

Investigating Poly(styrene)- b-Poly(ethylene Oxide) Polymersomes for the Treatment and Diagnosis of Hyperammonemia

Doctoral Thesis

Author(s):

Matoori, Simon Sam

Publication date:

2019-03-03

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000328703>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Funding acknowledgement:

166697 - Treating hyperammonemia with orally administered polymersomes (SNF)

DISS. ETH Nr. 25671

Investigating poly(styrene)-*b*-poly(ethylene oxide)
polymersomes for the treatment and diagnosis of
hyperammonemia

Abhandlung zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER WISSENSCHAFTEN der ETH ZÜRICH
(Dr. sc. ETH Zürich)

vorgelegt von

Simon Sam Matoori

Master of Science ETH in Pharmaceutical Sciences, Master of Science ETH in
Medicinal and Industrial Pharmaceutical Sciences, ETH Zürich

geboren am 30.11.1988

von

Zürich (ZH), Schweiz

Referent: Prof. Dr. Jean-Christophe Leroux
Korreferent: Prof. Dr. Peter Walde

Summary

Ammonia is a ubiquitous metabolite in amino acid and protein metabolism. Despite its important roles in metabolism and pH homeostasis, ammonia needs to be rapidly and efficiently detoxified to avoid an accumulation in the brain where it is associated with neurotoxic effects. The main ammonia removal mechanism in the body is the urea cycle in the liver. In case of inborn or acquired liver disease, the ammonia detoxification capacity of the liver can be insufficient such that ammonia accumulates in the blood (hyperammonemia) and subsequently in the brain. In consequence, patients exhibit low grade to serious neuropsychiatric symptoms. This complication is highly prevalent in patients with liver cirrhosis (hepatic encephalopathy, HE).

As systemic ammonia mainly originates from the bacterial urease activity in the intestine, sequestering gut ammonia is a promising strategy for the chronic treatment of HE. The most widely used treatments for this indication, the laxative lactulose and the antibiotic rifaximin, both target the production of colonic ammonia. However, they fail to provide a sufficient therapeutic benefit to a large number of HE patients and can be associated with unpleasant adverse reactions (*e.g.*, persistent diarrhea). Novel oral treatments with high ammonia extraction capacity are therefore needed.

Furthermore, the current methods to determine ammonia in biologic matrices, namely plasma, have important shortcomings (*e.g.*, interferences, narrow linear range, low-throughput). As ammonia levels correlate with neuropsychiatric symptom severity, are indicative of clinical outcome and the risk of recurrence, and used to assess treatment response, ammonia assays are of great clinical relevance.

In the light of these challenges in the treatment and diagnosis of hyperammonemia, this thesis aims to develop a novel ammonia-lowering treatment and ammonia assay, both based on polymeric vesicles (polymersomes).

In chapter 1, an introduction to polymeric vesicles is provided. Preparation and drug-loading methods of polymersomes are described and compared to liposomal systems. The reported applications of polymersomes *in vivo* are critically discussed with regard to their potential therapeutic value and their proposed advantages over liposomes. The main objectives of this thesis, the development of polymersome-based systems for the oral treatment and diagnostics of hyperammonemia, are subsequently laid out.

Chapter 2 reviews hyperammonemia-related disorders and hyperammonemia-lowering drugs. Hyperammonemia relates to the accumulation of ammonia in the blood due to the reduced capacity of the liver to metabolize this neurotoxic metabolite. This symptom can be associated with inborn (urea cycle disorders) or acquired (liver cirrhosis, HE) liver disease. Established and investigative treatments reducing ammonia generation and/or increasing ammonia removal are described in this chapter and critically discussed.

Chapter 3 proposes the use of orally applied transmembrane pH-gradient polymersomes to sequester ammonia in the colon and thus lower systemic ammonia levels. We identified polymeric vesicles made of poly(styrene)-*b*-poly(ethylene oxide) which efficiently captured ammonia in bile salt-containing simulated gastrointestinal fluids. However, a subsequent *in vivo* study in hyperammonemic rats did not

show an effect of the polymersomes on plasma ammonia levels. This finding was explained by the limited stability of the polymersomes in colon-simulating environments.

Chapter 4 proposes how the ammonia concentration in biological fluids can be quantified by pH-sensitive transmembrane pH-gradient polymersomes. HPTS, a dye with pH-dependent and isosbestic fluorescence properties, was encapsulated in the core of poly(styrene)-*b*-poly(ethylene oxide) polymersomes. Coincubating these polymersomes with ammonia-containing solutions led to changes in the fluorescence spectrum of HPTS, which allowed the quantification of ammonia in a pathophysiologically relevant range. Finally, the ammonia concentration of the plasma of healthy and hyperammonemic rats was determined by the polymersome assay and the most widely used commercial ammonia tests.

Chapter 5 reviews the scientific contributions of this thesis in terms of finding relevant biomedical applications of polymersomes in hyperammonemia-lowering treatments and ammonia diagnostics, and proposes future experiments to elucidate the destabilization of polymersomes in colon-simulating environments and to develop the polymersome-based ammonia assay further.

Zusammenfassung

Ammoniak ist ein essenzieller Metabolit im Aminosäuren- und Proteinmetabolismus. Trotz seiner wichtigen Rolle im Metabolismus und der pH Homöostase muss Ammoniak möglich schnell und effizient detoxifiziert werden, um eine Akkumulierung im Gehirn zu verhindern, wo es mit neurotoxischen Effekten assoziiert wird. Der Hauptmechanismus des Körpers zur Ammoniakentfernung ist der Harnstoffzyklus in der Leber. Im Falle von angeborenen oder erworbenen Lebererkrankungen kann die Ammoniakentfernungskapazität der Leber ungenügend sein, sodass Ammoniak im Blut (Hyperammonämie) und darauffolgend im Gehirn akkumuliert. Als Folge davon zeigen Patienten subklinische bis klinisch offenkundige neuropsychiatrische Symptome. Diese Komplikation ist sehr verbreitet in Patienten mit Leberzirrhose (hepatische Enzephalopathie, HE).

Da das systemische Ammoniak hauptsächlich durch ureaseproduzierende Bakterien im Darm generiert wird, ist die Bindung von Ammoniak in situ eine vielversprechende Strategie für die Behandlung der chronischen HE. Die von den aktuellen Leitlinien empfohlenen Behandlungen für diese Indikation, das Laxans Lactulose und das Antibiotikum Rifaximin, zielen auf die Ammoniakproduktion im Darm ab, entfalten aber bei vielen Patienten nur ungenügende Wirkung und können zu Nebenwirkungen (z. B. Durchfall) führen. Neue orale Behandlungen mit hoher Extraktionskapazität werden deshalb benötigt.

Des Weiteren haben die vorhandenen Methoden zur Bestimmung des Ammoniakgehalts in biologischen Proben, besonders im Plasma, gravierende Nachteile (z. B. Interferenzen, ein beschränkter linearer Bereich, eine tiefe Anzahl messbarer Proben pro Zeiteinheit). Zumal Ammoniakspiegel mit der Schwere der neuropsychiatrischen Symptomatik korrelieren, prognostisch bezüglich klinischen Folgen und der Rückfallwahrscheinlichkeit und zur Evaluation des Ansprechens auf Medikamente benötigt werden, sind Ammoniakmessungen von grosser Bedeutung in der Klinik.

Im Angesicht dieser Herausforderungen bei der Behandlung und Diagnose der Hyperammonämie zielt diese Dissertation auf die Entwicklung neuer ammoniaksenkender Therapien und Diagnostika ab.

Das erste Kapitel bietet eine Einführung in Polymersomen. Herstellungsmethoden und Verfahren zur Beladung der Polymersomen mit therapeutischen Substanzen werden beschrieben und mit Liposomen verglichen. Die in der Literatur beschriebenen Anwendungen von Polymersomen in vivo werden daraufhin mit Blick auf mögliche Vorteile gegenüber Liposomen kritisch diskutiert. Eine potenzielle neue Anwendung der Polymersomen in der Hyperammonämie wird schliesslich vorgeschlagen und die Hauptziele der Dissertation werden dargelegt.

Das zweite Kapitel bietet einen Überblick über hyperammonämieverbundene Erkrankungen und hyperammonämiesenkende Medikamente. Hyperammonämie bezeichnet die Akkumulierung von Ammoniak im Blut aufgrund einer reduzierten Kapazität der Leber, diesen neurotoxischen Metaboliten zu entgiften. Das Symptom kann mit angeborenen (Harnstoffzyklusstörungen) oder erworbenen (Leberzirrhose, HE) Lebererkrankungen assoziiert sein. Etablierte und sich in der Forschung befindende Behandlungen, welche die Ammoniakgenerierung vermindern oder die Ammoniakentfernung erhöhen, werden in diesem Kapitel kritisch besprochen.

Das dritte Kapitel untersucht die perorale Anwendung von Polymersomen mit transmembranärem pH Gradienten zur Ammoniakbindung im Colon vor, womit die Ammoniakspiegel im Plasma erniedrigt werden sollen. In der Literatur wurden Liposomen mit pH Gradienten über der Membran beschrieben, welche Ammoniak sequestrierten und die Ammoniakspiegel im Plasma hyperammonämischer Ratten senkten. In dieser Dissertation wurden PS-*b*-PEO Polymersomen identifiziert, welche Ammoniak in gallensaltzhaltigen Lösungen, welche den Gastrointestinaltrakt simulieren, effizient aufnehmen. Eine darauffolgende in vivo Studie in hyperammonämischen Ratten zeigte jedoch keine Effekte der Polymersomen auf die Ammoniakplasmaspiegel. Diese Erkenntnis wurde durch die limitierte Stabilität der Polymersomen in colonsimulierenden Umgebungen mit tiefem Wassergehalt erklärt.

Das vierte Kapitel präsentiert eine Methode, mit welcher Ammoniakkonzentrationen in biologischen Flüssigkeiten mit Polymersomen mit transmembranärem pH-Gradienten quantifiziert werden können. Pyranine (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate, HPTS), ein Farbstoff mit pH-abhängigen und pH-unabhängigen Fluoreszenzeigenschaften, wurde in die innere Phase von PS-*b*-PEO Polymersomen eingekapselt. Werden diese Polymersomen einer ammoniakenthaltenden Lösung beigegeben, ändert sich das Fluoreszenzspektrum des Farbstoffs, sodass eine Quantifizierung des Ammoniakgehalts möglich wird. Mit einer Ammoniakstandardkurve in einer gepufferten Lösung konnte die Ammoniakkonzentration in Plasma, der gebräuchlichsten Matrix für Ammoniakmessungen im Spital, von gesunden und hyperammonämischen Ratten bestimmt werden.

Das fünfte Kapitel fasst die wissenschaftlichen Erkenntnisse der Dissertation, welche die biomedizinische Anwendung von Polymersomen in der Senkung und Quantifizierung von Ammoniakspiegeln betreffen, zusammen. Im Übrigen werden zukünftige Experimente vorgeschlagen, um die Destabilisierung von Polymersomen in wasserarmen Milieus zu untersuchen und um die polymersomenbasierte Ammoniakmessmethode weiterzuentwickeln.