at Tohoku University, Japan; Technion-Israel Institute of Technology, Israel; The Scripps Research Institute
- 1994 Assistant Professor, Scripps Research Institute
- 1999 Associate Professor, Scripps Research Institute
- 2013 Associate Professor, Rockefeller University
- since 2020 Associate Professor, Weill Cornell Medicine

Er ist ein medizinischer Chemiker, und er wird uns bei der Modifizierung unserer Leitverbindungen unterstützen. Und wir werden Ihnen später ein wenig darüber erzählen, was das bedeutet. Diese sollen im Wesentlichen besser funktionieren und weniger toxisch sein. Und damit übergebe ich an Debbie und dann an Noah und dann an Debbie, und dann werde ich schließen, also vielen Dank.

Debbie:

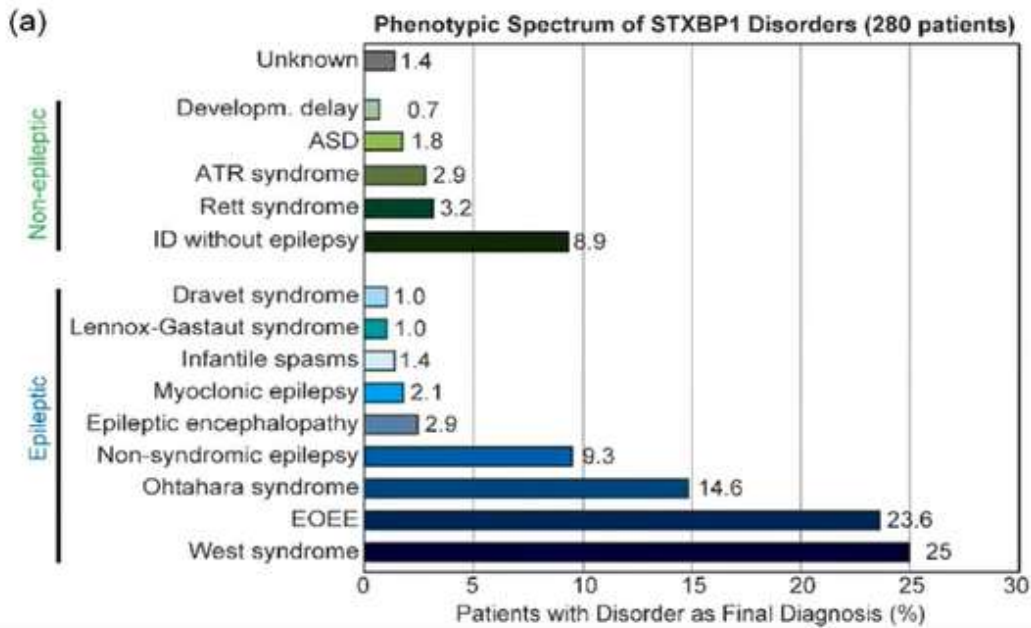
Okay. Vielen Dank, Jacqueline. Also, wie Jacqueline bereits erwähnte, ich bin Debbie Abramov. Ich bin eine MD PhD im Labor. Ich bin seit 2015 dabei, und ein Großteil meines Projekts hat sich auf die kleinen Moleküle konzentriert, die pharmakologischen Chaperone, die wir identifiziert haben. Anfang dieses Jahres arbeiteten Noah und ich daran, einen Bericht zu schreiben, der im Juni dieses Jahres veröffentlicht wurde. Wir hofften also, dass der Bericht eine Art Überblick darüber geben würde, was wir über STXBP1 als Teil einer Krankheit und auch über seine physiologische Rolle verstehen, wie es sich in einer Nervenzelle im Grunde genommen normal verhält und wie es sich verhält, wenn es eine Mutation gibt.

Und wir sprachen auch ein wenig über Tiermodelle für die Krankheit. Aber worauf ich mich hier konzentrieren möchte, ist nur eine Zusammenfassung unseres Rückblicks auf die Patienten, die wir gefunden haben und die mit STXBP1-Mutationen identifiziert wurden. Wir haben also alle Fallberichte durchgesehen, die wir finden konnten, als die Krankheit 2008 erstmals identifiziert wurde.

STXBP1 patient review



Debra Abramov



Abramov and Guiberson et al, J Neurochemistry, 2020

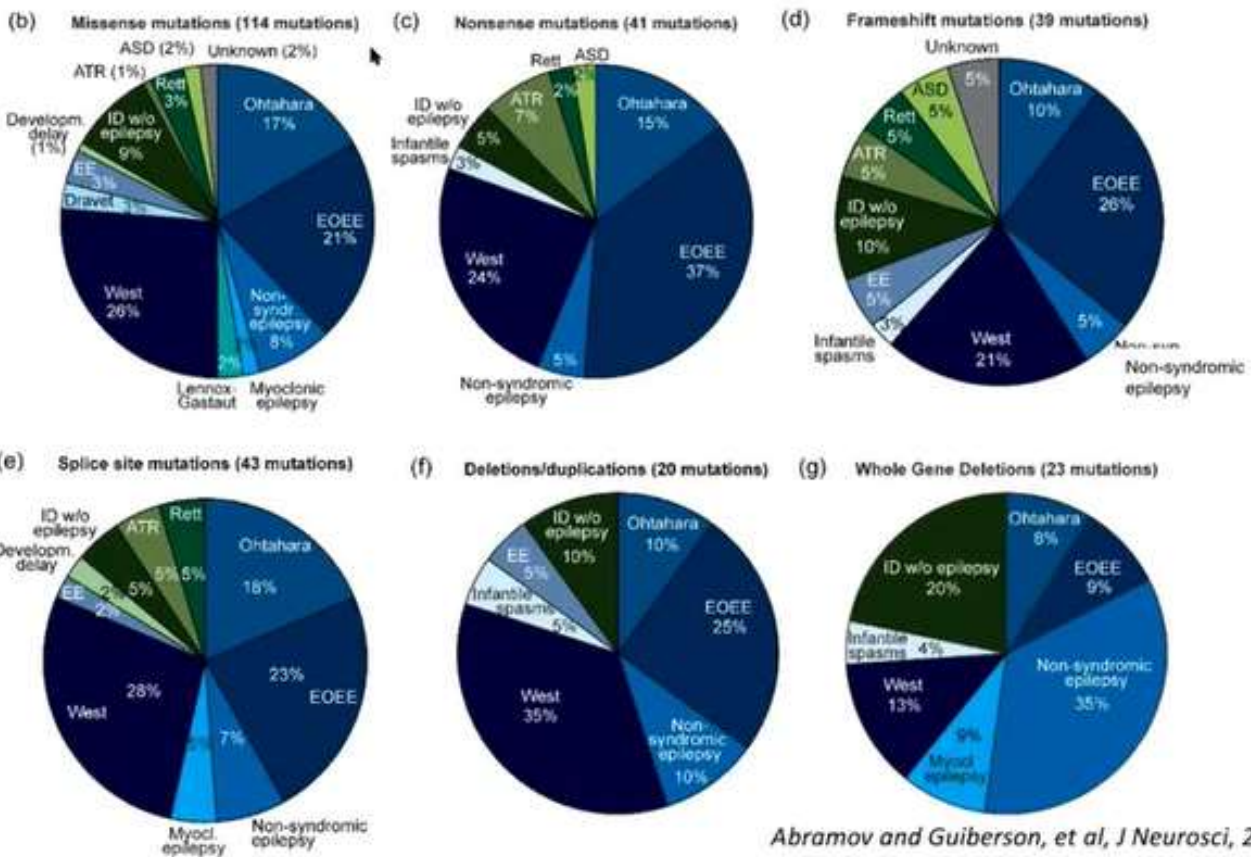
Wir haben einen Blick darauf geworfen, soweit wir die endgültigen Diagnosen der Patienten in all diesen Fallberichten feststellen konnten. So haben wir eine ziemlich große Tabelle zusammengetragen, die Sie in der Folie oben finden. Und wir zählten hoch, soweit wir sagen konnten, welche Syndrome epileptische Syndrome und welche Syndrome nicht-epileptische Syndrome waren. Und das wichtigste Ergebnis hier ist, dass wir, soweit wir es im Vergleich zu der früheren sehr gründlichen Übersicht, die 2015, 2016 veröffentlicht wurde, feststellen konnten, dass der Prozentsatz der Patienten, die eine endgültige Diagnose mit einem nicht-epileptischen Syndrom hatten, im Vergleich zu der endgültigen Diagnose mit einem epileptischen Syndrom gestiegen ist. Wir hatten aber keinen Zugang zu allen Krankenakten. Es ist möglich, dass einige dieser Patienten im Laufe der Zeit trotz nicht-epileptischer Diagnose eine Epilepsie entwickelt haben, und dass bei anderen epileptischen Patienten die Anfälle aufgehört haben. Wir hielten dies für eine Schlüsselerkenntnis, da, wie viele von Ihnen vielleicht wissen, STXBP1-Mutationen zuerst bei sehr schweren Epilepsien festgestellt wurden. Und jetzt stellen wir fest, dass es eine kleine, aber wachsende Patientenpopulation gibt, die überhaupt keine Anfälle hat. Und wir haben uns dann auch die sechs verschiedenen Mutationstypen angesehen, die wir bei diesen Patienten identifiziert haben. Also haben wir alle Patienten nach ihrem Mutationstyp getrennt.

Missense Mutationen sind Mutationen bei dem Sie im Wesentlichen eine Veränderung in der Aminosäure haben. Sie haben also immer noch ein Protein in voller Länge, aber einer der Bausteine ist jetzt gegen einen anderen ausgetauscht. Bei einer Nonsense Mutation wird das Protein nicht in voller Länge hergestellt, weil es einen Stopp gibt. Sie haben also nicht die volle Länge.

STXBP1 patient review



Debra Abr



Abramov and Guiberson, et al, J Neurosci, 2020

Weill Cornell Medicine NewYork-Presbyterian

Frameshift hat am Ende eine ähnliche Endwirkung wie Nonsense, aber der Mechanismus im Gen ist anders als bei den Spleißstellen. Man verliert also einen bestimmten Teil des Proteins, es wird normalerweise herausgeschnitten, oder das Gen wird herausgeschnitten, aber dann wird es in diesem Fall nicht normal herausgeschnitten. Man hat also wieder eine Verkürzung. Man kann eine Deletion eines Teils des Gens oder eine Duplikation, eine Verdopplung des Gens haben. Oder ganze Gen-Deletionen ist die sechste Kategorie, die wir identifiziert haben. Und wir haben uns gerade angesehen, wie die verschiedenen Syndrome in jeder dieser Kategorien auftreten. Missense-Mutationen sind also die größte Gruppe. Wir haben hier 114 Mutationen identifiziert, und Sie können sehen, dass sehr viele der Syndrome in dieser Gruppe auftreten, wahrscheinlich weil es die Größte ist. Und dann ist jede dieser anderen Gruppen viel kleiner. Wir wollten also sehen, ob wir eine Art Ähnlichkeit zwischen den Syndromen bei Patienten mit Missense Mutationen und den Syndromen bei einer dieser anderen Mutationen finden konnten, oder vielmehr einen Unterschied zwischen diesen Syndromen verschiedener Mutationen Arten finden konnten. Aber in der jetzigen Form sind die Zahlen nicht groß genug, dass wir daraus allgemeine Schlussfolgerungen ziehen können. Der größte Unterschied, den wir gefunden haben, war in der Gruppe der Patienten mit ganzen Gendeletionen. Also bei diesen Patienten sehen die Syndrome etwas anders aus, aber das ist wahrscheinlich, weil bei den Patienten mit ganzen Gendeletionen auch andere Gene betroffen sind. Es ist nicht nur STXBP1 betroffen, und wir glauben, dass das der Grund dafür ist, dass man in dieser Gruppe andere Syndrome, einen anderen Syndrom Verlauf haben. Auch wenn dies also aufregend ist und wir froh sind, dass wir dies irgendwie vorgebracht haben, hoffen wir, dass es ein klarer und präziser Weg ist. In der jetzigen Form haben wir nicht ganz genügend Informationen, um Schlussfolgerungen über die Unterschiede der Syndrome in diesen Mutationsgruppen zu ziehen. Und das habe ich hier einfach zusammengefasst.

STXBP1 patient review - Summary

- The number of patients with STXBP1 mutations without epilepsy is increasing.
 - Likely due to increased awareness that not all STXBP1 mutations cause seizures and therefore increased testing of these groups.
- Not enough numbers yet to draw conclusions about genotype – phenotype (type of syndrome) correlation.

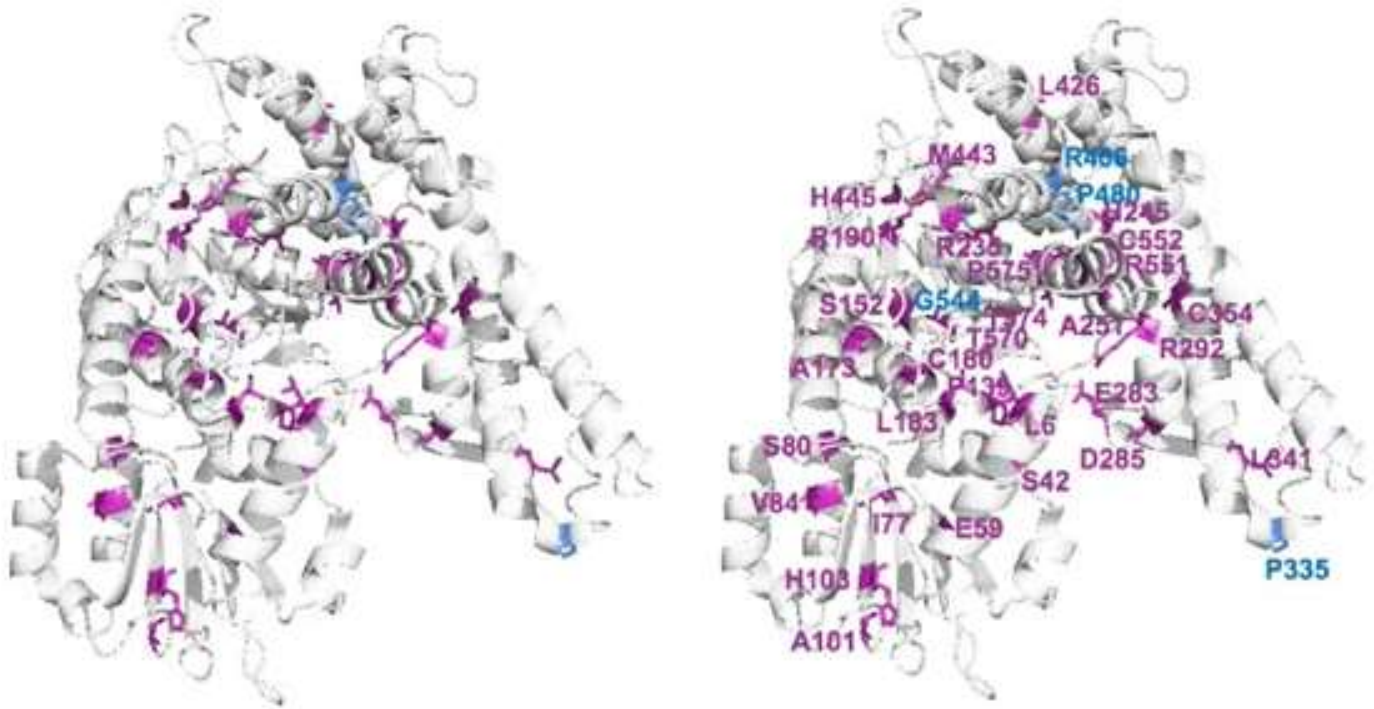
Der große Wermutstropfen aus unserem Bericht ist also die Zahl der Patienten mit STXBP1-Mutationen ohne Epilepsie, die Zahl nimmt zu. Wir halten dies für wahrscheinlich aufgrund des gestiegenen Bewusstseins, dass nicht alle STXBP1-Mutationen Krampfanfälle verursachen. Und so gibt es wahrscheinlich ein verstärktes Screening bei pädiatrischen Patienten, die zwar andere STXBP1-Symptome, aber keine Anfälle haben. Und dann gibt es, wie erwähnt, noch nicht genügend Zahlen, um Schlussfolgerungen über Genotyp-Phänotyp, d.h. die Art der Syndromkorrelation, zu ziehen. Aber wir hoffen, mit einigen anderen Gruppen, zusammenzuarbeiten und unsere Tabelle zu aktualisieren, sobald mehr Informationen eingehen, um zu sehen, ob sich etwas ergibt. Ich denke, damit werde ich das Mikro an Noah weitergeben.

Noah:

Hallo, mein Name ist Noah Guiberson, wie Jacqueline sagte. Ich bin ein Doktorand in ihrem Labor, und ich möchte allen versichern, dass Jacqueline dafür gesorgt hat, dass ich alle meine Kursarbeiten zwischen den Experimenten im Labor gemacht habe. Wie Sie wahrscheinlich durchaus wissen, ist das, was Sie hier sehen, im Wesentlichen ein Bild davon, wie die Struktur des STXBP1-Proteins aussieht.

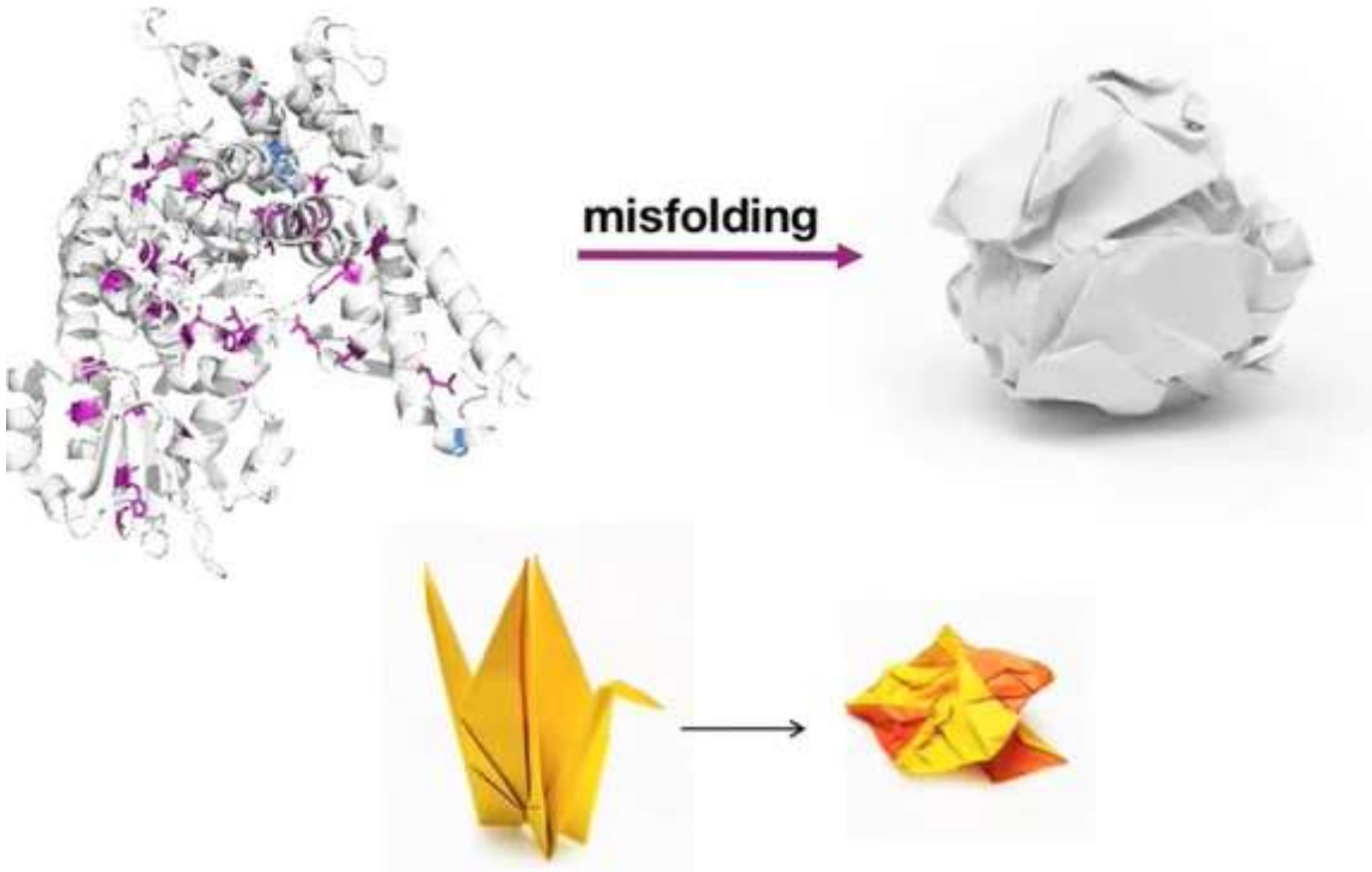
Disease mechanism

STXBP1 mutations cause misfolding, degradation & aggregation
(Guiberson et al, Nature Communications, 2018)



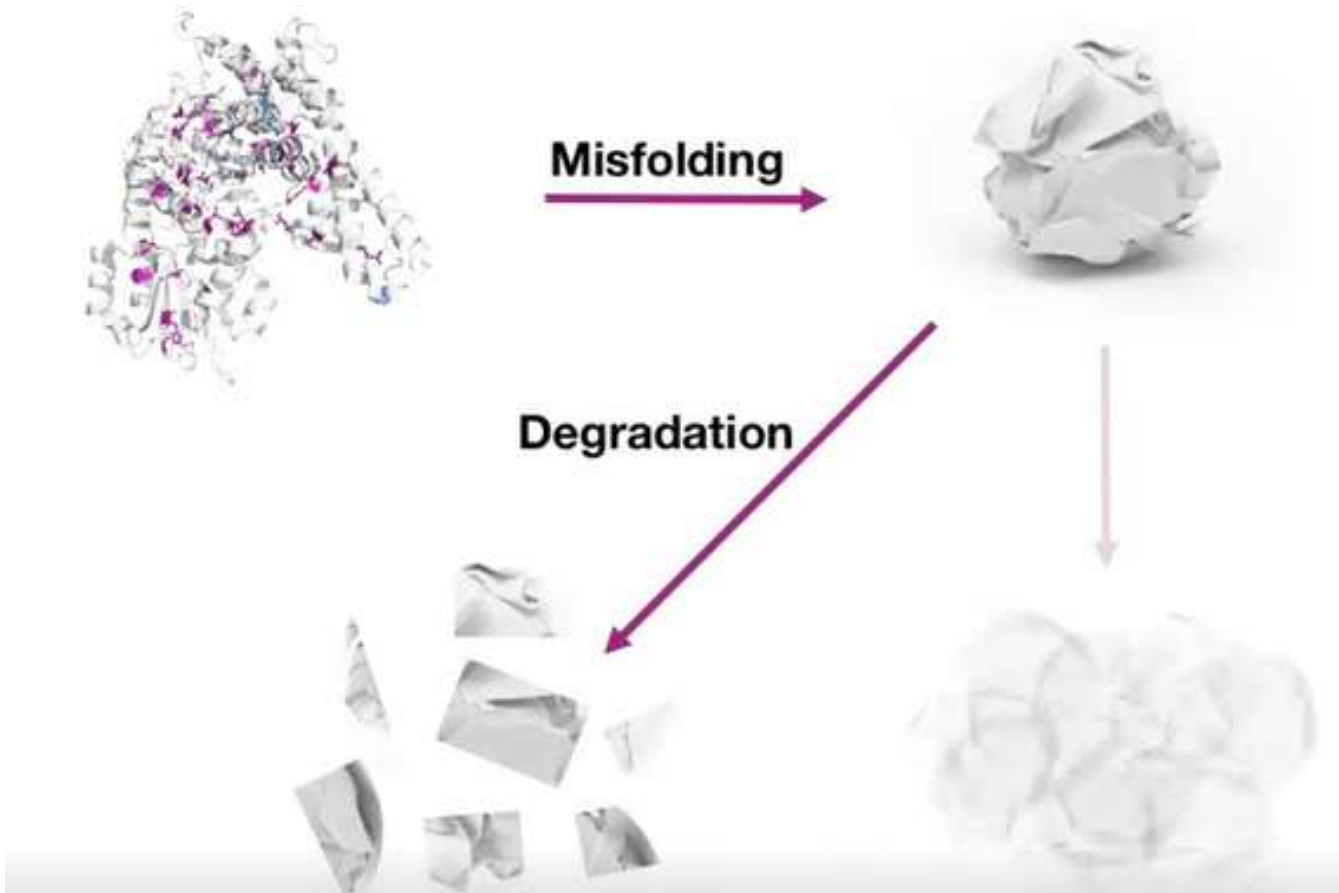
Auf der linken Seite können Sie also sehen, dass das Protein in der graphischen Darstellung bandförmige Strukturen und Drehungen hat; es bildet insgesamt diese schöne bogenförmige Form. Und diese Struktur ist es, die es dem Protein erlaubt, seine Arbeit effizient zu erledigen. Und auf der rechten Seite können Sie viele der so genannten Missense-Mutationen sehen. Eine bestimmte Art von Mutation, bei der nur eine der Aminosäuren innerhalb eines Proteins mutiert ist, aber die volle Größe des Proteins erhalten bleibt. Und Sie können sehen, dass Mutation in der gesamten Struktur des STXBP1-Proteins stattfinden und keine bestimmte Region verschont. Und zum Teil sollte unsere jüngste, unsere 2018 durchgeführte Studie zur Diskussion darüber beitragen, wie genau diese Missense-Mutationen Krankheiten verursachen. Und wir waren allgemein der Meinung, dass diese Missense-Mutationen in der Struktur dieses Proteins dazu führen, dass es sich nicht in diese schöne Form falten kann, die es ihm erlaubt, seine Arbeit effektiv zu erledigen.

STXBP1 mutations cause misfolding



Auf der linken Seite sehen Sie die Struktur. Wenn Sie eine dieser Mutationen haben, werden Sie am Ende so etwas wie ein zerknittertes Kugelpapier auf der rechten Seite haben, statt des schön gefalteten Krans. Wenn Sie Origami machen und bei jedem Schritt die falsche Faltung machen, werden Sie nicht den Krans bekommen, den Sie wollten. Und so etwas Ähnliches passiert mit diesen Mutationen. Wenn dieses Protein also einmal fehlgefaltet ist, zeigt die Zelle, in der sich das Protein befindet, in der Regel eine wichtige Reaktion.

STXBP1 mutations cause degradation



Und das ist die Reaktion, nämlich die Zelle hat gespürt, dass dieses Protein falsch gefaltet ist, und sie baut es ab. Im Wesentlichen wird es zerstückelt, verdaut und seine Teile für andere Dinge wiederverwendet. Und was bei Krankheiten wie dieser, von denen es viele verschiedene Arten von Proteinfehlfaltungen gibt, passieren kann, ist, dass die Fähigkeit der Zelle, dieses falsch gefaltete Protein abzubauen, überfordert wird.

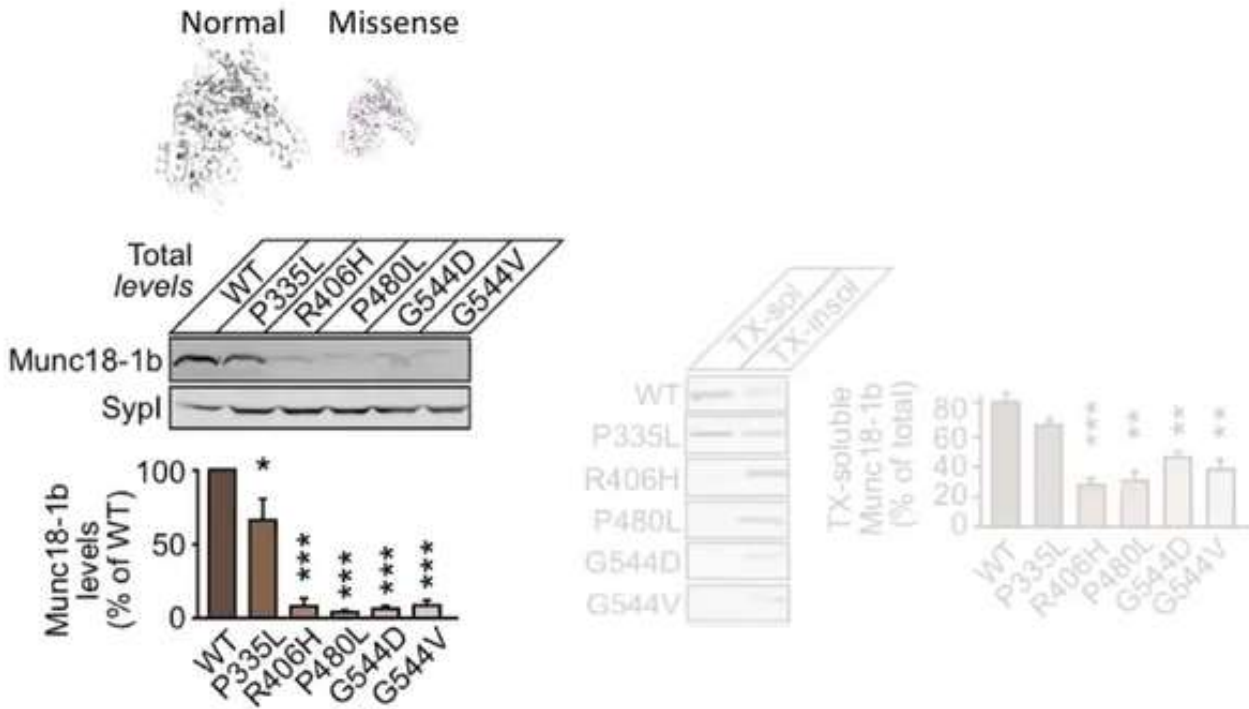
STXBP1 mutations cause aggregation



Und was die Zelle schließlich beginnt, ist, diese fehlgefalteten Proteine in kleinen, kleinen Bereichen zu lagern, die als Aggregate bezeichnet werden, wo, wie Jacqueline gerne sagt, ihre Proteine alle zusammengeklumpt sind. Im Grunde genommen einfach irgendwo abgelegt, denn die Zelle ist irgendwie überfordert und kann nicht wirklich mit allem fertig werden. Also lagert sie es an einem sicheren Ort, oder was sie für einen sicheren Ort hält, bis sie es effektiver handhaben kann.

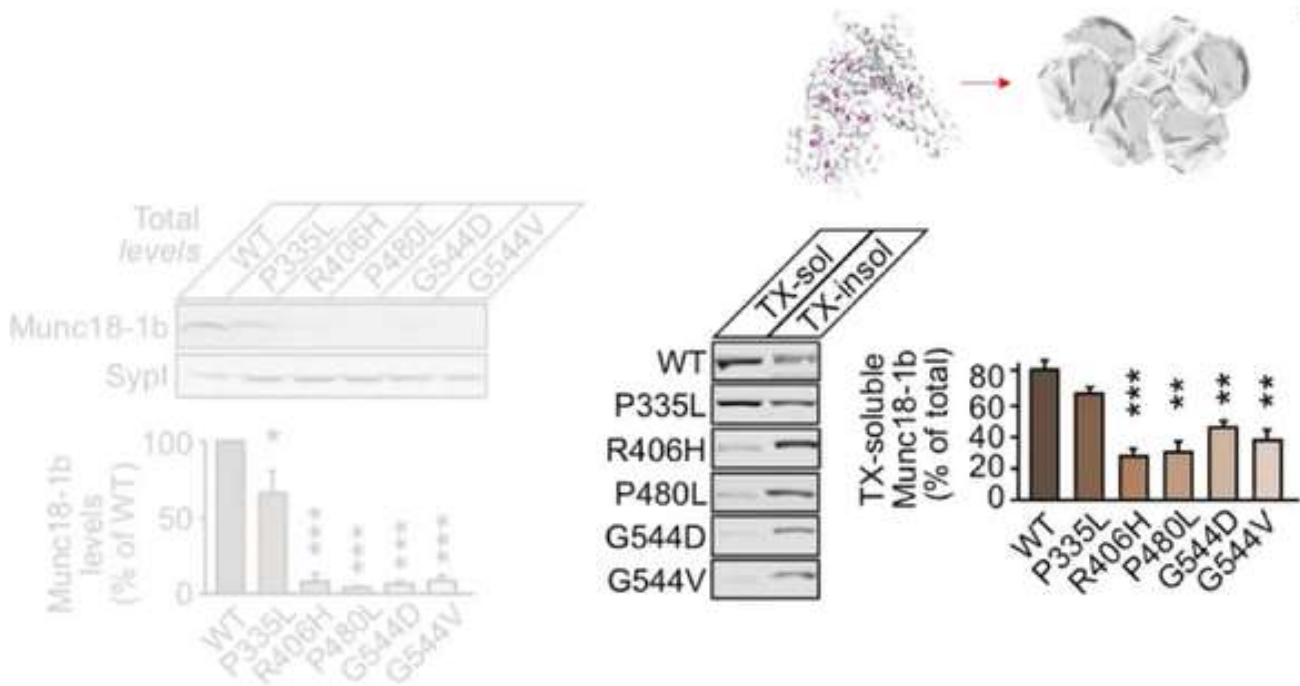
Und so ist dies im Wesentlichen: Es gibt zwei Linien, entlang derer wir über diese Krankheit für die Missense-Mutationen denken. Eine, bei der es zu einer Degradation und Aggregation von fehlgefaltetem Protein kommt. Um Ihnen eine Vorstellung davon zu geben, welche Art von Experimenten wir durchführen können, um dies zu testen, möchte ich Ihnen zeigen, dass das, was Sie hier links hervorgehoben sehen, die Art von Experimenten ist, die Sie in dieser Präsentation sehr häufig sehen werden.

STXBP1 mutations cause degradation



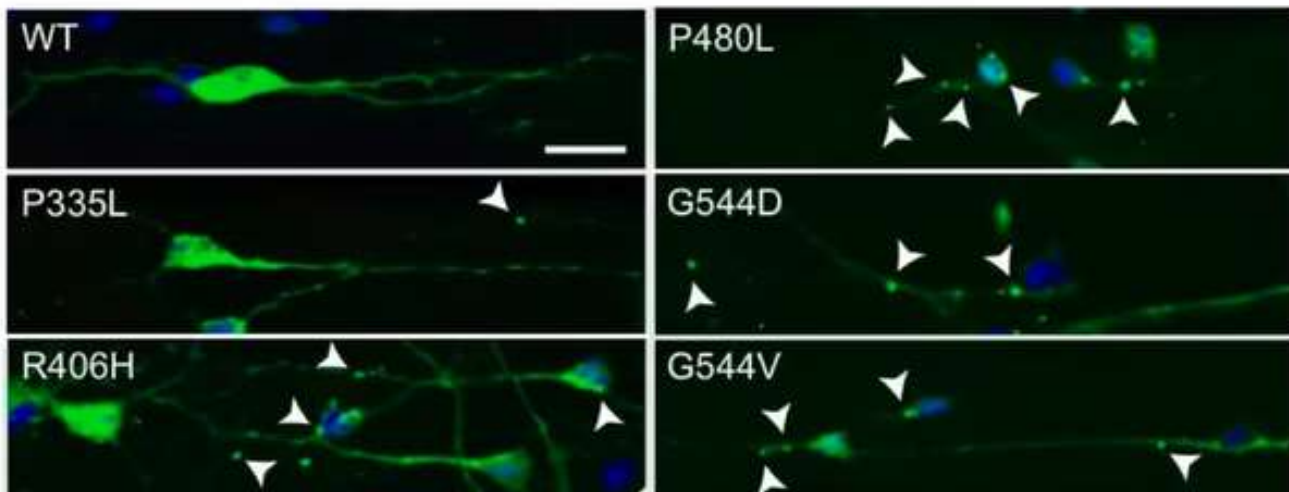
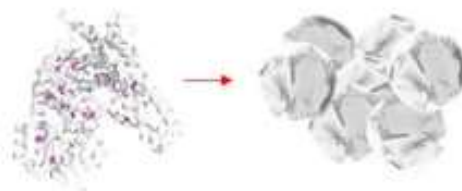
Sie müssen sich nicht daran erinnern, aber man nennt es einen Western Blot. Und der Sinn eines Western Blot besteht im Wesentlichen darin, die Menge des verbleibenden Proteins zu zeigen. STXBP1 ist im Wesentlichen eine Krankheit, bei der nicht genügend STXBP1 vorhanden ist. Und eine Missense-Mutation ist es typischerweise, aber nicht immer, weil das Protein sich falsch faltet und abgebaut wird. Es ist also weniger davon vorhanden, und bei den Deletionen, den Frameshifts, den Nonsense Mutationen bekommt man ein Protein, das effektiv Null ist. Hier ist es also eine Art komplette Deletion dieses speziellen Proteins. Das führt also auch dazu, dass insgesamt die Menge an STXBP1 gesenkt wird. Bei diesem speziellen Experiment, also auf der linken Seite, steht "WT", was wir das Wildtyp nennen. Das WT werden Sie auch hier weiterhin sehen. Und damit ist im Grunde nur das nicht mutierte Protein gemeint. Und wenn wir nach rechts gehen, können Sie die dunkle Linie unter jeder dieser Markierungen, wo von P355L bis hin zu G544V verschiedene Arten von Missense-Mutationen stehen, sehen. Und was Ihnen auffallen sollte, ist, dass diese Linien immer heller und heller werden. Und in einigen Fällen verschwinden sie im Wesentlichen einfach, so dass man sie nicht wirklich sehen kann. Und das bedeutet, dass weniger Protein vorhanden ist, weil dieses Protein abgebaut wird; es ist instabil und wird abgebaut. Das ist also der Prozess des Abbaus, die Degradation. Ein anderer Prozess ist, wie ich bereits erwähnt habe, die Aggregation.

STXBP1 mutations cause aggregation



Oben sehen Sie wieder diese grafische Darstellung, die uns die ganze Zeit begleiten wird, um sicherzustellen, dass die Dinge klar sind. Und in diesem Experiment, bei dem wir ebenfalls einen Western Blot verwenden, versuchen wir biochemisch, das Protein, das sich in den Zellen befindet, in das nicht aggregierte oder lösliche Protein und das aggregierte oder unlösliche Protein zu trennen. Und Sie können hier oben den Wildtyp sehen, der nicht mutiert ist. Und wenn man dann die Liste durch die Mutationen nach unten geht, sieht man die Dicke und die Dunkelheit dieses Striches, der sich von der linken Seite oder der nicht aggregierten Seite zur rechten Seite bewegt, die wir eher als aggregiert betrachten. Eine andere Möglichkeit, die Aggregation dieser Proteine zu betrachten, ist das Anheften oder die Suche nach der Lage des Proteins innerhalb der Nervenzellen.

STXBP1 mutations cause aggregation



In der linken oberen Ecke dieses Bildes sieht man also tatsächlich zwei Neuronen, zwei Nervenzellen, und das Grün, das Sie hier sehen, ist die Position vieler verschiedener MUNC-18-Proteine in der gesamten Zelle. Davon ausgehend erstreckt sich der helle Teil in der Mitte, der als Zellkörper bezeichnet wird, und durch diese Prozesse, die sich ausdehnen und die wir im Allgemeinen zu Neuriten zusammenfassen können. Und wie Sie sehen können, ist das alles in der ganzen Zelle zu finden. Wenn wir beginnen, Mutationen einzuführen, wie durch diese kleinen Pfeile angezeigt wird, sehen Sie diese kleinen Punkte des konzentrierten MUNC-18-Signals, oder des STXBP1-Signals.

Und wir glauben, dass dies in Kombination mit unseren anderen Tests, die auf Aggregation testen, eine Stelle anzeigt, an der die Zelle im Grunde genommen all dieses fehlgefaltete Protein abgelegt hat, weil die Zelle nicht mehr damit umgehen kann. Und Sie werden auch feststellen, dass die Helligkeit des Grüns überall sonst ebenfalls abzunehmen beginnt, was auf eine Verringerung der Proteinmenge hindeutet. Eine andere interessante Sache, die wir gemacht haben, die sehr aufregend war, war zu einem Modellorganismus über zu gehen, wie wir ihn nennen.

Aggregation in live animals!



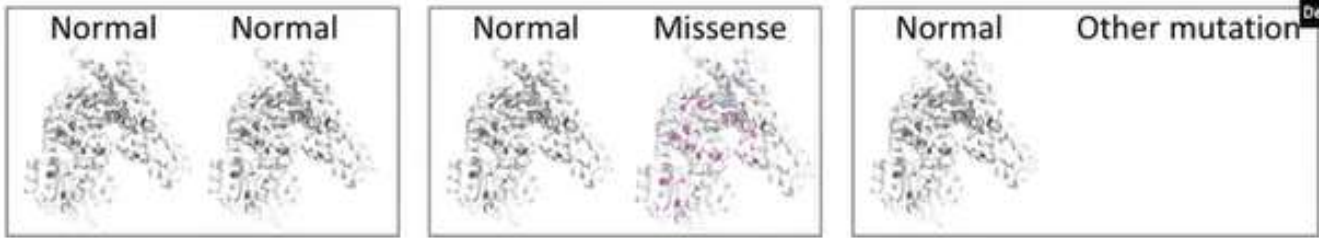
C. elegans ventral nerve cord



Wir verwenden einen Wurm, einen kleinen, sehr kleinen Wurm. Dieser wäre etwa einen Millimeter lang, wie man ihn typischerweise als erwachsene Tiere im Boden in der freien Natur findet, den wir aber im Labor für viele verschiedene Experimente verwenden. Und eine Sache, die wir tun können, ist ähnlich wie auf dem letzten Bild. Aber dieses Mal befestigen wir etwas, das grün leuchtet, an dem Protein selbst, und dann können wir das in den verschiedenen Nervenzellen innerhalb dieses Wurms verfolgen. Und so sehen Sie im Wesentlichen in der oberen Hälfte des Bildes unter dem Wurm mehr oder weniger das Rückenmark des Wurms, und Sie können wieder diese Überspannung im gesamten Rückenmark des Wurms sehen. Aber wenn Sie eine Mutation einführen, sehen Sie, dass sie diese Stelle haben, wo sie sich insgesamt in einem kleinen Kügelchen befinden. Wir denken, dass dies ein Hinweis auf eine Aggregation ist. Und deshalb möchte ich kurz rekapitulieren. Es gibt also mehr oder weniger, es gibt drei Situationen, die man mit STXBP1-Mutationen haben kann.

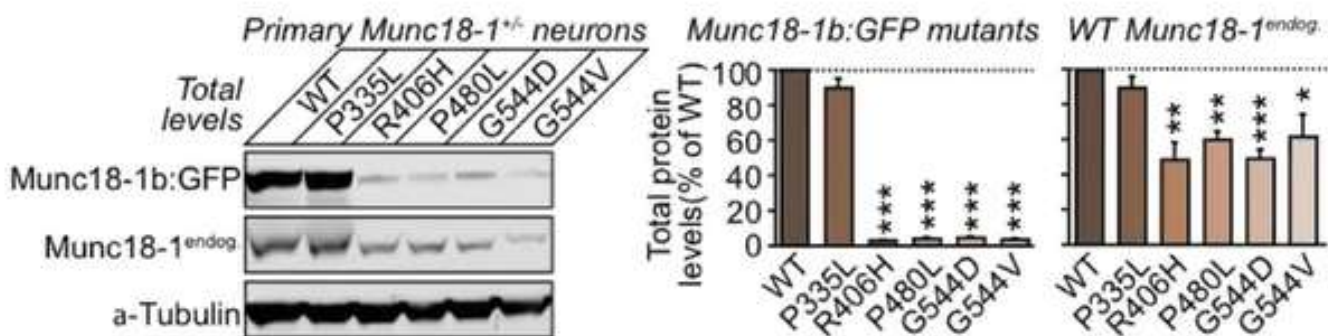
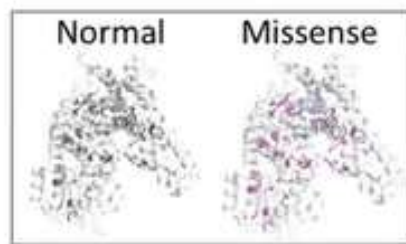
Sie können entweder nicht betroffen sein und zwei normale STXBP1-Gene haben, die, so nehmen wir an, gleiche Mengen des STXBP1-Proteins für ein Tier erzeugen. Und dann könnten Sie Missense Mutationen haben, wie ich Ihnen bereits gesagt habe, bei denen es eine einzige Veränderung gibt, die die Struktur des Proteins stört, und dann kommt es zum Abbau und zur Aggregation. Es gibt noch einige andere Arten von Missense-Mutationen.

But it's not just mutant STXBP1 affected...



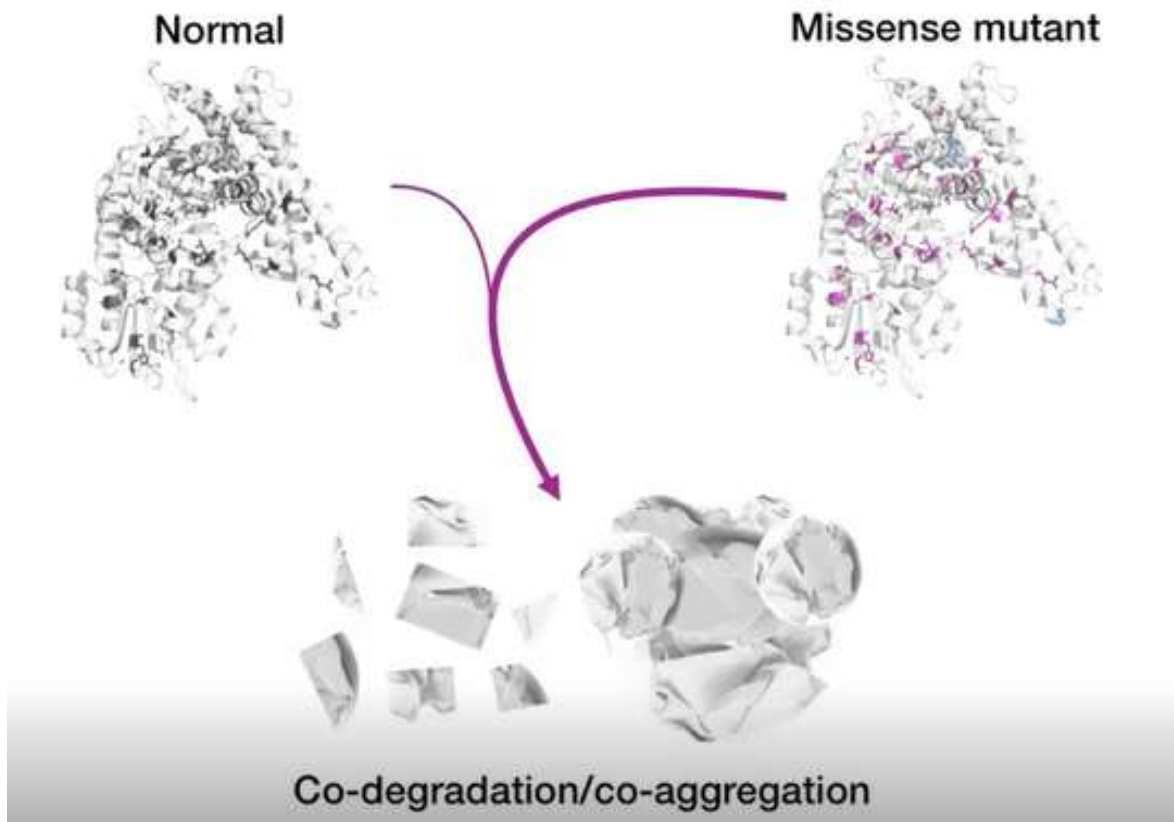
Und die dritte Situation wird mehr oder weniger von den anderen Typen geteilt, wo man eine Deletion der gesamten DNA-Region hat, dann geht es um das Gen. Oder man hat etwas, bei dem das Protein nie hergestellt wird. Im Wesentlichen wird es gestört, bevor es gebildet wird, wie bei einer Frameshift Mutation. Andere Arten wie Nonsense Mutationen, bei denen es einen vorzeitigen, wie wir es nennen, vorzeitigen Stopp gibt, werden sofort abgebaut und funktionieren nie wieder. Und noch etwas, was wir speziell im Fall dieser Kombination der Norm des unbeeinflussten Proteins und des Missense-Proteins gefunden haben, was bei vielen Patienten mit diesen Missense-Mutationen der Fall ist, ist, dass, wenn Sie beide haben, was wir bereits gesehen haben, dass, wenn Sie Missense-Mutationen innerhalb des STXBP1-Proteins haben, Sie Degradation, Aggregation haben. Insgesamt ist die Menge des funktionellen STXBP1-Proteins deutlich reduziert. Was wir nicht erwartet hatten, war, dass wir, wenn Sie sowohl einen Wildtyp oder eine nicht mutierte Kopie als auch eine mutierte Kopie haben, in der mutierten Kopie das sehen würden, was wir erwartet hatten, eine Verringerung der vorhandenen Mengen, aber wir sahen auch eine Verringerung der Mengen des Wildtyps oder der nicht mutierten Kopie, wie Sie hier sehen können.

But it's not just mutant STXBP1 affected...



Wir stellten also die Hypothese auf und gingen dann die Experimente durch, um zu zeigen, dass MUNC-18, es tut mir leid, STXBP1 offenbar in der Lage ist, an andere Proteine von STXBP1 zu binden. Und es ist dazu in der Lage, wenn sie beide nicht mutiert sind. Und es war auch in der Lage, dies für alle mutierten Versionen des Proteins zu tun, die wir getestet haben. Wir gehen also davon aus, dass diese Missense-mutierten STXBP1-Proteine ihren Aufgaben nachgehen, sie werden instabil, und einige, ein gewisser Anteil von ihnen sind an den Wildtyp MUNC-18 gebunden oder können sich irgendwann binden. Und weil die Zelle spürt, dass diese Missense-Mutanten abgebaut werden müssen oder in Aggregaten gespeichert werden, wird manchmal auch der Wildtyp oder die nicht mutierte Version eingebracht. Was wir entweder Kodegradation oder Koaggregation nennen. Und dies ist der Prozess, den wir als dominant negativ bezeichnen.

“Dominant Negative“



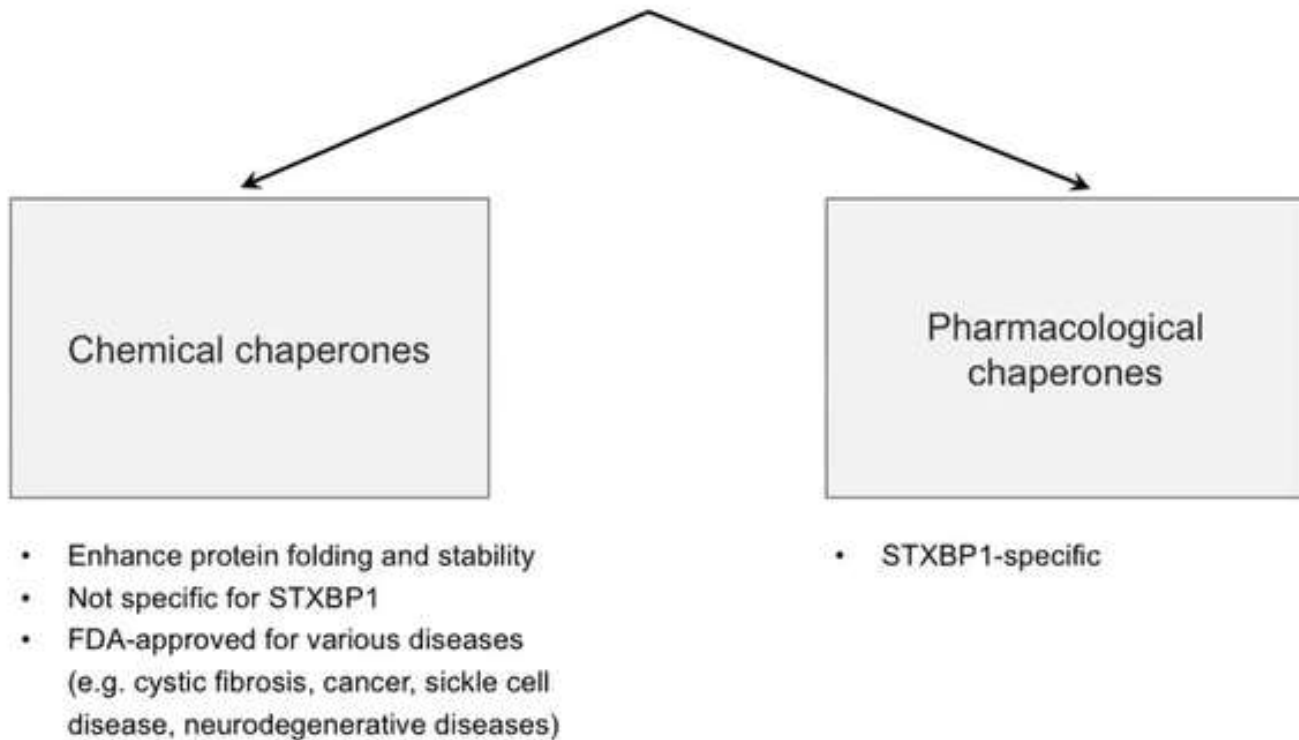
Im Großen und Ganzen, ob es sich nun um eine dominant negative Situation oder nur um den Zustand des Missense-Proteins an sich handelt, handelt es sich also um eine Fehlfaltung, die zu Degradation und Aggregation führt und sich auf die anderen Typen von MUNC-18 ausdehnt.

How can we prevent or reverse this process



Es tut mir leid, noch einmal, STXBP1-Mutationen wie Deletionen usw. führen dazu, dass eine geringere Menge des STXBP1 seine Aufgabe erfüllt. Eine therapeutische Strategie, die wir schon früh erforscht haben, war also die Suche nach Dingen in der wissenschaftlichen Literatur.

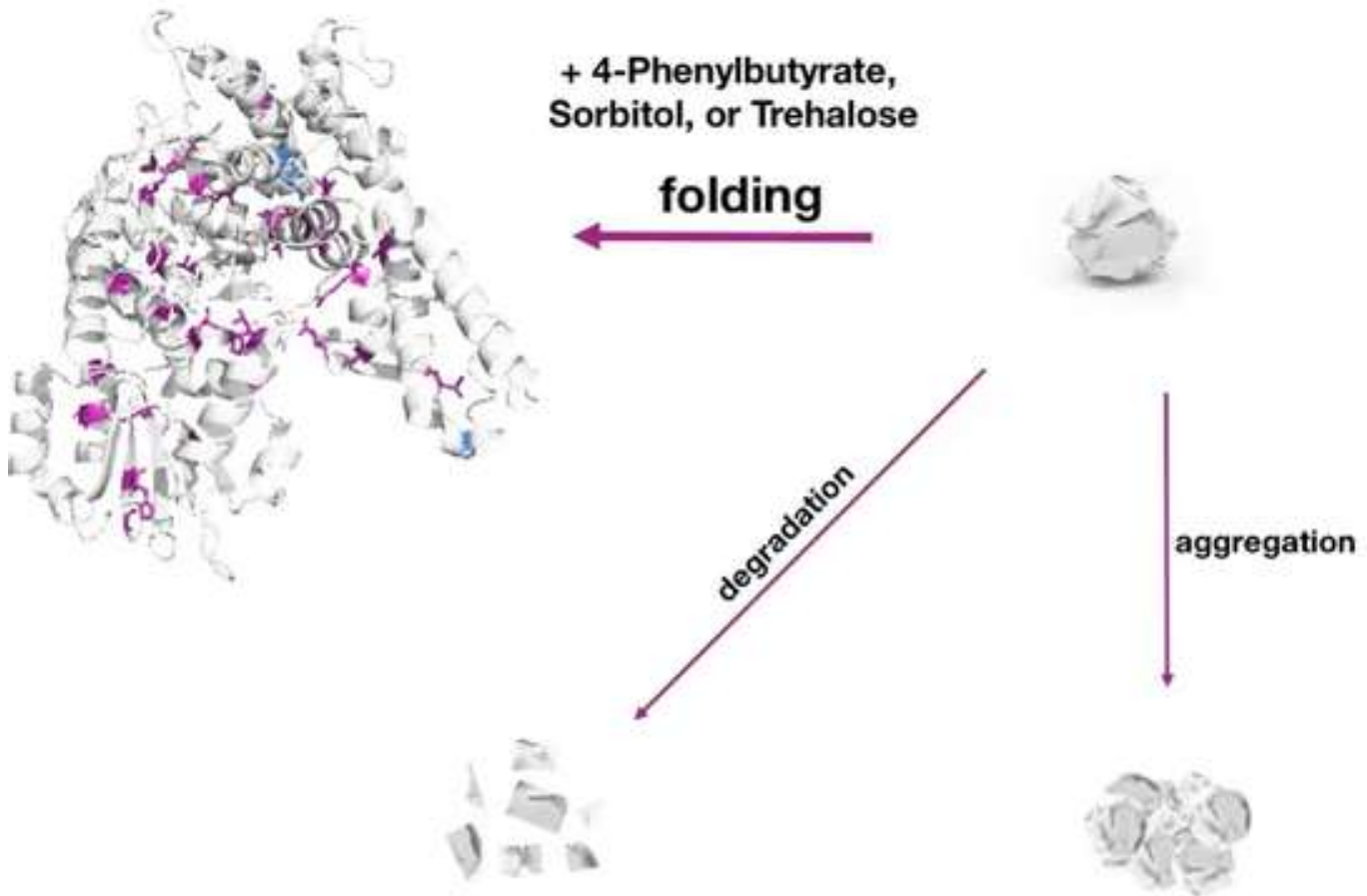
Therapeutic strategies



Es gibt viele andere Krankheiten, die durch eine Fehlfaltung von Proteinen gekennzeichnet sind, die oft zu einer Aggregation und einer Senkung des Proteinspiegels führt. Also haben wir in der wissenschaftlichen Literatur nach verschiedenen Strategien gesucht, mit denen Menschen versucht hatten, sie zu behandeln. Und wir stellten fest, dass es eine bestimmte Klasse von Molekülen gibt, die als chemische Chaperone bezeichnet werden. Und das Chaperon ruft wirklich etwas hervor, das wir von ihm evozieren wollen, denn im Grunde wollen wir, dass diese Moleküle die Hand des Proteins halten und dafür sorgen, dass es sicher an seinen Bestimmungsort gelangt, damit es seine Arbeit tun kann, ohne instabil zu werden. Was diese Klasse von Molekülen also im Allgemeinen bewirkt, ist die Verbesserung der Proteinfaltung und -stabilität. Es sei darauf hingewiesen, dass es keinen Grund gibt, zu erwarten, dass diese Chemikalien, diese Moleküle spezifisch für STXBP1 sind, dass sie sich direkt daran binden. Wir haben keine Beweise dafür, aber das ist nicht unbedingt der Punkt, denn was wir von ihnen erwarten, ist, dass sie die Art von Prozessen unterstützen, die bei STXBP1 schief laufen und dann eine Art ansteigende Flut haben, die die Werte von STXBP1 als Folge davon anhebt.

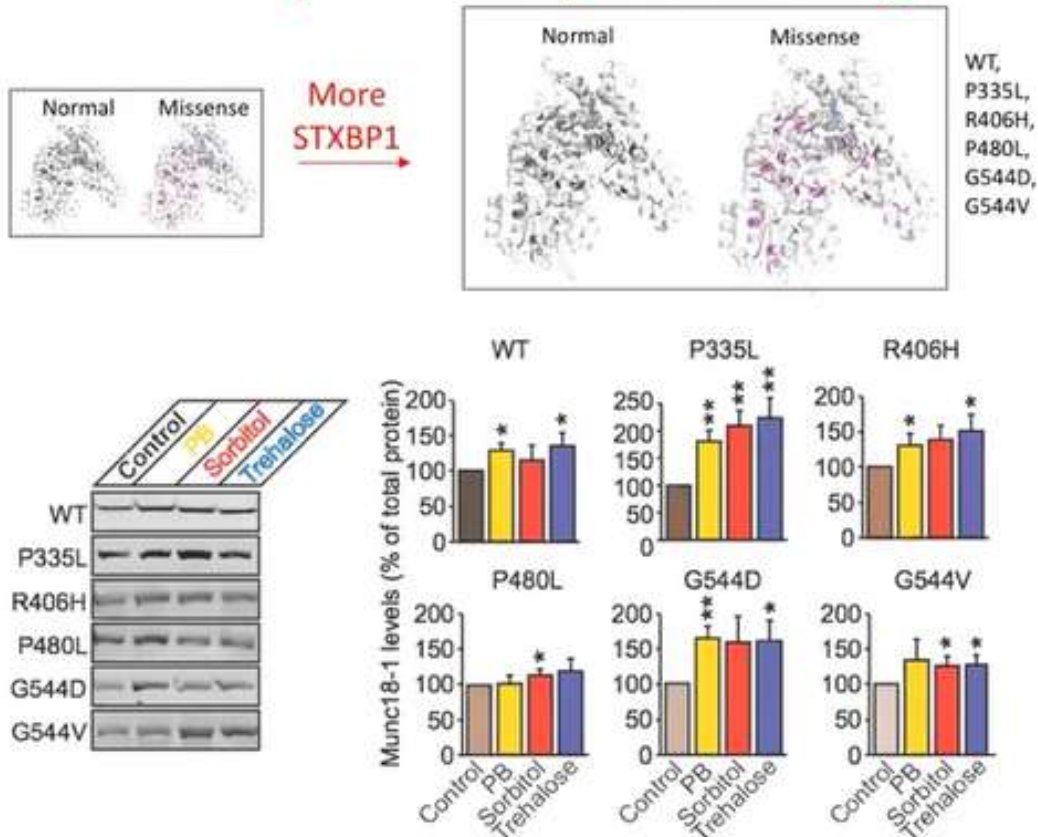
Und es sollte auch beachtet werden, dass es bereits von der FDA zugelassen ist. Einige dieser Verbindungen sind von der FDA für verschiedene Krankheiten zugelassen, um Dinge wie z.B. zystische Fibrose, Krebs, Sichelzellanämie und verschiedene neurodegenerative Krankheiten zu behandeln. Viele davon sind übrigens auch Krankheiten, die mit Proteinfehlfaltungen in Zusammenhang stehen, darunter eine kürzlich durchgeführte klinische Studie, bei der, wie ich glaube, 4-Phenylbutyrat in Kombination mit einem anderen Molekül verwendet wurde, um einen leichten Nutzen bei ALS zu erzielen. Und etwas, was Sie etwas später darüber hören werden, der zweite Art, die wir untersuchten, waren pharmakologische Chaperone. Dabei handelt es sich um Moleküle, die mehr oder weniger so konzipiert oder identifiziert wurden, dass sie spezifisch an STXBP1 binden. Aber Debbie, darauf kommen wir etwas später zu sprechen.

Chemical chaperones



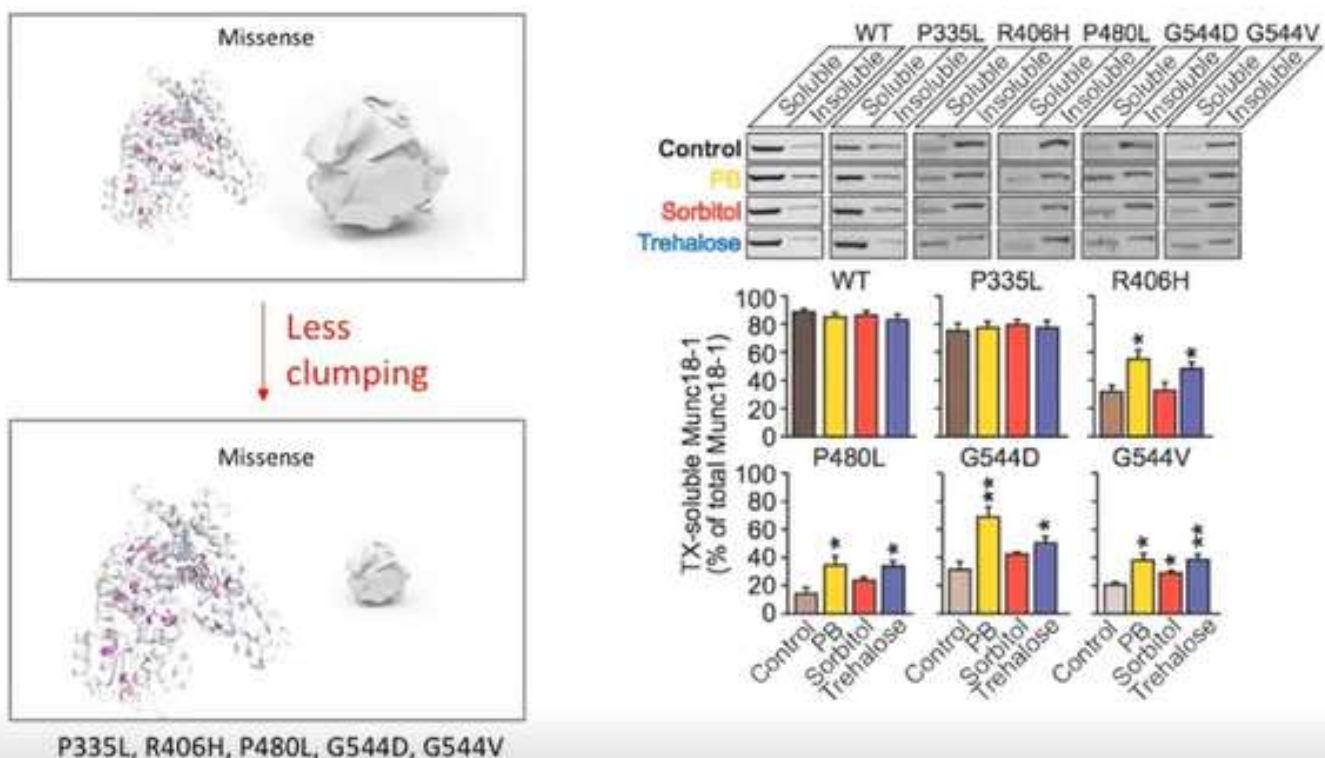
Um also noch mehr über chemische Chaperone zu sprechen, haben wir drei Verbindungen in einem Screen identifiziert, die beide bei der Inkubation erhöhte Werte aufwiesen, sowohl die Zellen des unmutierten Wildtyps als auch die mutierte Version, die wir getestet haben. Wir gehen also davon aus, dass wir mehr oder weniger dieses Gleichgewicht haben, bei dem das Missense-mutierte Protein entweder irgendwie fehlgefaltet bleibt, aber seine Arbeit tun kann, oder aber es geht in diesen fehlgefalteten Zustand über, in dem es schließlich entweder abgebaut oder aggregiert werden kann. Und was wir mit diesen Verbindungen für diese chemischen Chaperone erreichen wollen, ist, sie von diesem fehlgefalteten Zustand zurück in den gefalteten Zustand zu bringen. Auf diese Weise kann es in der Nähe bleiben, seine Arbeit etwas länger verrichten und die Gesamtmenge des funktionellen STXBP1 effektiv erhöhen.

Chemical chaperones prevent degradation



Und, noch einmal, ich weiß, es ist viel los, ich wollte Ihnen nur eine Vorstellung davon vermitteln, wie diese Experimente aussehen. Auch hier haben wir wieder einige Western Blots, aber im Wesentlichen geht es darum, dass wir, wenn wir Mausneuronen, die entweder eine unmutierte Version von STXBP1 oder eine Missense-mutierte Version haben, mit diesen Verbindungen zusammensetzen, eine Zunahme sowohl des Wildtyps als auch der mutierten Versionen von STXBP1 feststellen, was ermutigend ist.

Chemical chaperones prevent aggregation



Und wir sehen auch, dass wir die ganze Sache durchgegangen sind und sowohl über Abbau als auch über Aggregation gesprochen haben, dieses Experiment, das ich Ihnen vorhin gezeigt habe, von dieser Art der Bewegung von links nach rechts, des Übergangs von löslich zu unlöslich als Hinweis auf eine Aggregation. Wenn wir diese Verbindungen mit der Missense-Mutation in STXBP1 exprimierenden Nervenzellen einsetzen, sehen wir eine Art Verschiebung zurück nach links, zurück vom Unlöslichen zum Löslichen, was wir so interpretieren, dass sie in Gegenwart dieser Verbindungen weniger aggregiert sind. Und warum das wichtig ist, ist, wenn man das kann, denn man hat diesen Abbau, aber man hat auch eine Aggregation. Und wenn ein Protein in einem Aggregat ist, kann es sich nicht von diesem Aggregat lösen und die Arbeit verrichten, die es eigentlich tun sollte. Mit diesen Verbindungen erhöhen wir also sowohl die Werte als auch die Verhinderung oder Freisetzung - darüber sind wir uns nicht im Klaren - dieses Proteins aus Aggregaten. Wiederum gingen wir zu unserem Freund *C. elegans*, dem Wurm, und wir konnten die ähnlichen Experimente durchführen, bei denen wir im Wesentlichen nur die Würmer mit diesen Verbindungen füttern und noch einmal ihr Rückenmark untersuchen, um zu sehen, wo die Verteilung der Position des STXBP1-Proteins entlang des Rückenmarks des Wurms liegt.

Chemical chaperones prevent aggregation



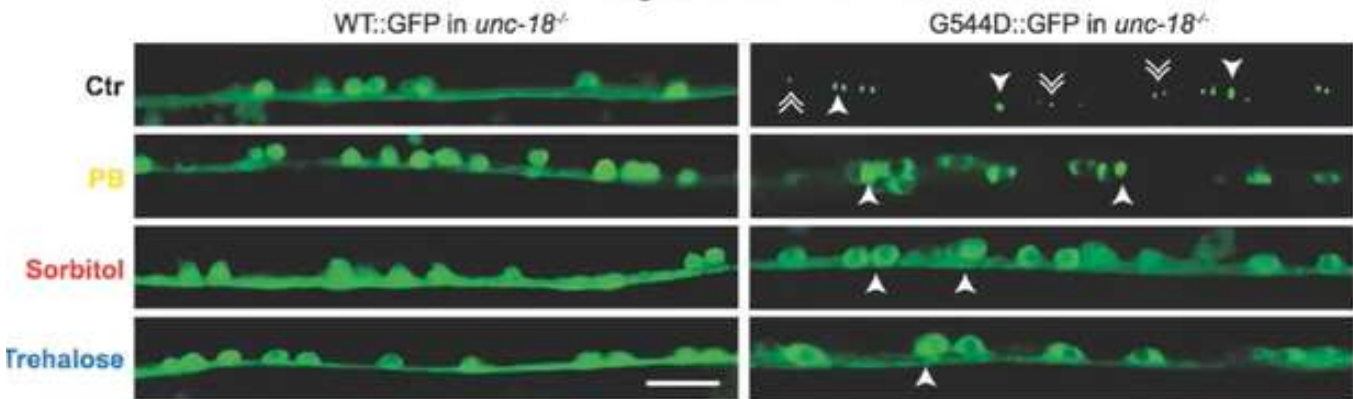
Und wie ich Ihnen vorhin auf der linken Seite gezeigt habe, ist es einfach überall, wir nennen es diffus, überall in den Nervenzellen des Wurms lokalisiert, und auf der rechten Seite sieht man sie lokalisiert, zu diesen kleinen Aggregaten

zusammengeballt und sehr wenig irgendwo anders.

Chemical chaperones prevent aggregation

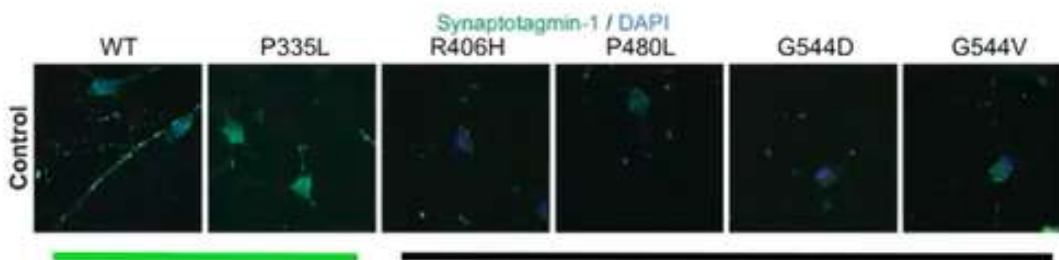


C. elegans ventral nerve cord



Als wir mit den chemischen Chaperonen behandelten, waren wir sehr aufgeregt, als wir sahen, dass sich das Aussehen dieser Mutanten, die das Rückenmark des Wurms exprimieren, wenn Sie so wollen, massiv verändert hat. Und das war etwas, das uns sehr ermutigt hat, zu sehen.

Chemical chaperones boost neuron function

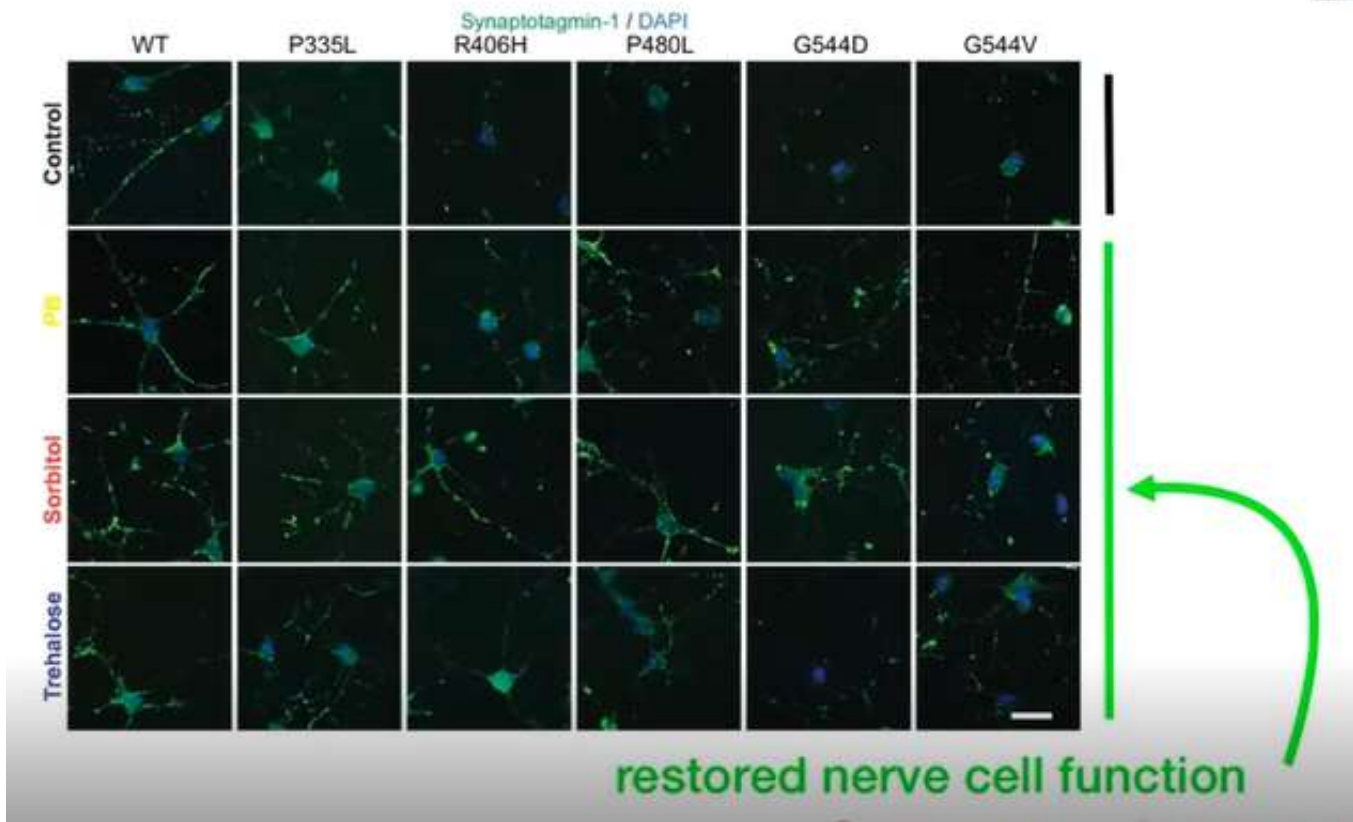


less green means less nerve cell function

Eine andere Sache, die wir tun könnten, wäre, zurück zu den Nervenzellen der Maus zu gehen, die wir wie eine Plastikoberfläche tragen würden, und dann können wir auf sie herunterschauen, und die Details dieses Experiments sind nicht gerade super wichtig, aber allgemein gesprochen, wollte ich Ihnen nur zeigen, was wir tun könnten, wo die grünen Punkte, die Sie sehen, in der unmutierten Wildtyp-Version auf der linken Seite sind. Und Sie können diese Reduktion sehen, wenn die Mutanten exprimiert werden, die Missense-Mutante STXPB1 exprimiert wird, und das entspricht mehr

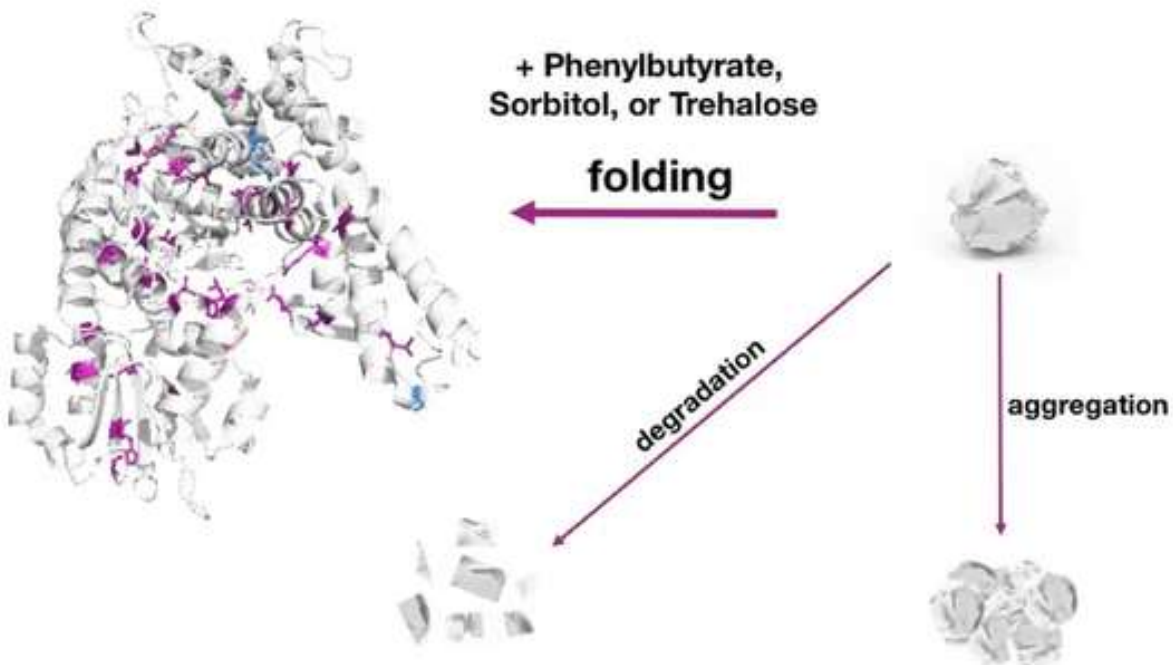
oder weniger einer Verringerung des Aktivitätsniveaus dieser Nerven. Und was wir sehen, wenn wir diese Zellen mit den chemischen Chaperonen inkubieren, ist, dass wir eine, wie wir es nennen, Rettung der Helligkeit und Anzahl dieser kleinen Punkte erhalten, die auf eine wiederhergestellte Nervenzellenfunktion hinweisen.

Chemical chaperones boost neuron function



Ich hoffe, das geht aus diesem Bild hervor, indem Sie in der oberen Reihe, nur auf der linken Seite, das Bildschirmsignal erhalten. Und wenn wir dann mit 4-Phenylbutyrat, Sorbitol und Trehalose behandeln, wird dies bei all den verschiedenen Mutationen wiederhergestellt.

Chemical chaperones reverse all deficit type



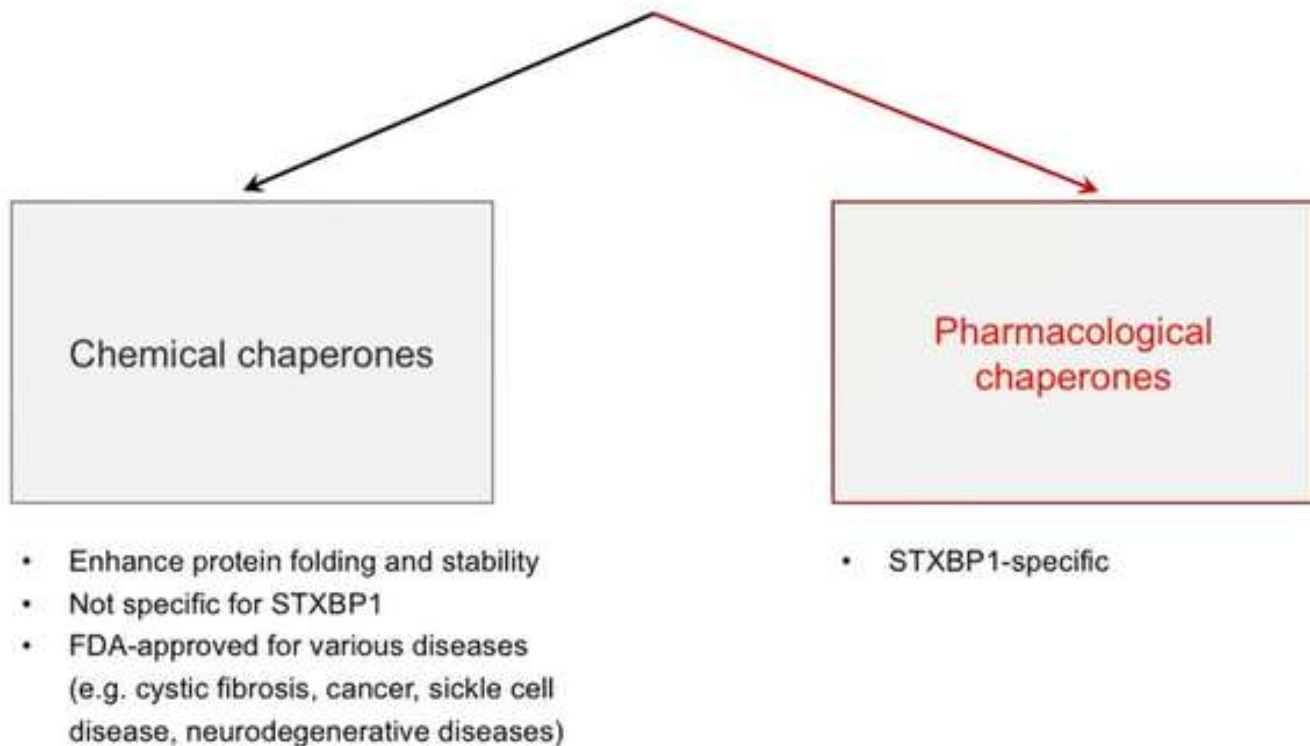
Um zusammenzufassen, wir hoffen, dass diese Klasse von Molekülen, 4-Phenylbutyrat, Sorbitol und Trehalose, die chemische Chaperone genannt werden, in Zukunft alle Defizitarten, die wir selbst getestet haben, umkehren und sich irgendwie entfernen von dieser fehlgefalteten Version, die dann abgebaut und aggregiert werden kann, um zurück zu einem gefalteten und funktionellen STXBP1-Protein zu kommen.

Ich lasse Debbie übernehmen.

Debbie:

Hallo. Okay, ich werde also mit dem zweiten Arm unserer therapeutischen Strategien fortfahren, der, wie Noah erwähnte und zu erklären begann, pharmakologische Chaperonen genannt wird.

Therapeutic strategies



Diese unterscheiden sich also von chemischen Chaperonen in dem Sinne, dass sie STXBP1-spezifisch sind. Und die Idee dabei ist, dass diese kleinen Moleküle an das STXBP1-Protein, und hoffentlich nur an das STXBP1-Protein, binden. Das bedeutet, dass ihre Wirkung nur auf das Protein und nur auf das Protein wirkt, was hoffentlich jegliche Art von Nebenwirkungen reduziert. Und weil wir wissen, dass sie zielspezifisch sind, können wir sie in niedrigeren Dosen und Konzentrationen einsetzen, was hoffentlich auch ihr Nebenwirkungsprofil verbessern wird. Wir haben uns also auf die Suche nach pharmakologischen Chaperonen für STXBP1 gemacht. Und wir begannen dieses Projekt, indem wir einfach ein Proof-of-Concept-Experiment durchführten.

Small molecules as therapeutic strategies



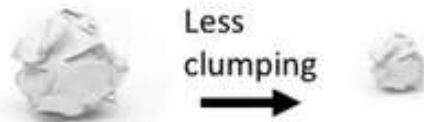
Proof of concept / is it possible?



- ✓ Syntaxin-1 is a binding partner for STXBP1
- ✓ Fragments of syntaxin-1 stabilized mutant STXBP1 levels

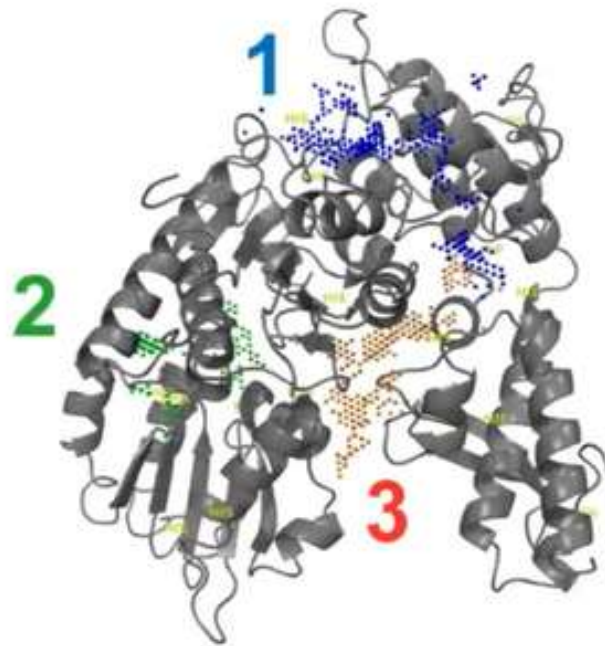


- ✓ Fragments of syntaxin-1 reduced aggregation of mutant STXBP1



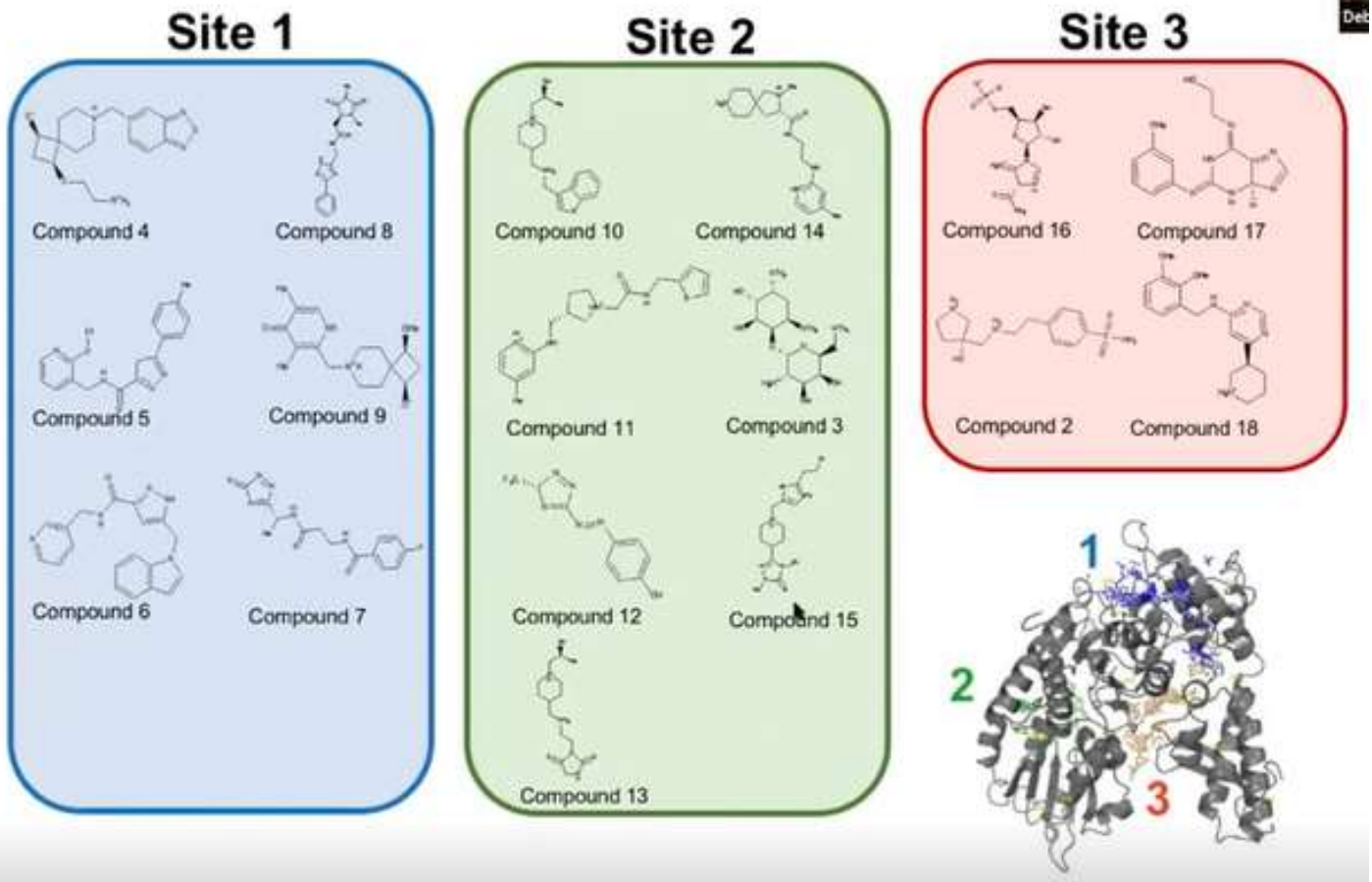
Ist es überhaupt möglich, dass eine spezifische Bindung an STXBP1 den Proteinspiegel erhöht, den Abbau hemmt - im Grunde genommen jeden Abbau verhindert - und auch die Aggregation stoppt, von der Noah gesprochen hat? Also begannen wir - wie ich bereits erwähnte, ist dies ein Proof-of-Concept-Experiment. Wir begannen also mit einem der fast endogenen Chaperone von STXBP1, wenn Sie so wollen. Syntaxin-1 ist also ein weiteres Protein, das in Nervenzellen zu finden ist, und STXBP1 steht eigentlich für Syntaxin-1-bindendes Protein. Wir wollten also sehen, ob wir die Menge an Syntaxin-1, von der wir wissen, dass sie STXBP1 bindet, erhöhen können, würden wir einen Anstieg der STXBP1-Spiegel erreichen? Und könnten wir einige der Aggregation, die wir sehen, reduzieren? Um eine lange Geschichte kurz zu machen, ich habe keine der Western-Blot-Daten auf dieser Folie. Aber wir haben im Grunde genommen festgestellt, dass dies funktioniert. Wir haben also festgestellt, dass Fragmente - wir haben nicht einmal die gesamte Syntaxin-1 exprimiert - die mutierten STXBP1-Spiegel stabilisieren. Also fügten wir wiederum mit Missense STXBP1 Syntaxin-1 hinzu, und wir erhielten im Grunde genommen mehr davon. Wir hatten also einen Anstieg unserer Proteinspiegel, was sehr ermutigend war. Und wir stellten auch fest, dass wir, als wir diese Fragmente von Syntaxin-1 hinzufügten, die Aggregation dieser missense-STXBP1-Mutanten reduzierten. Hier sahen wir also weniger Verklumpung. Nachdem wir also dieses Proof-of-Concept-Experiment hinter uns hatten, beschlossen wir, mit der Identifizierung pharmakologischer Chaperone für STXBP1 fortzufahren. Wir begannen dies mit zwei Mitarbeitern von Weill Cornell. Dr. Greg Pestko hier links und Dr. Andrew Daab hier rechts.

STXBP1 structure & potential binding sites



Sie waren also in einem benachbarten Labor und diese Leute halfen uns bei der ersten Untersuchung. Noah erwähnte, dass sie die Literatur nach chemischen Chaperonen durchsahen und andere chemische Chaperonen identifizierten, die die Leute für andere Krankheiten ausprobiert hatten. Und so war das Einstiegsbild, mit dem sie begannen, relativ klein. Es waren also vielleicht 10 bis 20 Verbindungen. Sie haben das Einstiegsbild virtuell gemacht. Sie modellierten also zunächst die Struktur, die Sie zuvor bei STXBP1 gesehen hatten. Und so fanden sie rechnerisch heraus, dass es drei Stellen gibt. Sie sind mit eins, zwei und drei bezeichnet und während der gesamten Diashow farblich kodiert werden. Eine Stelle ist blau, zwei ist grün und drei ist rot. Und sie fanden heraus, dass diese drei Bindungsstellen so aussahen, als ob sie in der Lage wären, ein kleines Molekül zu unterstützen, das auf ihnen landet und auf ihnen sitzt, ohne die natürliche Faltung von STXBP1 oder die natürliche Funktion von STXBP1 zu stören. Also identifizierten sie diese drei Bindungsstellen als potenzielle Orte, an denen kleine Verbindungen binden könnten. Und dann benutzten sie einen Online-Bildschirm einer riesigen virtuellen Bibliothek von Chemikalien, die aus einer Unzahl verschiedener chemischer Klassen stammten. Und im Grunde schauten sie rechnerisch: Würde diese Verbindung, könnte diese Verbindung in die erste Stelle passen, könnte sie in die kleine Ecke des Proteins passen? Könnte sie in die Stelle zwei passen? Könnte sie an Ort und Stelle drei passen? Und wenn sie passen würde, wie gut würden sie vorhersagen, dass die Chemie funktionieren würde? Würde sie binden? Würde es abgestoßen werden? Diese Art von Dingen. Der Grund dafür, dass dies rechnerisch durchgeführt wurde, liegt also darin, dass sie eine riesige Bibliothek von 400.000 Verbindungen gescreent haben, was wir in der Realität im Labor nicht tun können. Das ist einfach zu groß, um in einer vernünftigen Zeitspanne durchgeführt werden zu können. Und sie arbeiteten auch, wie ich bereits erwähnte, mit einer sehr unterschiedlichen chemischen Klasse, einer Klasse chemischer Verbindungen, in der Hoffnung, dass wir auf diese Weise im Grunde genommen so unvoreingenommen wie möglich sein würden und hoffentlich einige Treffer aus verschiedenen Verbindungsklassen herauskommen würden. Und das würde uns eine gute Vorstellung von möglicherweise anderen Verbindungen geben, die wir vielleicht sogar mit diesen Verbindungen in Verbindung bringen, so dass wir, wenn keine unserer Folgestudien funktioniert, zu anderen Verbindungen übergehen könnten. Dies wurde also wirklich von diesen beiden Wissenschaftlern angeführt, und sie identifizierten 17 Verbindungen.

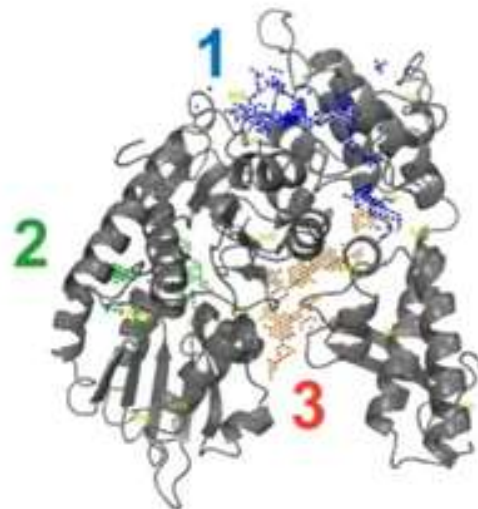
Top candidates



Die Verbindungen haben also sehr lange chemische Namen. Ich werde sie daher immer als Verbindung 1, Verbindung 2, Verbindung 9 usw. bezeichnen, nur der Kürze und Klarheit halber. Wie Sie hier sehen, haben wir die Verbindungen nach den verschiedenen Standorten geordnet. Wie ich bereits erwähnt habe, ist blau der Standort eins hier oben, grün der Standort zwei hier unten, und drei ist rot, Standort drei hier unten. Und wenn Sie sehr schnell sind, werden Sie vielleicht feststellen, dass es auf dieser Folie keine Verbindung gibt, die als Verbindung eins gekennzeichnet ist. Und das liegt daran, dass wir auch ein Antiepileptikum untersucht haben, mit dem viele von Ihnen, wie ich glaube, vertraut sind, nämlich Levetiracetam. Und ich glaube, es ist auch als Keppra bekannt, ich glaube, das ist der Markenname. Und wir wollten nur sehen, ob und wir wissen, dass es bei Krampfanfällen wirklich gut wirkt. Und wir wollten sehen, ob es vielleicht tatsächlich spezifisch für STXBP1 ist, ob es spezifisch an STXBP1 gebunden ist. Wir wissen, dass es funktioniert, aber wir wollten sehen, ob dies vielleicht eine der Möglichkeiten ist, wie es seine Aufgabe erfüllen kann. Nachdem wir also diese 18 Verbindungen identifiziert hatten, beschlossen wir, diese Verbindungen genau denselben Tests zu unterziehen, denen Noah die chemischen Chaperone unterzogen hatte. Wir wollten die Fähigkeit dieser Verbindungen zur Rettung von STXBP1-Mutanten beurteilen.

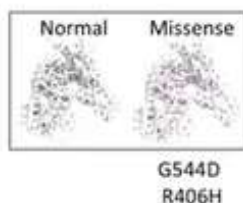
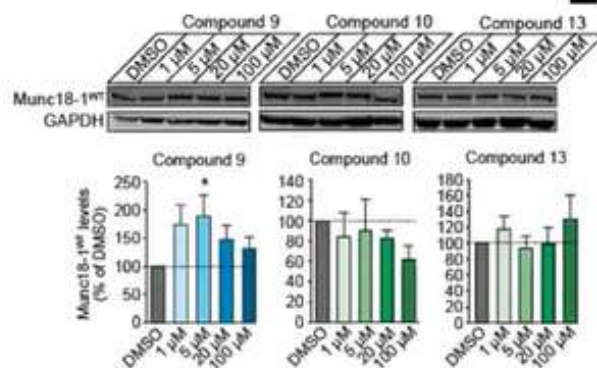
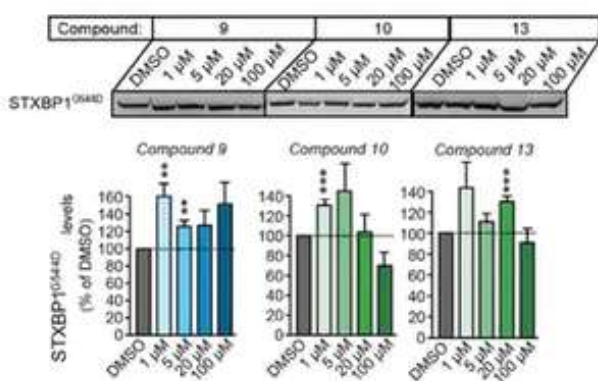
Assessment of rescue ability

1. Protein amount
2. Nerve cell activity
3. *In vivo* rescue of *C. elegans* models
4. Direct binding Model

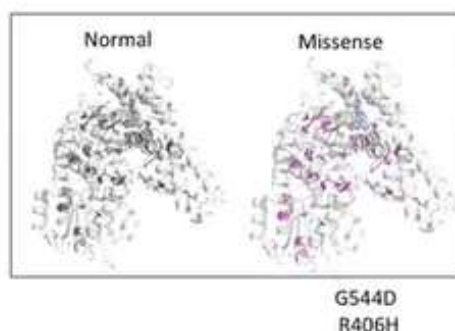


Also wollten wir einen Blick auf die Proteinmenge werfen. Und ich habe mich darauf konzentriert. Ich zeige Ihnen die Daten für G544D-Mutanten, aber ich habe die gleichen Studien über die R406H-Mutation durchgeführt. Und ich finde sehr ähnliche Effekte für beide. Es handelt sich also nicht nur um eine Mutante. Wir haben uns also die Proteinmenge angesehen, wir haben die Aktivität unserer Nervenzellen untersucht. Noah half auch mit und sah sich die Rettung unseres Modells des *C. elegans* Wurms an. Und zum Schluss zeige ich Ihnen, wie diese Chemikalien irgendwie in die Struktur passen. Nicht wahr? Ich glaube, ich habe vorhin schon ein wenig darauf angespielt. Das allererste Experiment, das wir gemacht haben, war also, dass wir alle Verbindungen genommen haben.

Rescue of STXBP1 levels



more
STXBP1
→

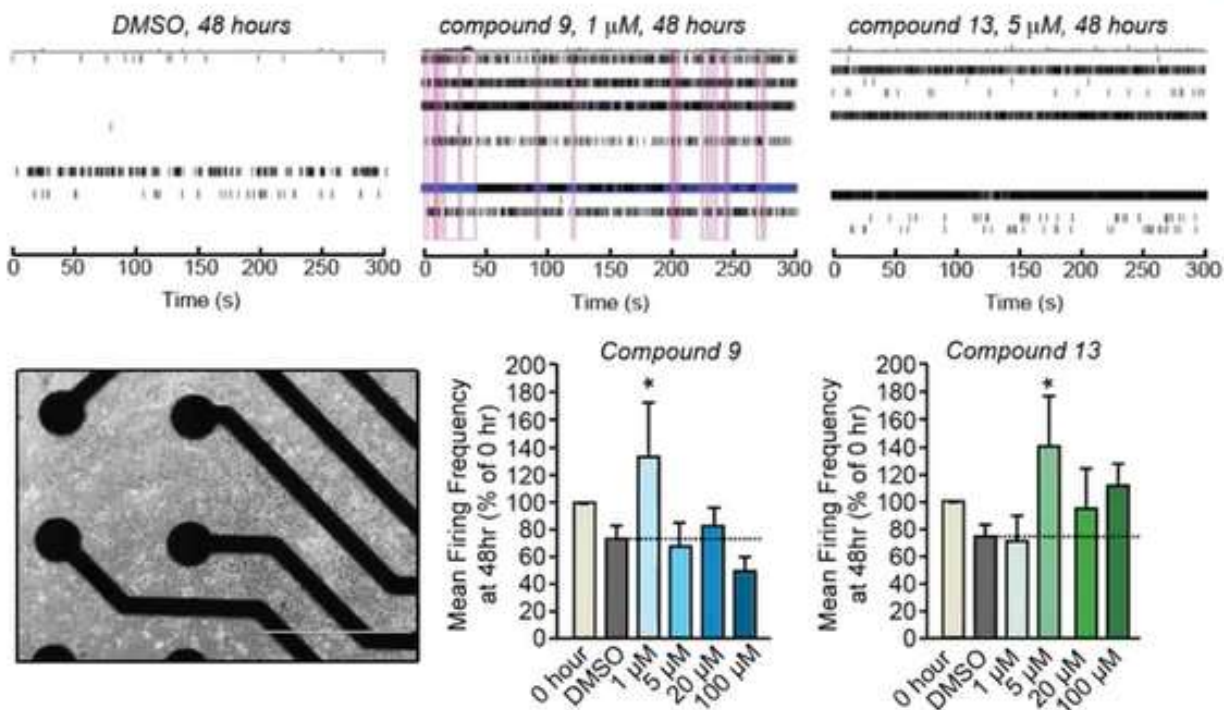


Debra Abra

Wir haben sie in einer ziemlich niedrigen Dosis verwendet, die niedriger war als die Dosis, in der sie das Phenylbutyrat getestet haben. Und wir schauten uns einfach an, um zu sehen, ob wir wieder einen Anstieg des Proteingehalts feststellen würden. Sie werden hier also die Phrase oder das Wort DMSO sehen. Jede der Verbindungen ist ein Pulver, und ich löse es in einer Lösung auf, einer Flüssigkeit namens DMSO. Deshalb führe ich alle meine Experimente immer auch mit DMSO durch, um sicherzustellen, dass es nicht die Wirkung von DMSO ist, sondern tatsächlich die der Verbindung. Nachdem ich mir also alle Verbindungen, alle 18, angeschaut hatte, stachen drei Verbindungen als wirklich interessant für uns heraus, und das waren die Verbindungen 9, 10 und 13, weil diese bei der Konzentration, bei der wir sie getestet haben, die beste Wirkung hatten. Also beschlossen wir, uns die Auswirkungen dieser Verbindungen auf diese, wie ich bereits erwähnte, G544D, aber auch auf die R406H STXBP1-Mutanten anzusehen. Und wie Sie hier sehen können, sehen Sie eine Zunahme der Menge an STXBP1. Hier ist nur ein Beispiel für ein Experiment. Aber als wir eine große Anzahl von Experimenten quantifizierten, sahen wir einen Anstieg der Menge des STXBP1 G544D-Proteins, und Sie können hier bei unterschiedlichen Konzentrationen jeder der Verbindungen sehen. Wir sahen also eine Zunahme unserer Missense-Mutation von weniger STXBP1 zu mehr STXBP1.

Und als Nächstes haben wir beschlossen, einen Blick darauf zu werfen, ob die Verbindungen auch einen Effekt auf das Wildtyp-Protein haben könnten. Da also einige Mutationen keine Missense-Mutationen verursachen, sondern nur eine der Kopien des Gens beseitigen, so dass es nur eine Wildtyp-Kopie des Proteins in der Nervenzelle gibt, haben wir uns auch das Wildtyp-Protein angesehen. Und wir sahen einen Anstieg bei Verbindung 9 des STXBP1-Wildtyp-Proteins. Hier waren wir also gespannt, dass das allererste Experiment funktioniert hat. Wir sahen einen Anstieg der Proteinmengen. Also beschlossen wir, zu sehen, ob wir eine funktionelle Rettung sehen könnten - im Grunde genommen, ob wir jetzt mehr STXBP1 haben, ob das STXBP1 seine Aufgabe erfüllen kann.

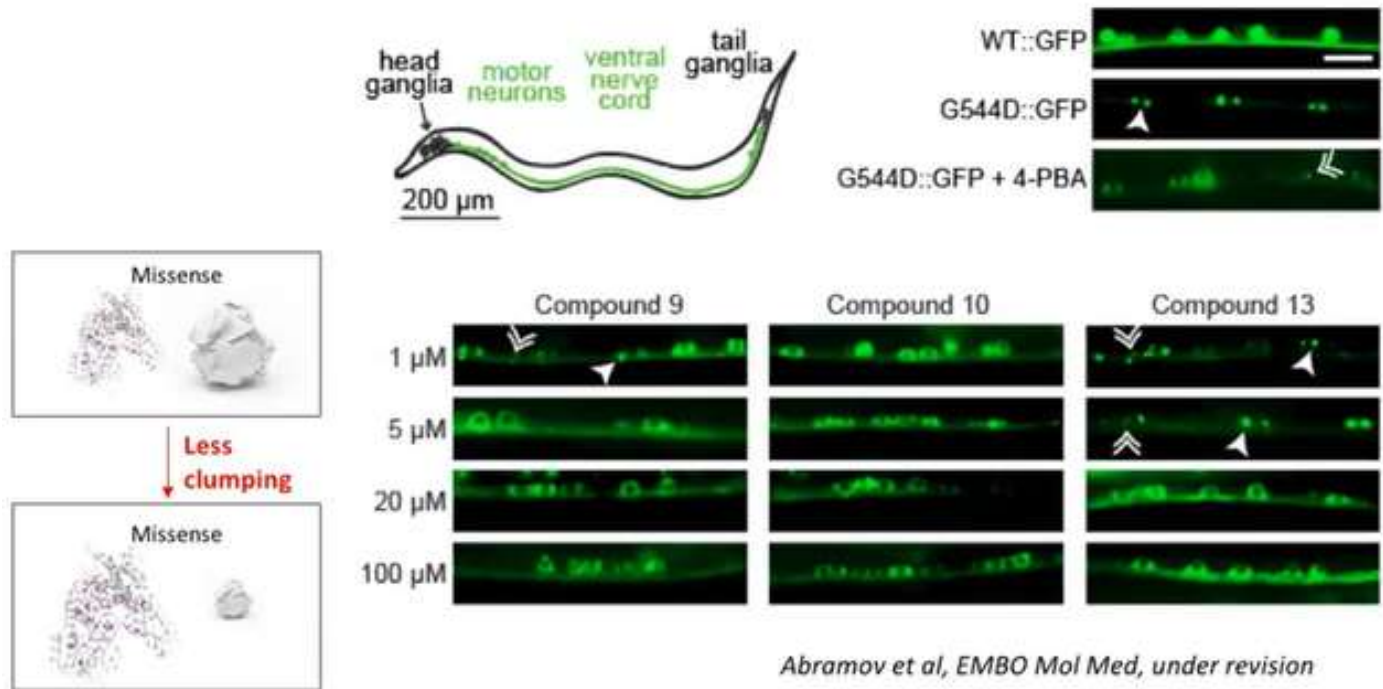
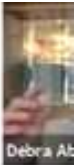
Rescue of spontaneous nerve cell firing



Wir haben dies also durch ein Experiment erreicht, das sich mit etwas befasst, das Neuronen- oder Nervenzellfeuer genannt wird. Wie Jacqueline vorhin erwähnte, sprechen all diese Nervenzellen sozusagen miteinander, und die Art und Weise, wie die Botschaften beginnen, ist in Wirklichkeit eine elektrische Aktivität. Was wir also sehen wollten, war, ob wir eine Zunahme der elektrischen Aktivität unserer Nervenzellen feststellen konnten, als wir die Verbindung hinzufügten. Also fangen wir an. Alles ist zu hundert Prozent normalisiert, das ist eine willkürliche Zahl. Und dann wollen wir sehen, ob sie von hundert erhöht oder von hundert verringert wird, und so weiter. DMSO ist also, wie gesagt, die Kontrolle. Es ist das, was wir benutzen, um einfach etwas zu haben, mit dem wir alles vergleichen können. Sie können es hier sehen. Die schwarzen Linien zeigen an, wann wir diese Nervenzellfeuer, diese Nervenzellaktivität haben. Sie können das hier unten sehen. Das sind tatsächlich die Nervenzellen, die auf einer speziellen Platte aufgebracht sind, die diese elektrische

Aktivität ablesen kann. Und Sie können sehen, dass dies G544D-Neuronen sind. Nach der Zugabe des DMSO sind sie nicht sehr aktiv. Aber Sie können hier sehen, dass mit der Zugabe von Verbindung 9 in einer ziemlich niedrigen Konzentration und Verbindung 13 in einer ziemlich niedrigen Konzentration mehr von ihnen zu sehen sind. Es sind diese schwarzen Linien, die auf mehr Aktivität hinweisen. Diese Nervenzellen werden also gerettet. Sie verhalten sich so, wie sie sein sollten. Sie sollten in diesen Zellen oder in dieser Umgebung relativ aktiv sein. Wir haben uns also auch darüber gefreut, dass sich nicht nur unser Proteingehalt erhöht hat, sondern dass wir auch mehr Aktivität unserer Nervenzellen gesehen haben. Und nachdem wir dies gesehen hatten, wollten wir sehen, ob wir auch ähnlich wie beim 4-Phenylbutyrat eine Rettung in unserem Wurmmodell sahen. Hier ist also wieder das, worüber Noah gesprochen hat.

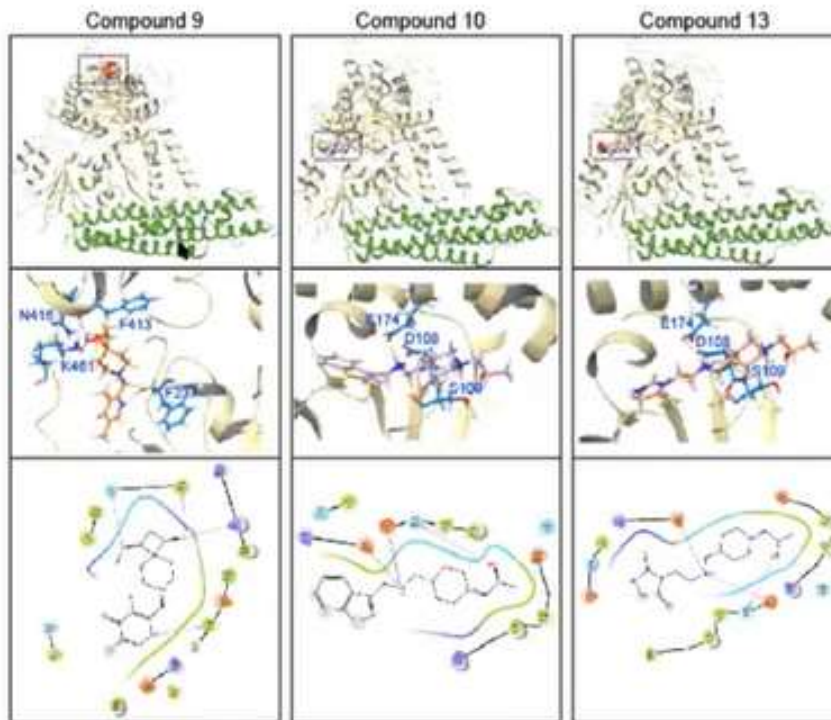
Reduced aggregation of mutant STXBP1



Abramov et al, EMBO Mol Med, under revision

Hier ist ein sehr, sehr großer Wurm im Verhältnis dazu, wie groß er tatsächlich ist. Und Sie können sehen, dass dies das Nerven-Rückenmark ist, das wir in diesem hellgrünen Protein markieren können. Wenn Sie den Wildtyp STXBP1 haben, sehen Sie das diffuse Schirmmuster, was bedeutet, dass STXBP1 im gesamten Rückenmark zu finden ist. Gegenüber der Mutante STXBP1, die wiederum die G544D-Mutante ist, sieht man statt der Ausbreitung von STXBP1 diese Aggregate, diese Klumpen, und es ist nicht da, wo es sein sollte, aber mit dem 4-Phenylbutyrat hier oben sieht man, dass es eine Befreiung dieses Klumpens gibt, man hat weniger Klumpen, und man fängt irgendwie an, das STXBP1 wieder überall zu sehen, obwohl dies die Missense-Mutation ist. Also fügten wir unsere Verbindungen hinzu und sahen uns genau dasselbe an, und hier sieht man Verbindung 9, Verbindung 10 und Verbindung 13. Sie wiederum haben STXBP1 überall im gesamten Rückenmark dieser Würmer. Sie sehen also weniger Verklumpungen, Sie sehen auch höhere Werte. Ich meine, in diesem Fall sieht man sehr wenig, wenn hier oben keine Befreiung erfolgt, aber hier unten sieht man wieder die Wiederaufnahme des Phänomens, die normale Lokalisation und das Auspunkeln sind viel weniger. Wir haben uns also auch darauf gefreut, dies zu sehen. Dies war ein großes Experiment, und es ist auch visuell so auffällig, und es deutet gewissermaßen auf eine Verringerung der Aggregation der Mutante STXBP1 hin.

Binding of compounds 9, 10 and 13



So wird also die Bindung der Verbindungen tatsächlich vorhergesagt. Auf Verbindung 9, Verbindung 10 und Verbindung 13 haben wir uns also für die Dauer dieser Arbeit wirklich konzentriert, weil sie wirklich die stärksten Wirkungen zeigten. Und Sie können hier sehen, dass Verbindung 9 an Stelle eins bindet, Verbindung 10 und Verbindung 13 an Stelle zwei. Und hier ist die Übersicht, hier ist die Bogenform, das STXBP1-Protein. Und dann ist hier unten die tatsächliche chemische Struktur, wie die kleinen Verbindungen mit STXBP1 interagieren und dann wirklich spannend und eine ziemlich wichtige Tatsache ist, dass insbesondere Verbindung 10 und Verbindung 13, ich weiß nicht, ob Sie das erkennen können, aber die Struktur hier, die hexagonale Struktur der Verbindungen ist sehr ähnlich. Sie haben also eine wirklich ähnliche Struktur. Wir waren also gespannt, dass diese ähnlichen Verbindungen ähnliche positive Wirkungen haben, was bedeuten könnte, dass dieser ähnliche Teil der Struktur der aktive Teil ist. Und zweitens können wir vielleicht mit diesen Verbindungen chemisch arbeiten und sie geringfügig verändern, um sie potenter zu machen oder den Zugang zum Gehirn oder zu diesen Dingen zu erleichtern. Und dann ist Verbindung neun, wie ich bereits erwähnt habe, die Stelle eins, die eine andere chemische Struktur hat und sich in einem anderen Bereich bindet. Aber wir konnten auch modellieren, wie sie sich bindet. Ich denke, ich werde jetzt zu Jacqueline übergehen.

Jacqueline:

Ich möchte das Ganze also abschließen. Wie Sie also gerade gesehen haben, sind wir sehr froh, dass wir einige Wirkstoffe in der Pipeline haben, die in unseren Zellsystemen und bei den Würmern recht erfolgreich waren. Aber das wirft natürlich ein paar Fragen auf. Wenn Sie noch eine Folie anklicken, Debbie. Ja, machen Sie weiter. Wir wissen also im Grunde genommen nicht, ob unsere Wirkstoffe den Krankheitsphänotyp in einem Gehirn umkehren.

On-going & Future studies

Jacqueline

- ✓ Successful rescue in cellular system and worms

Questions:

- Do compounds revert the STXBP1 phenotype in a brain?
- To what degree revert compounds the STXBP1 phenotype in a brain?
- Is there a critical period for when treatment needs to start?



Approach:

- Generate mouse models (Single copy of STXBP1 with and without G544D mutation)
- Assess phenotype during development and aging
- Treat mice with compounds and assess changes in phenotype
 - Determine effect of drugs when given in utero, prenatal, at juvenile age, or as adult
 - 4-Phenylbutyrate is straightforward: mix into drinking water at FDA-approved concentration
 - Novel compounds require more testing: toxicology, pharmacology, blood-brain-barrier penetration, potential need for making derivatives

Wie gesagt, wir haben nur in Zellen und in Würmern untersucht. Und wenn Sie einen, was auch immer, anklicken, wissen wir auch nicht, ob er ihn umkehrt, bis zu welchem Grad er ihn umkehrt?

Und die letzte große Frage ist, ob es ein kritisches Zeitfenster gibt, in dem die Behandlung beginnen muss. Ist es wirksamer früher zu beginnen? Haben wir die gleiche Effizienz, wenn wir später behandeln? Das sind also alle wichtigen Fragen, die wir versuchen, jetzt anzugehen. Und wie machen wir das? Wir sind dabei, zwei Arten von Mausmodellen zu erstellen. Die eine ist eine Art Huckepack auf das Modell von Mingshan Xue, der im Wesentlichen eine einzige Kopie von STXBP1 besitzt, so dass die andere entfernt wird, was eine Art von Deletions-Mutationen, Frameshift-Mutationen und Trunkierungen nachahmt, um zu sehen, ob wir dort irgendwelche vorteilhaften Effekte erhalten. Das andere Mausmodell, das wir erzeugen werden, enthält eine normale Kopie und eine Kopie einer Missense-Mutation. Und wir entscheiden uns für G544D, einfach weil wir dafür viele Werkzeuge und eine Menge Daten haben, so dass wir die Daten in Mäusen mit den Daten vergleichen können, die wir bisher gesammelt haben.

Und die Idee ist - und Joe wird dies tun - die gesamte Mausearbeit zu übernehmen. Die Idee ist also zu messen oder zu bewerten: Wie verändern sich diese Mäuse während der Entwicklung und während des Alterns? Sieht es ähnlich aus wie das, was Ihre Kinder durchmachen? Debbie, wenn Sie noch eine Folie anklicken. Und dann zu versuchen, diese Mäuse mit unseren Verbindungen zu behandeln und dann nach Veränderungen in ihrem Phänotyp zu suchen. Und worüber wir freuen ist, was die Mäuse uns erlauben. Debbie, wenn Sie noch eine weitere Folie anklicken - wie ich bereits erwähnt habe, können wir die Wirkung der Medikamente bestimmen. Sind sie am wirksamsten, wenn sie im Mutterleib verabreicht werden? Haben wir positive Wirkungen, wenn sie vorgeburtlich, im jugendlichen Alter oder als Erwachsene verabreicht werden? Und ich denke, das wird uns viel darüber verraten, was unser optimales Zeitfenster ist, oder vielleicht funktioniert es später genauso gut. Für 4-Phenylbutyrat ist die ganze Sache ziemlich einfach. Wir können es ins Trinkwasser mischen. Wir wissen, dass es ins Gehirn gelangt, wenn die Mäuse es trinken. Wir kennen die richtige Konzentration, weil es von der FDA zugelassen wurde. Das sollte also ziemlich unkompliziert sein. Für die drei neuartigen Wirkstoffe, über die Debbie gerade gesprochen hat, brauchen wir noch viel mehr Arbeit, weil wir keine Ahnung davon haben: Sind sie noch toxisch? Erreichen sie das Gehirn? Sind sie stabil? Und es besteht höchstwahrscheinlich die Notwendigkeit, die chemische Struktur ein wenig zu verändern, um sie anzupassen, um sie wirksamer und mit weniger Nebenwirkungen zu machen. Und so wird Shabash uns dabei helfen, Derivate davon herzustellen. Und damit möchte ich dann dem Team und allen danken, die hauptsächlich daran beteiligt waren, Noah und Debbie und unseren jüngsten Mitgliedern, die mit der Arbeit daran begonnen haben.

Acknowledgements

Jacqueline

Burré lab

Noah Guiberson
Debby Abramov
Katie Carnazza
Lauren Komer
Dr. Virginia Gao
Dr. André Pineda
Yoonmi Na
Dr. Joe Chiaro
Dr. Aniv Brukner
Parinati Kharel
Dr. Joe Chiaro



Collaborators

Dr. Manu Sharma
Dr. Jeremy Dittman
Dr. Betsy Ross
Dr. Subhash Sinha
Dr. Gregory Pestko
Dr. Andrew Daab

Dr. Matthijs Verhage

Families



Physicians

Dr. Joseph Chiaro
Dr. Zachary Grinspan



Wir haben eine große Gruppe von Mitarbeitern, die sich mit iPSC-Zellen, dem Wurm-Zeug, den virtuellen Bildschirmen und natürlich den Klinikern im Team beschäftigen. Und ich möchte besonders Matthijs hervorheben und ihm danken, der schon sehr, sehr früh seine Mauslinie mit uns geteilt hat. Das alles wäre also nicht möglich gewesen. Sehr schöne Zusammenarbeit mit ihm. Und ganz besonders möchte ich Dr. Grinspan danken, der vom ersten Tag an, als ich zu Cornell kam, von diesem Projekt sehr begeistert war. Und der jetzt tatsächlich über die klinische Pilotstudie sprechen wird, auf die wir alle sehr gespannt sind. Und ich danke Ihnen sehr. Und ich denke, wir werden das Q und A machen, wenn Zach seinen Vortrag beendet hat. Ich danke Ihnen.

Zach:

In Ordnung. Lassen Sie mich verbinden. Ich hoffe, dass mich alle hören können. Also Grüße, hallo, ich bin Zach Grinspan, ich bin Direktor der pädiatrischen Epilepsie hier in Weill Cornell. Und ich werde über diese Idee für eine Studie über eines der Moleküle sprechen, die Dr. Burré und ihr Labor für STXBP1 entdeckt haben: 4-Phenylbutyrat. Ich möchte nur mit einigen Danksagungen beginnen. Ein besonderer Dank geht an Dr. Burré für Noah und Deborah aus ihrem Labor. Es war wirklich wunderbar, mit ihnen zusammenzuarbeiten. Dr. Burré hat Recht. Ich weiß noch, als sie anfing, sagte sie: "Hey, ich arbeite an MUNC-18. Und ich dachte: "Ich weiß nicht, was das ist, aber lass es mich googeln. Und dann stellte sich heraus, dass es STXBP1 ist. Ich sagte: "Oh, das kenne ich, weil wir Patienten sehen, die das haben. Also war ich wirklich aufgeregt. Und dann, ein paar Jahre später, kommt sie und klopft an meine Tür und sagt: "Hey, ich glaube, wir haben es vielleicht herausgefunden. Also erzählte sie mir von der Arbeit, die sie und ihr Team geleistet hatten, und meinte: "Hey, ich glaube, wir haben es herausgefunden. Und an diesem Punkt dachten wir: "Na gut, mal sehen, ob wir eine Studie zusammenstellen können. Wir müssen sehen, ob wir das hinbekommen.

Charlene:

Zach, deine Folien werden nicht gezeigt.

Zach:

Oh, das ist wichtig. Die Danksagungen gelten auch dann, wenn meine Folien nicht gezeigt werden. Vielleicht wäre es besser, wenn ich meinen Bildschirm teilen würde. Ist das besser?

Charlene:

So, jetzt sehen wir Ihre Folien, aber sie sind klein. Wenn Sie in den Präsentator-Modus gehen könnten.

Zach:

Da haben wir's. In Ordnung. Ich verspreche, dass meine medizinischen Fähigkeiten besser sind als meine PowerPoint- und Zoom-Fähigkeiten. Der nächste Dank geht also nur an unsere Geldgeber, wir erhielten Mittel aus zwei Quellen: dem Million Dollar Bike Ride und dem CHOP Orphan Disease Center.

Funding & Thank yous

- **Cornell Colleagues**
 - Jacqueline Burré
 - Noah Guiberson
 - Debra Abramov
- **Funders**
 - Million Dollar Bike Ride & CHOP Orphan Disease Center
 - Clara Inspired (Baum Family)
- **Community & Study Design Guidance**
 - John Oldenhoff
 - Ingo & Katie Helbig
 - Anne Johnson
 - Charlene Son Rigby
 - Heather Jones

Und dann hat Clara Inspired über die Familie Baum Mittel zur Verfügung gestellt, um dies in Gang zu bringen. Und dann schließlich ist die STXBP1-Gemeinschaft unglaublich. Und es war persönlich inspirierend, viele von Ihnen zu treffen, mit Ihnen zu arbeiten und Feedback zu erhalten, insbesondere zu diesem Protokoll. John Oldenhof bekommt einen besonderen Applaus. Ich habe mit ihm geplaudert, und er meinte: "Ja, ich bin also ein Experte für Phase-Eins-Studien. Ich meinte: "Das wollen wir machen. Er las sich also einen frühen Entwurf des Protokolls durch und gab ein hervorragendes, erstaunliches Feedback. Die Helbigs, Ingo und Katie waren wirklich wunderbar, mich in diese Gemeinschaft zu bringen. Und dann von der STXBP1-Stiftung Anne Johnson, Charlene und Heather, Eltern von Kindern, die einen beträchtlichen Teil ihres Lebens der Hilfe für die Gemeinschaft widmen. Das ist sehr inspirierend. Und ich bin Ihnen allen dankbar. Ich danke Ihnen allen. Ich werde also über die Studie sprechen und darüber, wie die Patientenbeteiligung aussieht. Ich wurde mit drei Aufgaben betraut.

Agenda

- Overview of PB clinical trial (Weill Cornell Medicine, NYC)
- What patient participation looks like
- *Process for recruitment*

Die dritte war das Verfahren zur Rekrutierung. Wir stehen so kurz vor der Genehmigung durch das IRB, aber noch nicht ganz so weit. Ich werde also darüber sprechen, wie das aussehen könnte, aber die Details sind noch in Arbeit. Dies ist die Titelseite eines Dokuments, das wir unserem IRB erst letzte Woche vorgelegt haben.



TITLE: Glycerol Phenylbutyrate for STXBP1 Encephalopathy (STXBP1-E) Pilot

IRB Protocol #: 19-10020997

IND/IDE #: (none)

Version Date: 15 September 2020

Funding Source(s): Orphan Disease Center University of Pennsylvania, Horizon Pharma (for medication)

Principal Investigator:

Name: Dr. Zachary Grinspan
Address: 402 E 67th Street, LA 221 NY, NY 10069
Telephone: 646-962-8085
Fax: 917-210-3261
E-mail address: Zag9005@med.cornell.edu

Co-Investigators:

Name: Natasha Basma
Address: 402 E 67th Street, LA 221 NY, NY 10069
Telephone: 646-962-8167
Fax: 646-962-0281
E-mail address: Nab2781@med.cornell.edu

Participating Sites: List all participating sites (include site name, PI, and contact information).

Weill Cornell Medicine only.
Pilot Study.

Sie haben unser Protokoll überprüft und uns einige kleine Rückmeldungen über einige kleine Dinge gegeben, die wir korrigieren müssen, und dann haben wir das einfach zurückgeschickt. Wir sind also eifrig bemüht, dies in Angriff zu nehmen, sobald sie uns das Okay geben. Diese Folie rekapituliert nur, was jeder im Publikum wirklich weiß.

STXBP1 Encephalopathy

Zachary

- 85% epilepsy: epileptic spasms (65.3%), focal seizures (57.9%), and tonic seizures (41.3%)
- 60% abnormal EEG
- Seizure freedom was attained in 1 in 3 patients while 1 in 3 remain therapy resistant.
- Intellectual disability in all (88% severe to profound)
- 20% Autism or autistic features was seen in 1 in 5 patients.
- Other common phenotypic symptoms include axial hypotonia, ataxia or ataxic gait, tremor, spasticity and dyskinesia, or dystonia.
- MRI Brain
 - Half normal
 - cerebral atrophy (33%)
 - thinning of the corpus callosum (16%),
 - hypomyelination (16%).
- Genotype / phenotype correlation uncertain
- STXBP1 = Munc18-1; regulates synaptic vesicle tracking & docking

Die STXBP1-Enzephalopathie ist eine Neuroentwicklungsstörung. Die überwiegende Mehrheit der betroffenen Kinder leidet an Epilepsie. Und das ist wichtig, weil wir unsere Studie um Krampfanfälle herum konzipiert haben. Viele haben ein abnormales EEG. Einer von drei scheint anfallsfrei zu werden, während einer von drei Anfällen therapieresistent ist. Intellektuelle Behinderungen sind nahezu universell, wobei die Mehrheit schwer bis schwerwiegend ist. Autismus oder autistische Züge sind sehr häufig, eher üblich sind etwa 20%. Und dann gibt es eine Vielzahl von Bewegungs- und

Tonusstörungen, die beschrieben werden: Hypotonie, Ataxie usw. Die Kernspintomographie kann manchmal normal sein, ein anderes Mal aber auch unspezifische Befunde aufweisen. Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation, zumindest beim letzten Durchlesen, erschien mir unsicher.

ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-018-06507-4

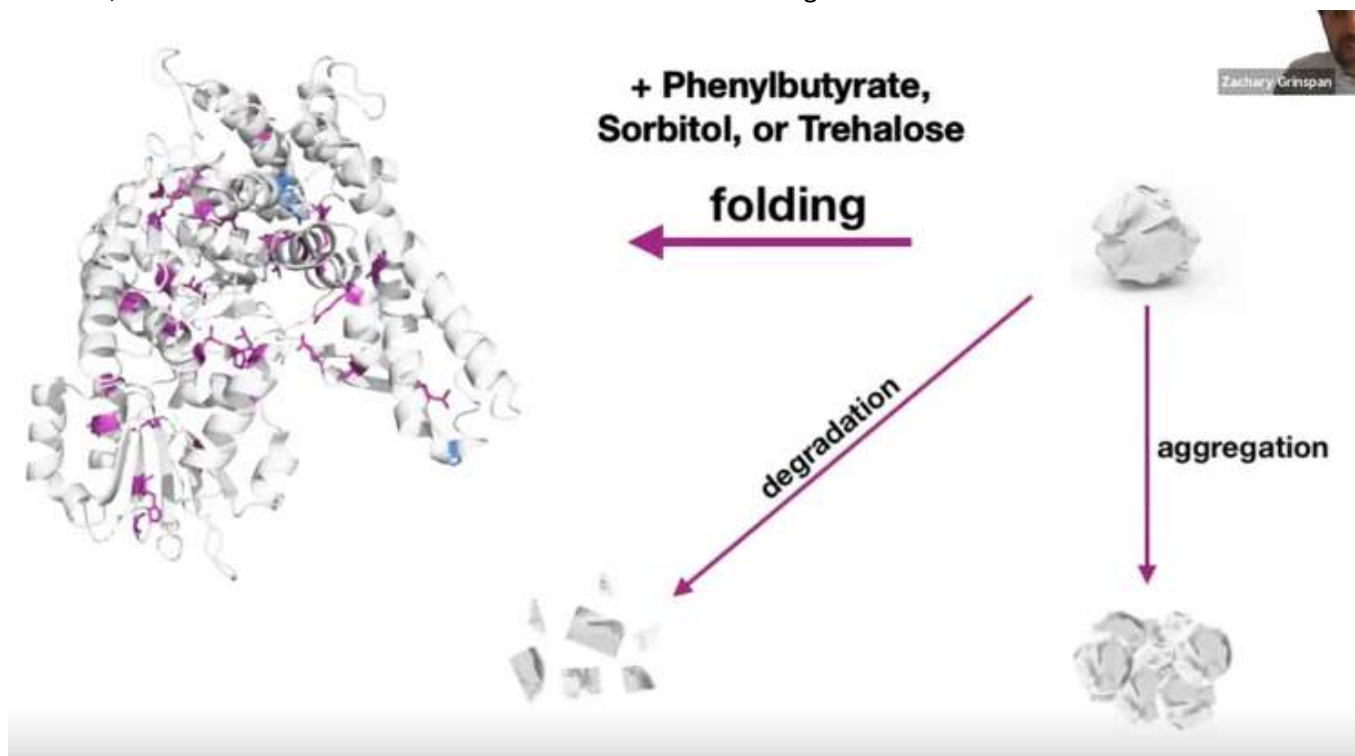
OPEN

Mechanism-based rescue of Munc18-1 dysfunction in varied encephalopathies by chemical chaperones

Noah Guy Lewis Guiberson¹, André Pineda¹, Debra Abramov¹, Parinati Kharel¹, Kathryn E. Carnazza¹, Rachel T. Wragg², Jeremy S. Dittman² & Jacqueline Burré¹

Und das Protein selbst reguliert das Verfolgen und Andocken der synaptischen Vesikel, Noah Guiberson und der Rest von Dr. Burré's Team veröffentlichten diese Arbeit, die, wie Sie gehört haben, diese aufregende Idee aufbrachte, dass eines dieser Moleküle durch einen chemischen Chaperonprozess möglicherweise dazu beitragen könnte, die Funktion des Proteinprodukts von STXBP1 zu unterstützen.

Wir haben uns also diese drei Moleküle angesehen, die sie getestet haben, und Sorbitol und Trehalose waren sehr attraktiv, weil sie Zucker sind und es einfach zu bekommen und zu geben schien.



Aber dann machten wir uns Sorgen, na ja, wie wird das ins Gehirn gelangen? Wenn man sie isst, werden sie ziemlich schnell verstoffwechselt. Wir wissen nicht sehr viel über die Durchdringung der Blut-Hirn-Schranke. Die Idee, sie direkt in das Gehirn zu verabreichen, klingt chirurgisch und hart.

+ Phenylbutyrate,
Sorbitol, or Trehalose

- Sorbitol and Trehalose – Sugars
- Phenylbutyrate – FDA Approved for urea cycle disorders & crosses blood-brain barrier

Im Gegensatz dazu ist Phenylbutyrat ein von der FDA zugelassenes Medikament für Harnstoffzyklus-Störungen, und es gibt gute Daten, die darauf hindeuten, dass es die Blut-Hirn-Schranke tatsächlich durchdringt. Dies schien also die beste

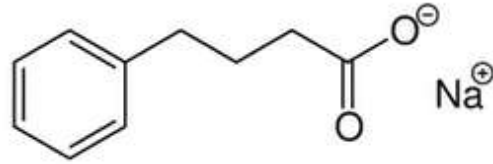
Wahl für eine klinische Studie zu sein. Es gibt zwei Produkte auf dem Markt, Natriumphenylbutyrat und Glycerinphenylbutyrat.

+ Phenylbutyrate, Sorbitol, or Trehalose

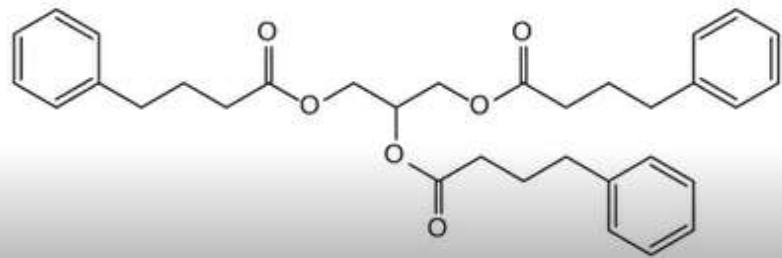
Zachary C

- Sorbitol and Trehalose – Sugars
- Phenylbutyrate – FDA Approved for urea cycle disorders & crosses blood-brain barrier

Sodium phenylbutyrate



Glycerol phenylbutyrate



Wir haben das Glycerin betrachtet, aber Phenylbutyrat ist offenbar viel besser verträglich. Und so haben wir uns dafür entschieden. Es ist kostspielig. Das ist einfach nur so, eine Art Laienliteratur. Nun, eher die Fachliteratur aus der Pharmaindustrie, die fünf der teuersten Medikamente in den USA auflistet, und Glycerin-Phenylbutyrat steht dort auf Platz vier.

The most expensive drugs in the US: Ranking the top five

5. Spinraza (nusinersen) – \$750,000 first year and \$375,000 thereafter
4. RAVICTI (glycerol phenylbutyrate) – \$793,632
3. Luxturna (voretigene neparvovec-rzyl) – \$850,000
2. Exondys 51 (eteplirsen) – between \$750,000 and \$1.5m
1. Zolgensma – \$2.12m

Bei einigen Medikamenten kann man es einfach ausprobieren und sehen, wie es läuft. Wir als Ärzte dürfen Dinge verschreiben, die nicht etikettiert sind, und wenn Sie ein Gespräch mit einer Familie führen, können Sie das tun. Bei dieser Substanz war es unwahrscheinlich, dass das funktioniert. Die Idee, eine Versicherungsgesellschaft anzurufen und zu sagen: Hören Sie zu, wir denken, das würde vielleicht funktionieren. Wir haben keine Daten, aber wir werden es einfach versuchen. Und das wird Sie 800.000 Dollar kosten, das schien unmöglich.

Summary of clinical trial phases

Phase	Primary goal	Dose	Patient monitor	Typical number of participants	Success rate ^[2]	Notes
Preclinical	Testing of drug in non-human subjects to gather efficacy, toxicity and pharmacokinetic information	Unrestricted	Scientific researcher	No human subjects, <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> only		Includes testing in model organisms. Human immortalized cell lines and other human tissues may also be used.
Phase 0	Pharmacokinetics; particularly oral bioavailability and half-life of the drug	Small, subtherapeutic	Clinical researcher	10 people		Often skipped for Phase I.
Phase I	Dose-ranging on healthy volunteers for safety	Often subtherapeutic, but with ascending doses	Clinical researcher	20–100 normal healthy volunteers (or cancer patients for cancer drugs)	Approx. 70%	Determines whether drug is safe to check for efficacy.
Phase II	Testing of drug on participants to assess efficacy and side effects	Therapeutic dose	Clinical researcher	100–300 participants with a specific disease	Approx. 33%	Determines whether drug can have any efficacy; at this point, the drug is not presumed to have any therapeutic effect
Phase III	Testing of drug on participants to assess efficacy, effectiveness and safety	Therapeutic dose	Clinical researcher and personal physician	300–3,000 people with a specific disease	25–30%	Determines a drug's therapeutic effect; at this point, the drug is presumed to have some effect
Phase IV	Post marketing surveillance in public	Therapeutic dose	Personal physician	Anyone seeking treatment from a physician	N/A	Monitor long-term effects

https://en.wikipedia.org/wiki/Phases_of_clinical_research

Also beschlossen wir, es formeller anzugehen, einen Versuch zu starten und uns um eine Finanzierung zu bemühen. Diese Folie ist nur für diejenigen gedacht, die mit klinischen Studien nicht vertraut sind, um hier etwas Vokabular einzufügen. Sie haben präklinische Daten, die Dr. Burré und Debbie und Noah vorgestellt haben, d.h. Daten von Tieren oder Laborkulturen, die darauf hindeuten, dass eine Substanz im Menschen wirken kann, aber nicht wirklich im Menschen ist. Einige Leute werden eine Phase-Null-Studie durchführen, was Ihnen einige vorläufige Daten liefert. Sie verwenden Medikamente in kleinen Dosen. Das wird nicht immer gemacht. Die Phase Eins, um die es bei dieser Studie wirklich geht, ist eine erste Studie, bei der Sie die Substanz an Menschen verabreichen, wobei Sie manchmal die Dosis variieren und nach Sicherheit und Verträglichkeit suchen. In unserem Fall geht es darum, ein Bewertungsparadigma zu entwickeln, und man will sehen, wie gut es funktioniert. Der Begriff, der mir bei der Konzeption der Studie gegeben wurde, war eine Durchführbarkeitsstudie, was in gewisser Weise zu Phase Eins passt. Phase Zwei sind größere Studien, bei denen Sie wirklich auf die Wirksamkeit schauen, um zu verstehen, welche Dosis Sie wirklich geben sollten, und um Nebenwirkungen zu verstehen. Und dann ist Phase Drei als eine größere, definitivere Studie gedacht, bei der man wirklich versucht, die Wirksamkeit und Effektivität zu beurteilen. Und dann, bei neuen Molekülen, wenn Sie ein Medikament zugelassen haben, schicken Sie es in die Welt hinaus, um es sich verschreiben zu lassen. Sie führen die Arbeiten der Phase Vier durch, in der Sie die Überwachung nach dem Inverkehrbringen durchführen und sicherstellen, dass es keine unvorhergesehenen Nebenwirkungen oder Probleme gibt. **Wir führen also eine Phase-Eins-Machbarkeitsstudie zu Phenylbutyrat durch. Die Idee ist, dass wir dies 10 Kindern verabreichen. Und unser Ziel ist es, die Verträglichkeit, Sicherheit und Pharmakokinetik zu prüfen, d.h. die Konzentrationen, die wir im Blut von Kindern sehen, die das Medikament einnehmen. Und das Potenzial für die Wirksamkeit.**

Phase 1 “Feasibility” study of PB for STXBP1-E

Zachary Grinspo

Aim. Administer PB to 10 children with STXBP1-E to assess tolerability, safety, pharmacokinetics, and potential for efficacy.

Safety Outcomes. Known side effects of glycerol phenylbutyrate, changes in vital signs, EKG changes, EEG changes, increase in seizures, changes in clinical laboratory results, and/or changes in physical examination

Tolerability Outcomes. Medication compliance (i.e. what percentage of the doses are taken)

Pharmacokinetics. Plasma concentration of phenylbutyrate and active metabolites.

Mit nur 10 Patienten werden wir nicht in der Lage sein, die Wirksamkeit zu beweisen, aber wir werden einige anekdotische Informationen erhalten. Wenn das Medikament hochgradig wirksam ist, haben wir einige Tipps, die wir bei einzelnen Personen statistisch auswerten können, aber das ist ein bisschen weit hergeholt. Bei den Sicherheitsergebnissen, um die es uns eigentlich geht, geht es darum, wie oft wir die bekannten Nebenwirkungen von Glycerin-Phenolbutyrat sehen. Gibt es Veränderungen der Vitalparameter? EKG- oder EEG-Veränderungen? Wie wirkt es sich besonders auf Krampfanfälle aus? Verschlimmert es die Anfälle? Wir führen eine Überwachung der klinischen Laborwerte durch und suchen nach Veränderungen in der Untersuchung. Und dann die Verträglichkeit, wir wollen sehen, ob die Leute es einnehmen, wie oft es Probleme bei der Verabreichung des Medikaments gibt, ob die Nebenwirkungen unerträglich sind, usw. Und dann die Pharmakokinetik, im Wesentlichen geht es um die Plasmaspiegel im Blut des Wirkstoffs Phenylbutyrat und dann um einige der Metaboliten. Die Ergebnisse, an denen die Gemeinschaft interessiert ist, werden wir als explorativ bezeichnen. Wir werden sie im Auge behalten. Wir werden sie messen.

Zachary Grinspo

Exploratory Outcomes

- Seizure burden
- EEGs abnormalities
- Qualitative description of abnormal movement captured on video
- Quality of Life
- Development
- Movement disorder
- Behavior
- Sleep
- Caregiver qualitative experience

Bei nur 10 Patienten ist es unwahrscheinlich, dass wir definitiv beweisen können, dass irgendeiner von ihnen mit diesem Medikament geheilt wird. Aber hier liegt uns wirklich das Herzblut in den Händen. Und wir werden viel über diese Ergebnisse nachdenken. Dinge wie Anfallsbelastung, EEG-Abnormalitäten, Bewegungsstörungen, Lebensqualität, Entwicklung, Verhalten, Schlaf und dann der Betreuer, qualitative Erfahrung. Einschluss- und Ausschlusskriterien.

Inclusion / Exclusion

Inclusion

- 2 month to 17 years with STXBP1-E *and seizures*
- *(preference for younger children)*

Exclude

- Taking alfentanil, quinidine, cyclosporine, or probenecid (known interactions with PB).
- Hepatic, renal, pancreatic insufficiency.
- Inborn errors of beta oxidation.
- Pregnancy
- Known hypersensitivity to phenylbutyrate
- Intestinal malabsorption
- Enrolled in another study within past 30 days

Die Altersspanne im Protokoll reicht von zwei Monaten bis zu 17 Jahren. Und eingeschlossene Personen müssen sowohl die Diagnose einer STXBP1-Enzephalopathie als auch häufige Krampfanfälle haben. Der Grund dafür ist, dass die Anfälle im Wesentlichen die Hauptanzeige dessen sind, wonach wir suchen wollen. Und deshalb wollen wir sicherstellen, dass wir in dieser Machbarkeitsstudie Kinder haben, die häufig genug Anfälle haben, so dass wir eine Veränderung sehen und verstehen können, ob es wahrscheinlich einen Effekt gibt. Wir werden jüngere Kinder bevorzugen, und ich bin hier absichtlich etwas nachsichtig mit der Sprache, weil die tatsächlichen Anmeldungen davon abhängen werden, wer sich bewirbt. Und als wir das Protokoll schrieben, wollten wir uns nicht selbst im Weg stehen, indem wir sagten, dass wir nur Kinder von zwei Monaten bis zu fünf Jahren brauchen werden und dann keine Kinder finden können, die sich tatsächlich anmelden. Die offizielle Einschreibung beträgt also zwei bis 17 Jahre, aber wir werden jüngere Kinder bevorzugen. Und dann gibt es eine Reihe von Ausschlusskriterien. Es gibt eine Handvoll Medikamente, die mit Phenylbutyrat interagieren. Jeder, der eine Leber-, Nieren- oder Bauchspeicheldrüseninsuffizienz hat oder zufällig auch einen angeborenen Fehler der Beta-Oxidation hat. Das ist zwar ziemlich selten. Jeder, der schwanger ist. Und wenn es eine bekannte Überempfindlichkeit gegen dieses Medikament oder eine Darmmalabsorption gibt, ist das wichtig, weil wir das Medikament oral verabreichen. Und wenn jemand in den letzten 30 Tagen an einer anderen Studie teilgenommen hat, vor allem, wenn das Risiko besteht, dass sich ein anderes Prüfpräparat in seinem System befindet, würden wir ihn nicht aufnehmen wollen. Also werden wir Nebenwirkungen überwachen.

Safety

Monitor for side effects

- Amenorrhea / menstrual dysfunction, decreased appetite, body odor, GI upset, constipation, rectal bleeding, pancreatitis, aplastic anemia, arrhythmia, renal tubular acidosis, rash, and somnolence.
- Confusion or change in mental status.

Drug interactions

- Phenylbutyrate may reduce the effectiveness of midazolam, which is often used as an anti-seizure medication.

Und eine der Wechselwirkungen, die für diese Bevölkerungsgruppe relevant sind, besteht darin, dass, wenn jemand Midazolam verwendet, um Anfälle abzubrechen, sei es durch die Nase oder auf anderem Wege. Phenylbutyrat wurde

beschrieben, das die Wirksamkeit von Midazolam verringert, so dass darauf geachtet werden muss. Dies ist das Protokoll. Ich lege es nur vor, um zu zeigen, dass wir es über 14 Wochen ausgelegt haben, wie es ablaufen wird.

Table. Summary of Protocol for Glycerol Phenylbutyrate for STXBP1 Encephalopathy

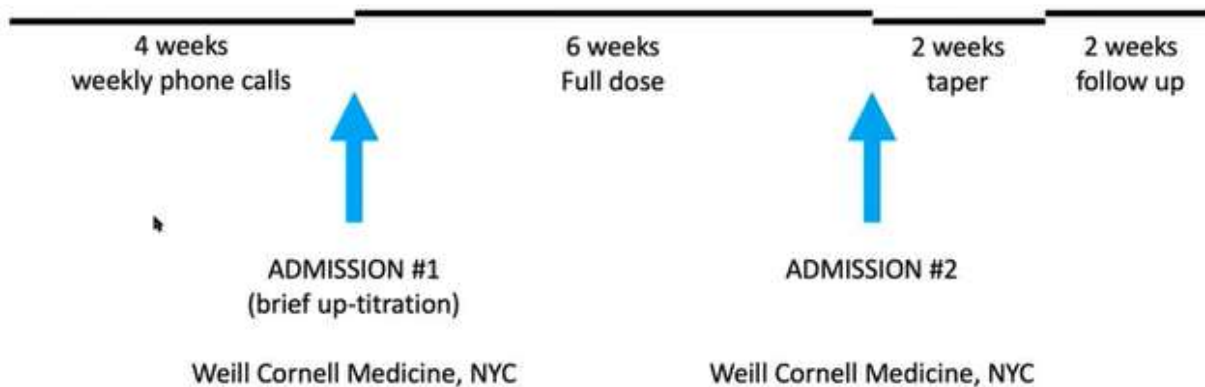
Category	Sub-Category	Measure	Timing: Wk 0: - 3 Wk 4 Wk 5 - 9 Wk 10 Wk 11&12 Wk 13&14								
			Setting:		Phone		In Person		Phone		
			Medication:	Off	Start	On	On	Taper	Off		
History	Prior Studies	Review Prior Studies (Imaging, EEG, Genetics)	X								
Clinical Measures	Seizure Burden	Seizure Diary [§]	X	X	X	X	X	X	X		
		48h EEG, seizure count		X		X					
	Adherence	Questionnaire / Med Diary			X	X	X				
	Quality of Life	QOLCE		X		X					
		PELHS QOL-2	X	X	X	X	X	X			
	Development	DP-3		X		X					
	Movement Disorder	EEG Bruxism Pattern [†]		X		X					
		Ataxia Scale (Sara Scale)		X		X					
	Behavior	CARS		X		X					
	Sleep	CSHQ		X		X					
Side Effects	Questionnaire		X	X	X	X					
Clinical Evaluation	Routine Care	History	X	X	X	X	X	X			
		Physical Exam		X		X					
	Routine Labs	CBC, Chemistries, LFTs, UA		X		X					
		Amylase, Lipase		X		X					
		ASM levels		X		X					
		Ammonia, Amino Acids		X		X					
		EKG		X		X					
	Specialized Labs	Plasma phenylbutyric acid (PBA)		X (3)		X					
		Plasma phenylacetic acid (PAA)		X (3)		X					
		Plasma phenylacetylglutamine (PAGN)		X (3)		X					
Urine phenylacetylglutamine (PAGN)			X (3)		X						
Post hoc measures	EEG	Clinical Interpretation		X		X					
	Movements	Video		X		X					
	Patient Experience	Semistructured caregiver interview		X	X	X	X	X			
Other	Skin Biopsy (for fibroblasts)		X								

[†] Hirsch LJ, Crispin D. EEG checkerboard pattern of bruxism. *Neurology*. 1999 Sep 11;53(4):669
^{*} No change in medications or device settings for 4 weeks prior to medication administration
[§] Seizure counts will be collected via weekly phone calls at 14 time points (end of each of 14 weeks enrolled in study).
[‡] Review of the study protocol and consent will occur on the first phone call
 EEG, Electroencephalogram; QOLCE, Quality of Life in Childhood Epilepsy; CARS, Childhood Autism Rating Scale; PELHS, Pediatric Epilepsy Learning Health System; DP-3, Developmental Profile; ASM, Anti-Seizure Medication; CSHQ, Children's Sleep Habbits Questionnaire

Aber lassen Sie mich dies etwas ausführlicher beschreiben. Ich mache das also auf zwei Arten, um sicherzustellen, dass klar ist, wie es funktioniert.

Study Design

Zachar



Die ersten vier Wochen sind also eine Art Zeit des Kennenlernens, in der wir wöchentlich telefonieren werden, um zu erfahren, wie oft Sie Anfälle haben, und um Hintergrundinformationen zu erhalten. Dann werden wir eine dreitägige Aufnahme an der Cornell haben. Wir werden das Medikament aufbereiten, dann nehmen Sie es sechs Wochen lang ein,

und dann kommen Sie für die zweite Aufnahme zurück. Wir entwöhnen das Medikament zwei Wochen lang, und dann werden wir weitere zwei Wochen lang nachbereiten. Es sind also insgesamt 14 Wochen in der Studie. Ich werde das also einfach noch einmal mit etwas mehr Details wiederholen.

Study Design

Zachar



Weeks 0 – 3

Weekly tele-health
History
Seizure diary
Quality of Life

Die ersten vier Wochen sind also Beobachtung, dann acht Wochen Exposition. Ein paar Tage Aufwärmphase von insgesamt sechs Wochen bei der hohen Dosis, dann eine zweiwöchige Aufwärmphase, dann zwei Wochen Nachbeobachtung und dann zwei Wochen Nachbeobachtung. In diesen ersten vier Wochen werden wir also telemedizinische Besuche durchführen.

Ich glaube, als wir uns das ursprünglich vorgestellt haben, werden wir sagen: Hey, kommen Sie hoch, wir sehen Sie persönlich, lernen Sie kennen. Aber mit der Pandemie und mit der wirklichen Leichtigkeit der Telemedizin in der heutigen Umgebung fangen wir damit an. Wir machen eine Anamnese, führen ein Anfallstagebuch, wir messen - wir beginnen mit der Messung der Lebensqualität. Diese erste Aufnahme dauert drei Tage.

Study Design

Zachar



Week 4 (Start medication)

3 day admission
Begin medication DAY 2
Video EEG
Labs (Blood Draw)
Skin Biopsy
Scales: Quality of Life,
Development, Ataxia, Sleep
Video of Movements

Sie kommen am ersten Tag, wir schließen das EEG an und machen ein paar Labortests. Dr. Burré und ihr Labor werden, falls sie noch keine Hautbiopsie haben, kommen und die Einwilligung dazu einholen. Und dann werden wir damit beginnen, eine Reihe von Skalen, Lebensqualität, Entwicklung, Ataxie und andere Bewegungsstörungen und Schlaf zu messen. Und dann werden wir tatsächlich ein Video von einigen der Bewegungsstörungen aufnehmen, so dass wir, wenn sie schwierig zu beschreiben sind und in den vorhandenen Maßnahmen nicht gut erfasst werden, immer noch eine Dokumentation davon haben. Wenn wir mit dem Medikament, dem 4-Phenylbutyrat, beginnen, ist Revicti der Markenname.

Dosing

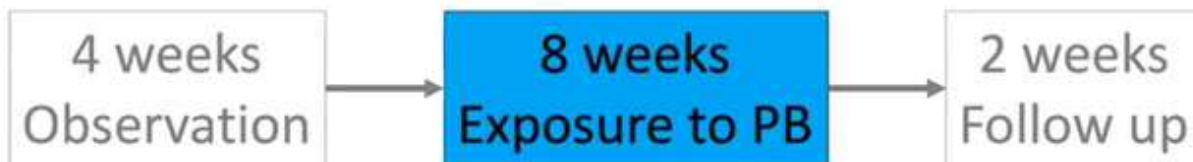
Zach

- Oral liquid, three times a day, up to maximum FDA approved dose (12g/m²/day)
- Day 1 and 2 will be at 1/9 the full dose
- Day 3 and 4 will be at 1/3 the full dose.

Es handelt sich um eine orale Flüssigkeit, die dreimal täglich verabreicht wird. Und um den Papierkram sauberer und schneller zu machen, sagten wir: Schauen Sie, wir gehen bis zu der von der FDA genehmigten Höchstdosis, die 12 Gramm pro Quadratmeter pro Tag beträgt. An den ersten beiden Tagen geben wir ein Neuntel dieser Dosis, am dritten und vierten Tag ein Drittel. Und dann gehen wir zur vollen Dosis über. Und noch einmal Hut ab vor John Oldenhof, der sagte: "Sie sollten wirklich langsam anfangen, so dass Sie, wenn es irgendwelche unvorhergesehenen Nebenwirkungen gibt, diese mit der niedrigeren Dosis beheben können. In den nächsten sechs Wochen werden wir also mit einigen wöchentlichen telemedizinischen Besuchen fortfahren.

Study Design

Zachary



Week 5 – 9 (Continue medication)

Weekly tele-health visits Seizure diary

Quality of Life

Side Effects Questionnaire

Medication Diary

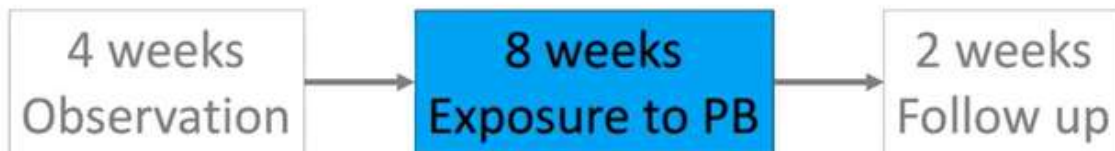
History

Brief interview

Es gibt ein Anfallstagebuch, um dessen Führung wir die Leute bitten werden. Wir werden die Lebensqualität messen und auf Nebenwirkungen achten. Es gibt ein Medikamenten-Tagebuch, in dem Sie dokumentieren, dass Sie die Medikamente verabreichen. Wir nehmen Anamnesen auf und fragen dann, wie es mit einigen offenen Fragen weitergeht. Sie kommen in der 10. Woche nach der Verabreichung der Medikamente für eine zweitägige Aufnahme zurück, wiederum mit Video-EEG.

Study Design

72



Week 10 (Begin taper of medication)

2 day admission

Video EEG

Labs (Blood Draw)

Scales: Quality of Life, Development, Ataxia, Sleep

Side Effects Questionnaire

Medication Diary

Video of Movements

Wir werden Labortests machen, wie wir es schon gemacht haben, und alle diese Skalen wiederholen. Und noch einmal schauen wir uns die Nebenwirkungen und die Medikamente an, und wir werden wieder Videos von den Bewegungen aufnehmen, um sie sowohl qualitativ zu verstehen als auch um zu dokumentieren, ob es eine subjektive Veränderung gegeben hat. In den Wochen 11 und 12, in denen die Medikamente immer noch genommen werden, wird es eine allmähliche Abschwächung geben.

Study Design

73



Week 11, 12 (Taper medication)

Weekly tele-health visits

Seizure diary

Quality of Life

Side Effects Questionnaire

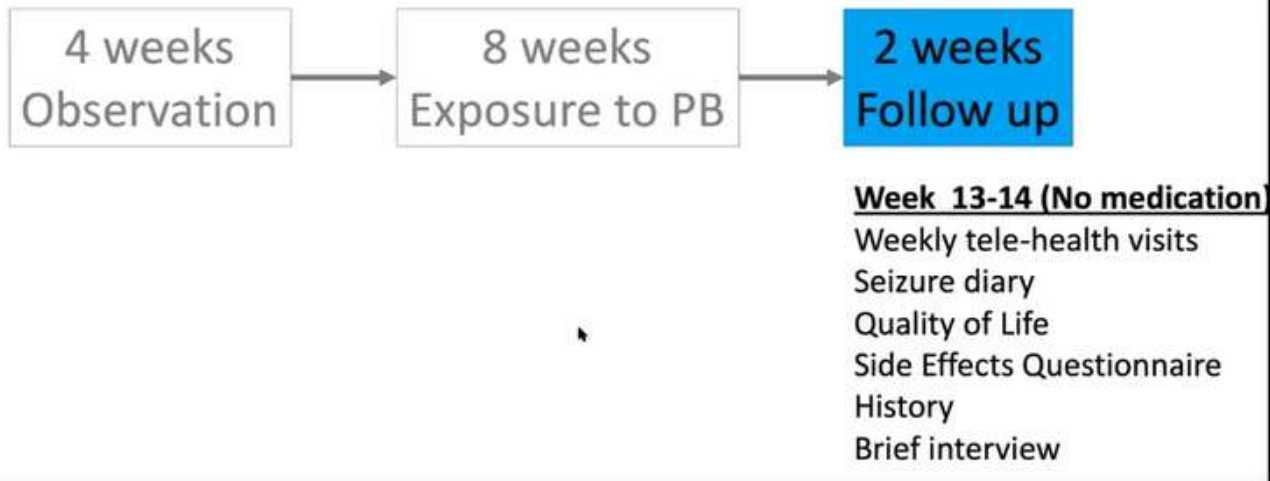
Medication Diary

History

Brief interview

Wir wollen sicherstellen, dass die Anfälle, wenn es eine Wirkung gibt, wenn sie unter Kontrolle gebracht werden, nicht mit Rücksicht zurückkommen. Und noch einmal, fahren Sie mit der Messung der Lebensqualität, der Nebenwirkungen usw. fort. Und schließlich werden die zwei Wochen der Nachsorge die wöchentlichen telemedizinischen Besuche sein.

Study Design



Wir sind nah dran. Ich sage das schon seit langem, und deshalb weiß ich nicht, ob mir noch jemand glaubt, aber lassen Sie mich einfach beschreiben, wie wir es geschafft haben, dass die FDA auf die Beantragung eines Zulassungsantrags für ein neues Medikament verzichtet hat. Sie sagten im Grunde genommen, dass Sie es in dem Bereich anwenden, den wir für okay hielten.

Progress

- FDA has waived need for Investigational New Drug Application
- Scientific Review OK
- Ethical Review – pending
- Contracting with Horizon Pharmaceuticals – pending IRB

- Goal – enroll 1st patient by end of calendar year 2020

Und deshalb brauchen Sie keine, Sie brauchen uns nicht, um irgendetwas zu unterschreiben. In Cornell ist der IRB-Prozess zweigeteilt. Zuerst haben Sie also eine wissenschaftliche Überprüfung. Tun Sie etwas, das gültig ist? Wir haben also unsere Zustimmung bekommen und Cornell hat gesagt, dass die Wissenschaft gut ist. Und alles, worauf wir warten, ist diese ethische Überprüfung. Und wieder gab es eine Handvoll kleiner Fragen, von denen wir überzeugt sind, dass wir sie beantwortet haben, und wir warten nur auf ihre Unterschrift. Horizon Pharmaceuticals, der Hersteller von Revicti, hat sich im Prinzip bereit erklärt, uns das Medikament kostenlos zur Verfügung zu stellen. Die Vertragsvergabe findet also jetzt statt. Sie wollen nur, dass das IRB genehmigt wird. Sobald das IRB genehmigt ist, werden sie also den Vertrag unterzeichnen und das Medikament liefern. Wir möchten den ersten Patienten bis zum Ende dieses Kalenderjahres aufnehmen. Obwohl wir uns bewusst sind, dass dies herausfordernde Zeiten sind. Ich kann dazu nichts sagen, aber mit den Mitteln, die wir erhalten haben, können wir die Reisekosten der Familien mitfinanzieren. Wir haben auch Mittel, um Familien hier in New York City unterzubringen, wo wir den Prozess durchführen, hier an der Upper East Side von New York, Manhattan. Und dann werden wir in der Lage sein, die telemedizinischen Besuche zu bezahlen. Den stationären EEG-Besuch. Wenn wir den Antrag gestellt hätten, wenn wir das im Voraus bezahlen wollten, hätte das die gesamte Förderung aufgefressen. Also werden wir das über die Versicherung machen. Und so könnten Familien am Ende für die Kosten für die Video-EEG-Aufnahme verantwortlich sein. Das sind die einzigen potenziellen Kosten, von denen wir annehmen, dass sie auf die Familien abgewälzt werden könnten. Und der Grund dafür ist, dass das Krankenhaus uns Tausende und Abertausende von Dollars für das EEG und die Aufnahme in Rechnung stellen wird, und dann das Budget einfach explodiert. Sobald wir die Genehmigung des IRB erhalten haben, werden wir uns an die Stiftung wenden.

Process for Recruitment

- Pending IRB
- Will reach out to STXBP1 Foundation and Ingo Helbig with recruitment information
- Enrollment form
- Meet via telemedicine for screening visit

Und dann hat Dr. Ingo Helbig eine große STXBP1-Praxis bei CHOP, und er ist dabei ein echter Partner gewesen. Und so hat er sich bereit erklärt, uns bei der Rekrutierung zu helfen. Es wird ein Anmeldeformular geben, und dann werden wir wahrscheinlich eine Art Screeningbesuch machen, entweder formell per Telemedizin oder einfach per Zoom, um sicherzustellen, dass jeder, der teilnimmt, die Kriterien erfüllt. Wenn es funktioniert, werden wir mit den Studien der Phase zwei fortfahren und uns nach anderen Finanzierungsmöglichkeiten umsehen.

What next?

- Phase II study(ies)
- How to fund?
 - Federal funding?
 - Neuronext
 - R01?
 - Pharma funding - Horizon

Die Bundesregierung verfügt über eine Reihe von Mechanismen. Ich habe gerade mit Adam Hartman darüber gesprochen, der Projektverantwortlicher für das Nationale Institut für Neurologische Krankheiten und Schlaganfall ist. Neuronext ist ein nationales Netzwerk von Standorten, die Studien durchführen, die speziell für Studien der Phase Zwei konzipiert sind. Das passt also gut zusammen. Und wenn wir es dann einfach selbst machen wollen, können wir eine RO1 schreiben, das ist der Standardmechanismus der Bundeszuschüsse zur Finanzierung. Und dann könnte auch Horizon Pharmaceuticals daran interessiert sein, dies zu finanzieren. Sie haben uns das Medikament für die Studie kostenlos zur Verfügung gestellt, aber wir haben sie noch nicht gefragt, ob sie eine größere Studie finanzieren wollen, denn wir wollen erst einmal sehen, wie diese Studie verläuft. Das ist es also, was ich zu sagen hatte. Ich danke Ihnen allen, dass Sie mir zugehört haben, und danke für die Einladung, heute mit Ihnen allen sprechen zu können.

Charlene:

Großartig. Ich danke Ihnen vielmals. Wir werden also direkt in die Fragen eintauchen, denn es sind viele Fragen über das Q und A hereingekommen. Also die erste Frage, und ich werde versuchen, Fragen zu kombinieren, die miteinander verbunden sind. Die erste Frage bezieht sich auf die Art der Mutation und der dominanten Verneinung. Aus dem Webinar mit Simon Searchlight vom vergangenen Samstag geht hervor, dass Patienten mit Missense-Mutationen dazu tendieren, mildere Phänotypen zu manifestieren als verstümmelte Mutationen. Wie lässt sich dies mit der Hypothese des dominanten Negativs vereinbaren, und eine damit zusammenhängende Frage lautete: Wie häufig werden Missense-Mutationen als ein dominant negativer Falltyp angesehen?

Jacqueline:

Lassen Sie mich vielleicht etwas dazu sagen, obwohl mein Sohn in einem Wutanfall steckt, deshalb entschuldige ich mich für das Weinen im Hintergrund. Was die Missense-Mutationen betrifft, so haben wir fünf getestet, und ich glaube, es gibt noch zwei oder drei weitere in der Literatur, und sie alle scheinen auf ein dominantes Negativ hinzuweisen. Offensichtlich können wir also nicht die volle Anzahl testen, aber sie waren über das ganze Protein verteilt, also kein bestimmter Bereich. Ich würde also sagen, dass es höchstwahrscheinlich mehr als diese acht sind. Wie viele wir sagen können. Und, entschuldigen Sie, ich habe die andere Frage vergessen.

Charlene:

Die andere Frage lautete: Wie kommen die... Das hier basierte also auf der Simons-Kohorte, und es gibt dort etwa 50 Patienten, über die Wendy gesprochen hat. Und wie - die Daten für diese Kohorte zeigen, dass Missense-Mutationen zu einem milderem Phänotyp neigen. Und wie verträgt sich das mit der dominanten negativen Hypothese?

Jacqueline:

Ja, ich habe Wendys Vortrag vom Samstag gehört, und ich glaube, sie hat gesagt, sie will es noch nicht rausbringen, weil die Patientenzahl so gering ist. Und wie Zach auch erwähnte, glaube ich, dass wir noch keine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation haben. Es ist also schwer zu sagen. Ich meine, ich weiß, dass es viele Patienten gibt, aber sie sind noch zu gering, um dort eine definitive Antwort zu geben. Also kann ich das leider nicht beantworten.

Charlene:

Nächste Frage. Und wieder gibt es eine Menge Fragen zu bestimmten Mutationstypen. Glauben Sie, dass das 4-Phenylbutyrat für Kinder mit Frameshift-Mutationen hilfreich sein wird?

Jacqueline:

Ich glaube schon. Wir sehen also eine positive Wirkung von 4-Phenylbutyrat auch auf den Wildtyp MUNC-18, STXBP1, in gewisser Weise. Und wenn Sie sich vorstellen, dass Ihre Kinder, die keine Missense-Mutationen haben, sondern einen anderen Typ, dann haben sie eine normale Kopie und eine, die nicht gut funktioniert. Wenn Sie mehr Protein von der normalen Kopie machen könnten, würde das wahrscheinlich auch die Funktion fördern. Aber wie gesagt, wir müssen dies noch genauer testen, und deshalb untersuchen wir diese Mausmodelle.

Charlene :

Nächste Frage: Spielt STXBP1 auch eine nicht-synaptische Rolle oder eine Rolle in der post-synaptischen Exozytose? Und was bedeutet das? Wenn das der Fall ist, wenn es sich um eine Genmutation handelt?

Jacqueline:

Noah, möchtest du das beantworten? Noah, ich weiß, dass du bereits schriftlich geantwortet hast, aber ich denke, es wäre gut, wenn die Leute es hören würden.

Noah:

Ja, ich meine, das ist nicht bekannt. Sicherlich ist es nicht etwas, das in der Literatur steht. Was ich sagen würde, ist, dass es eine interessante Richtung ist, die man sich anschauen sollte, weil STXBP1, wenn man es wie eine Klasse von Proteinen in einen Topf werfen würde, die eine bestimmte Funktion erfüllen, seine Rolle darin besteht, die Exozytose zu unterstützen, die etwas innerhalb der Zelle aufnimmt und es außerhalb der Zelle freisetzt. Und genau das tut es mit Neurotransmittern, die in diesen kleinen, so genannten synaptischen Vesikeln enthalten sind, die dann mit der Oberfläche der Nervenzelle verschmelzen. Und dann wird das Innere dieses zentralen Gefäßes nach außen freigesetzt. Aber die Exozytose ist nicht auf diesen Prozess beschränkt. Und sie wird für alles Mögliche verwendet, vom Aufbringen von Proteinen auf die Oberfläche der Zelle über das Wegwerfen von Zellmüll bis hin zu vielen anderen Prozessen, die, wie ich glaube, bereits im Frage-und-Antwort Text erwähnt wurden. Eine sehr gut untersuchte Art der Exozytose ist die Reaktion auf ein hohes Aktivitätsniveau, die Exozytose, die dann Neurotransmitter-Rezeptoren auf die postsynaptische Seite der Membran, also auf die andere Seite der Zelle, bringt. Und das, so die Idee, dient in gewisser Weise auf zellulärer Ebene, in einer Art und Weise, wie Erinnerungen gebildet werden. Ob STXBP1 an diesem Prozess beteiligt ist, ist absolut unbekannt. Ich denke, einige Leute würden aus den wenigen Papieren, die es gibt, sagen, dass STXBP1 nicht auf der

postsynaptischen Seite exprimiert wird. Ob das bedeutet, dass es sich nicht darauf auswirkt, ist eine andere Frage. Und auch, ob das am Ende genau stimmt oder nicht. Wir wissen es einfach nicht, aber es ist eine interessante Frage.

Charlene:

Nächste Frage. Stimmt es, dass STXBP1 gerade als Chaperon für Alpha-Synuclein nachgewiesen wurde? Und so wie ich es verstehe, wurde dieses Protein mit der Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht. Wenn das wahr ist, ist es dann möglich, dass Medikamente, die zur Behandlung von Parkinson eingesetzt werden, auch STX-Kindern helfen könnten?

Jacqueline:

Lassen Sie mich also versuchen, das ein wenig zu klären. Alpha-Synuclein ist also ein Protein, von dem bekannt ist, dass es bei der Parkinson-Krankheit verklumpt, und eine Gruppe aus Australien hat gezeigt, dass es mit STXBP1 Ko-Klumpen bilden kann, aber wahrscheinlich eine Menge Ko-Klumpen mit anderen Proteinen. Ich würde also nicht unbedingt sagen, dass dies spezifisch ist. Auch die Medikamente zur Behandlung der Parkinson-Krankheit zielen nicht auf diese Verklumpung von Alpha-Synuclein ab. Mit meiner sehr naiven Sichtweise würde ich also sagen, dass es keine Chance gibt, dass die Parkinson-Medikamente hier eine positive Wirkung haben.

Charlene:

Die nächste Frage lautet: Könnte die Aggregation der fehlgefalteten STXBP1-Proteine im Laufe der Zeit eine Regression bei STXBP1-Patienten verursachen? Und in Ihren Antworten könnte es hilfreich sein, zu definieren, was Sie unter Regression verstehen.

Jacqueline:

Was wir also eigentlich nicht wissen: Wenn STXBP1 verklumpt, bleiben diese Klumpen bestehen oder kann die Zelle sie loswerden? Wir wissen also nichts darüber, werden sie 10 Jahre lang im Gehirn Ihres Kindes bleiben? Werden sie 10 Tage lang da sein und die Zelle schafft es, sie loszuwerden? Und ich denke, wenn sie herumsitzen würden, könnte es genauso gut sein, dass sich die Dinge mit der Zeit verschlechtern. Es könnte sein, dass die Zelle eine Möglichkeit hat, die Dinge einfach vor Ort abzuladen und sie aus der Schusslinie zu halten. Und nichts würde passieren. Es könnte sein, wird so sein, dass diese Klumpen von der Zelle entfernt werden, weil sie diese erkennt, und es könnte nichts passieren. Es ist also wirklich schwer zu sagen. Um auf meinen Punkt zurückzukommen: Ich denke, die Untersuchung an einem Mausmodell wäre definitiv von Vorteil, um all diese Fragen zu klären.

Charlene:

Und noch eine Frage zu 4-Phenylbutyrat. Da es derzeit zur Behandlung von Harnstoffzyklus-Störungen eingesetzt wird, wie würde es sich also potenziell auf Patienten auswirken, die wegen einer STXBP1-Erkrankung in ihrem Harnstoffzyklus behandelt werden?

Zach:

Das kann ich übernehmen. Ich verstehe also, wie es bei diesen Patienten funktioniert, dass der Metabolit von 4-Phenylbutyrat bei der Reduzierung von Harnstoff und anderen toxischen Metaboliten im Blut hilft. Bei jemandem, der nicht an einer Harnstoffzyklusstörung leidet, geschieht dies also auf natürliche Weise. Und wenn der Harnstoffgehalt zu niedrig ist, ist das einfach kein Problem. Das beabsichtigte Ziel dieser Medikamente ist also nicht bei Menschen mit STXBP1 gestört. Es sollte ihm also nicht schaden, und man kann nicht zu weit in die andere Richtung gehen. Abgesehen davon werden wir in der Studie mit einigen der routinemäßigen Blutuntersuchungen, die wir durchführen werden, darauf achten.

Charlene:

Okay. Und ich denke, wir haben Zeit für eine letzte Frage. Es geht also um die computergestützte Vorfürung. Haben Sie das Computer-Screening nur auf der Wildtyp-Struktur durchgeführt, und gibt es andere Proteine - nicht STXBP1 - die ebenfalls von diesen Verbindungen angegriffen werden könnten?

Jacqueline:

Debbie, Sie wollen das sicher beantworten.

Debbie:

Ja, also wurde das computergestützte Screening mit dem Wildtyp-Protein durchgeführt. Wir haben kein gutes Rechenmodell dafür, ob die Mutationen die Struktur verändern würden, wie sie sie verändern würden. Und könnten die Verbindungen andere Proteine beeinflussen? Ja, das könnten sie. Wir hoffen, dass sie es nicht sind, insbesondere die Proteine 9, 10 und 13, von denen wir gezeigt haben, dass sie sich spezifisch binden. Und die Idee wäre, dass wir sie in einer niedrigen Konzentration verwenden würden. Wenn sie also STXBP1 binden, hätten sie eine Affinität dafür, aber es ist möglich, dass sie auch andere Proteine binden könnten. Ja.

Charlene:

Na, wunderbar. Nun, ich danke Ihnen allen für eine informationsreiche Sitzung. Das war wirklich ausgezeichnet. Vielen Dank an alle, die an der heutigen Präsentation teilgenommen haben. Wir werden die Aufzeichnung mit Bildunterschriften für das heutige Webinar in den nächsten Tagen auf unserer Website veröffentlichen. Unsere nächste Sitzung ist am Dienstag, den 29. September um 12:00 Uhr Ostern mit Mingshan Xue vom Baylor College of Medicine, der darüber referiert, wie verschiedene Neuronen im Gehirn zur STXBP1-Enzephalopathie beitragen. Melden Sie sich für dieses Webinar auf unserer Website unter [STXBP1disorders.org/webinar-series](https://stxbp1disorders.org/webinar-series) an. Und verpassen Sie nicht unsere bevorstehenden Aktivitäten im Bewusstseinsmonat, einschließlich der vierten jährlichen Veranstaltung Move to Cure, die am 26. September beginnt. Vielen Dank an alle.