

DISS. ETH NO. 29311

Urease inhibitors in the treatment of hepatic encephalopathy

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Diana Evstafeva

Specialist in Bioengineering and Bioinformatics
Lomonosov Moscow State University

born on 15.11.1994

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Jean-Christophe Leroux, doctoral thesis supervisor
Prof. Dr. Stefanie D. Krämer, co-examiner

2023

Summary

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric disturbance arising from liver insufficiency and/or portosystemic shunting. Manifestations of HE expand from minor cognitive deficits to more severe states, such as brain edema and coma, and are largely dictated by the severity of liver disease and comorbidities. Although the pathogenesis of HE is multifactorial and not yet fully understood, systemic ammonemia is believed to be a key factor contributing to brain dysfunction. Indeed, in liver disease, an impaired urea cycle, the main ammonia detoxifying pathway, might lead to the accumulation of ammonia in the systemic circulation, namely hyperammonemia. As a neurotoxic compound, ammonia is rapidly metabolized by astrocytes *via* the synthesis of glutamine (Gln) in the brain. However, excessive ammonemia might result in cerebral Gln accumulation causing astrocyte swelling, and altered neuronal communication and function. Moreover, cerebral ammonia is associated with oxidative stress, disturbed neurotransmission and energy metabolism. Therefore, existing therapeutic approaches intend to mitigate systemic hyperammonemia by modulating ammonia production, absorption or elimination. Their utilization, however, is hindered by unfavorable adverse effects, limited efficacy and high costs emphasizing the need for novel therapeutic options.

Urease-producing bacteria are one of the main contributors to systemic ammonia. Indeed, nearly a quarter of urea produced by the liver is broken down to ammonia and carbon dioxide by bacterial ureases in the gut rendering inhibition of bacterial ureases a promising strategy for the treatment of HE. Hydroxamic acids (HAs) are, to the best of our knowledge, the only class of urease inhibitors that have been investigated for this indication about 50 years ago. However, despite promising clinical data, further development of HAs was impeded supposedly by moderate efficacy and/or potential toxicity. Inspired by the earlier research, in this thesis, we aimed at identifying a potent hydroxamate-derivatized urease inhibitor and applying colon-specific formulations for its delivery. The latter approach could, on the one side, augment the inhibitor's efficacy by increasing its concentrations in the colon and, on the other side, minimize systemic exposure and potential toxicity.

Chapter 1 provides a general overview of HE and discusses the complex interplay of factors involved in its pathogenesis. Furthermore, conventional and emerging treatment approaches as well as their limitations are presented.

The role of bacterial ureases and their implication as a therapeutic target in HE are discussed in **Chapter 2**. Moreover, advances in the utilization of urease inhibitors for HE with a focus on HAs are summarized.

In **Chapter 3**, the design and screening of hydroxamate-based urease inhibitors are presented. Applying prior knowledge of the structure-activity relationships in HAs, a series of saturated and unsaturated aliphatic HAs was synthesized and analyzed in terms of their anti-ureolytic activity under conditions simulating the GI environment. A urease inhibitor, 2-octynohydroxamic acid (2-octynoHA), was found to exhibit *in vitro* activity surpassing that of acetohydroxamic acid (AHA) and octanohydroxamic acid (OHA), compounds that were previously investigated in clinical studies for HE. Further characterization of 2-octynoHA demonstrated that it was not cytotoxic nor mutagenic within the micromolar range. However, the stability assessment of 2-octynoHA in simulated intestinal fluids revealed its cyclization to inactive and highly permeable 5-pentylisoxazol-3-ol, yet this process could be slowed down by mild acidification.

Chapter 4 explores the *in vivo* efficacy and pharmacokinetics (PK) of 2-octynoHA. In order to deliver 2-octynoHA to the site of action and minimize its absorption, prototype colon-specific formulations of 2-octynoHA suitable for dog and rat models were prepared. PK studies in dogs revealed 2-octynoHA's low bioavailability following oral administration in an uncoated gelatin capsule, which might be attributed to its chemical transformation. Moreover, reduced systemic exposure to 2-octynoHA was achieved following the administration of enteric-coated capsules. Furthermore, *in vivo* efficacy of 2-octynoHA was assessed in rat models of acute and chronic liver diseases. Oral administration of 2-octynoHA solution reduced ammonemia in both models, yet under the tested dosing protocol, the effect could not be sustained likely due to the progression of liver disease. Moreover, reduced brain Gln was observed in rats with chronic liver disease treated with the 2-octynoHA solution. Interestingly, two other formulations, suspension and enteric-coated capsule, demonstrated insufficient efficacy in terms of lowering ammonemia,

which might be related to the poor aqueous solubility of 2-octynoHA supporting the need for developing an improved oral formulation.

Chapter 5 discusses the main findings and limitations of this thesis and suggests future research directions concerning the optimization of 2-octynoHA formulation and assessment of its *in vivo* efficacy and safety.

Zusammenfassung

Hepatische Enzephalopathie (HE) ist eine neuropsychiatrische Störung, die durch Leberinsuffizienz und/oder einen portosystemischen Shunt entsteht. Manifestationen von HE reichen von geringfügigen kognitiven Defiziten bis hin zu schwerwiegenderen Symptomen wie Hirnödemen und Koma und werden weitgehend von der Schwere der Lebererkrankung und Komorbiditäten bestimmt. Obwohl die Pathogenese von HE multifaktoriell ist und noch nicht vollständig verstanden wird, wird angenommen, dass die systemische Ammoniakämie ein Schlüsselfaktor ist, der zu einer Funktionsstörung des Gehirns beiträgt. Tatsächlich könnte bei Lebererkrankungen ein gestörter Harnstoffzyklus, der Hauptweg der Ammoniakentgiftung, zu einer Akkumulation von Ammoniak im systemischen Kreislauf führen, nämlich zu einer Hyperammonämie. Als neurotoxische Verbindung wird Ammoniak schnell von Astrozyten über die Synthese von Glutamin (Gln) im Gehirn metabolisiert. Eine übermäßige Ammoniakämie kann jedoch zu einer zerebralen Gln-Ansammlung führen, die eine Astrozytenschwellung, eine veränderte neuronale Kommunikation und Funktion verursacht. Darüber hinaus wird zerebrales Ammoniak mit oxidativem Stress, gestörter Neurotransmission und Energiestoffwechsel in Verbindung gebracht. Daher zielen bestehende therapeutische Ansätze darauf ab, die systemische Hyperammonämie durch Modulation der Ammoniakproduktion, -absorption oder -ausscheidung zu mildern. Ihre Nutzung wird jedoch durch ungünstige Nebenwirkungen, begrenzte Wirksamkeit und hohe Kosten behindert, was die Notwendigkeit neuer therapeutischer Optionen unterstreicht.

Urease-produzierende Bakterien sind einer der Hauptverursacher von systemischem Ammoniak. Tatsächlich wird fast ein Viertel des von der Leber produzierten Harnstoffs durch bakterielle Ureasen im Darm zu Ammoniak und Kohlendioxid abgebaut, was die Hemmung bakterieller Ureasen zu einer vielversprechenden Strategie für die Behandlung von HE macht. Hydroxamsäuren (HAs) sind unseres Wissens nach die einzige Klasse von Urease-Inhibitoren, die vor etwa 50 Jahren für diese Indikation untersucht wurden. Trotz vielversprechender klinischer Daten wurde die Weiterentwicklung von HAs jedoch angeblich durch mäßige Wirksamkeit und/oder potenzielle Toxizität behindert. Inspiriert von der früheren Forschung zielten wir in dieser Dissertation darauf ab, einen wirksamen

Hydroxamat-derivatisierten Urease-Inhibitor zu identifizieren und Dickdarm-spezifische Formulierungen für seine Verabreichung anzuwenden. Der letztere Ansatz könnte einerseits die Wirksamkeit des Inhibitors durch Erhöhung seiner Konzentrationen im Dickdarm steigern und andererseits die systemische Exposition und potenzielle Toxizität minimieren.

Kapitel 1 gibt einen allgemeinen Überblick über HE und diskutiert das komplexe Zusammenspiel von Faktoren, die an seiner Pathogenese beteiligt sind. Darüber hinaus werden konventionelle und neue Behandlungsansätze sowie deren Grenzen vorgestellt.

Die Rolle bakterieller Ureasen und ihre Bedeutung als therapeutisches Ziel bei HE werden in **Kapitel 2** diskutiert. Darüber hinaus werden Fortschritte bei der Verwendung von Urease-Inhibitoren für HE mit Schwerpunkt auf HAs zusammengefasst.

In **Kapitel 3** werden Design und Screening von Hydroxamat-basierten Urease-Inhibitoren vorgestellt. Basierend auf den gut untersuchten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von HAs wurde eine Reihe von gesättigten und ungesättigten aliphatischen HAs synthetisiert und hinsichtlich ihrer anti-ureolytischen Aktivität unter Bedingungen analysiert, die die GI-Umgebung simulieren. Es wurde festgestellt, dass ein Urease-Inhibitor, 2-Octynohydroxamsäure (2-OctynoHA), eine In-vitro-Aktivität aufweist, die die von Acetohydroxamsäure (AHA) und Octanohydroxamsäure (OHA) übertrifft. Sowohl AHA und OHA sind Verbindungen, die zuvor in klinischen Studien für HE untersucht wurden. Die weitere Charakterisierung von 2-octynoHA zeigte, dass es im mikromolaren Bereich weder zytotoxisch noch mutagen war. Die Stabilitätsbewertung von 2-octynoHA in simulierten Darmflüssigkeiten zeigte jedoch seine Zyklisierung zu inaktivem und hochpermeablem 5-Pentylisoxazol-3-ol, doch dieser Prozess konnte durch leichte Ansäuerung verlangsamt werden.

Kapitel 4 untersucht die In-vivo-Wirksamkeit und Pharmakokinetik von 2-OctynoHA. Um 2-OctynoHA an den Wirkort zu bringen und seine Absorption zu minimieren, wurden Prototypen von Dickdarm-spezifischen Formulierungen von 2-OctynoHA hergestellt, die für Hunde- und Rattenmodelle geeignet sind. Pharmakokinetische Studien an Hunden zeigten die geringe Bioverfügbarkeit von 2-OctynoHA nach oraler Verabreichung in einer unbeschichteten Gelatine kapsel, was auf seine chemische Umwandlung zurückzuführen

sein könnte. Darüber hinaus wurde nach der Verabreichung einer magensaftresistenten Kapsel eine reduzierte systemische Exposition gegenüber 2-OctynoHA erreicht. Darüber hinaus wurde die In-vivo-Wirksamkeit von 2-OctynoHA in Rattenmodellen für akute und chronische Lebererkrankungen untersucht. Die orale Verabreichung von 2-octynoHA-Lösung reduzierte die Ammoniakämie in beiden Modellen, jedoch konnte die Wirkung unter dem getesteten Dosierungsprotokoll wahrscheinlich aufgrund des Fortschreitens der Lebererkrankung nicht aufrechterhalten werden. Darüber hinaus wurde bei Ratten mit chronischer Lebererkrankung, die mit der 2-OctynoHA-Lösung behandelt wurden, ein verringertes Gln Konzentration im Gehirn beobachtet. Interessanterweise zeigten zwei andere Formulierungen, Suspension und Dickdarmkapsel, eine unzureichende Wirksamkeit in Bezug auf die Senkung der Ammonämie, was mit der schlechten Wasserlöslichkeit von 2-OctynoHA zusammenhängen könnte, was die Notwendigkeit der Entwicklung einer verbesserten oralen Formulierung unterstützt.

Interessanterweise zeigten zwei andere Formulierungen, Suspension und magensaftresistente Kapsel, eine unzureichende Wirksamkeit in Bezug auf die Senkung der Ammonämie, was mit der schlechten Wasserlöslichkeit von 2-OctynoHA zusammenhängen könnte, was die Notwendigkeit der Entwicklung einer verbesserten oralen Formulierung unterstützt.

Kapitel 5 diskutiert die wichtigsten Ergebnisse und Einschränkungen dieser Arbeit und schlägt zukünftige Forschungsrichtungen hinsichtlich der Optimierung der 2-octynoHA-Formulierung und der Bewertung ihrer In-vivo-Wirksamkeit und Sicherheit vor.