

DISS. ETH NO. 26846

# **Inositol Phosphate Analogs for the Inhibition of Vascular Calcification**

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

presented by

**Antonia Elisabeth SCHANTL**

Master of Science ETH in Pharmaceutical Sciences, ETH Zurich

born on December 15<sup>th</sup>, 1991

citizen of Austria

accepted on the recommendation of  
Prof. Jean-Christophe Leroux, examiner  
Prof. Roger Schibli, co-examiner

2020

## Summary

Soft tissue calcification is the pathological deposition of calcium phosphate mineral at sites in the body where it normally would not. The most frequent type is vascular calcification (VC), where mineral deposits, often hydroxyapatite, emerge at cardiovascular sites such as aortic vessels and valves or the heart. VC has been considered an active process driven in part by vascular smooth muscle cells (VSMCs), that have lost their phenotype and transdifferentiated into a bone-type cell capable of excreting mineral laden extracellular vesicles. Calcification of these tissues greatly impedes their physiological function and hemodynamics. Ultimately, this increases the risk of affected individuals for cardiovascular events and mortality. The diagnosis of VC through medical imaging procedures is well established, but a pharmacological remedy indicated for the treatment or prevention for VC is lacking. This work aimed at identifying an inhibitor of VC, and evaluating it in preclinical tests.

The largest patient cohorts with the highest risk to develop VC include chronic kidney disease and diabetic patients, where declining renal function and other complications can lead to a systemic disorder of the mineral and bone metabolism. The initiation of hemodialysis is accompanied by an upsurge in the incidence of VC, and in chronic kidney disease patients cardiovascular events are the leading cause of death. One recently identified target for VC are circulating colloidal calciprotein particles (CPPs). They consist of calcium phosphate associated with serum proteins, such as fetuin-A. In humans, blood calcium and phosphate levels are close to supersaturation causing metastability and an inherent risk of calcification. CPPs mediate the transport and clearance of excess mineral from the circulation. In a diseased person, this protective system may become overwhelmed and calcification emerges.

Chapter 1 provides an introduction to *myo*-inositol hexakisphosphate (IP6), a known inhibitor of VC with clinical evidence of activity, but with limited plasma stability. This molecule presents the starting-point of this research and served as benchmark. At the end of Chapter 1, the main research hypothesis is described and the objectives of this thesis are outlined. Herein, it was aimed to develop IP6 derivatives with improved plasma stability that can stabilize CPPs in order to prevent their growth, and to ultimately improve clinical outcome in VC patients. To this end, a compound series

was designed consisting of inositol phosphate analogs where phosphates (P) were substituted for sulfates (S) or oligo(ethylene glycol) (OEG) polymers. These included molecules of the type OEG-IP5, OEG<sub>2</sub>-IP4, OEG<sub>3</sub>-IP3 and OEG-IP2S3. Functionalization with OEG ought to increase the low plasma stability of inositol phosphates and prevent mineral accretion via steric hindrance.

Chapter 2, starts with the clinical aspects of different types of VC. The main part focuses on current investigational pharmacological therapies in clinical development for VC and their mode of action. This chapter concludes that a universal calcification inhibitor which acts cause-independent on the final step of calcification, i.e. mineral nucleation and growth, would be most beneficial for VC patients.

The identification, as well as the *in vitro* and *in vivo* characterization of 4,6-di-O-(methoxy-diethyleneglycol)-*myo*-inositol-1,2,3,5-tetrakis(phosphate), abbreviated as (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4, the most potent IP6 derivative, is described in Chapter 3. First, in order to rank the screened compounds for activity an assay that was based on a serum calcification propensity test, initially produced for clinical risk assessment, was implemented. All of the IP6 derivatives tested were more potent than IP6, with (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4 being ~7-fold more active. The *in vitro* stability was first investigated in presence of 3-phytase, an IP6-degrading enzyme. Number, but not length, of OEG-chains had an impact in reducing the molecules' susceptibility to enzymatic degradation. When pre-incubating compounds in enzymatic active human serum, the OEGylated compounds did not lose activity in the serum calcification propensity assay. Subsequently, (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4 was tested in VSMC calcification assays and compared to IP6. Therein, (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4 rescued cells from CPP- and high calcium and phosphate-medium induced VSMC calcification. The effect was dose-dependent and stronger compared to IP6. After intravenous dosing of 10 mg/kg of compound, the plasma half-life increased almost 10-fold compared to IP6 (78 vs. 8 min), and the area under the plasma concentration vs. time curve increased ~7-fold. Following subcutaneous injection, pharmacokinetic profiles were comparable between a dose of 10 mg/kg (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4 and one of 100 mg/kg IP6. In a collaborative work, (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4 was investigated in a rat model of VC. Twice-daily subcutaneous administration of 30 mg/kg of compound for 12 days reduced the calcium load in carotid arteries and kidneys compared to vehicle control. (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4 also improved renal function in this rat model.

Given the chronic nature of VC, a sustained-release injection allowing a reduced dosing frequency would be beneficial to many patients. Chapter 4 briefly reviews modalities for the sustained-release of hydrophilic molecules, and recounts three strategies that were investigated for the development of a slow release formulation of (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4 suitable for subcutaneous injection. First, the formation of polyelectrolyte complexes with the positively charged protein protamine was tested. (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4 did not complex and retard protamine migration in a gel electrophoresis assay at any of the tested molar ratios. Second, the attempt at developing an insoluble salt proved challenging, and preliminary efforts did not produce a well-defined hydrophobic salt of (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4 with reduced water solubility. Third, research on (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4-loaded spherulites, a form of multilamellar vesicles was initiated. Preliminary data indicate that such vesicles can be obtained in the presence of this IP6 derivative.

Chapter 5 recapitulates the major findings of the thesis and gives a general discussion and a final conclusion.

The work presented in this doctoral thesis provides pre-clinical evidence for the efficacy of (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4 in soft-tissue calcification and suggests its further clinical development. It also describes potential strategies to retard the molecule's release after subcutaneous application.

## Zusammenfassung

Als vaskuläre Verkalkung wird die pathologische Ablagerung von Calciumphosphat im Körper bezeichnet, sie steht im Gegensatz zur physiologischen Knochen- oder Zahnbildung. Verkalkungen können insbesondere in arteriellen Blutgefässen, im Herzen und in den Herzklappen auftreten, seltener bei Erbkrankheiten, bei denen sie meistens besonders schwere Verläufe annehmen. Die vaskuläre Ablagerung von Mineralien gilt allgemein als ein aktiver Prozess, der durch glatte Muskelzellen mit phänotypischen Veränderungen in der mittleren Gefässschicht vorangetrieben wird. Krankhaft veränderte Zellen sondern mit Hydroxylapatit geladene Extrazellulärevesikel in ihre Umgebung ab. Dadurch werden die kardiovaskulären Organe in ihrer physiologischen Funktion eingeschränkt und die Hämodynamik beeinträchtigt, was bei den Betroffenen schliesslich zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Morbidität führt.

Die Patientenkohorte mit dem grössten Risiko, an einer vaskulären Verkalkung zu erkranken, sind chronisch Nierenkranke und Diabetiker, bei denen es durch eine eingeschränkte Nierenfunktion zu einer Störung im Knochen- und Mineralhaushalt kommen kann. Das Risiko steigt insbesondere nach Initiierung der Hämodialyse, und die Haupttodesursache bei chronischer Niereninsuffizienz sind kardiovaskuläre Erkrankungen.

Während die Diagnosemöglichkeiten der vaskulären Verkalkung bereits etabliert sind, fehlt es noch an zugelassenen Arzneimitteln für die Vorbeugung oder Behandlung. Das Ziel dieser Arbeit ist es, einen Inhibitor der vaskulären Verkalkung zu entwickeln und zu charakterisieren. Ein erst kürzlich etablierter Angriffspunkt für mögliche Therapien stellen Calciumphosphat-Protein Partikel dar, sogenannte «CPPs». Diese bestehen aus Calciumphosphat und Serumproteinen, wie zum Beispiel Fetuin-A. Die Serumspiegel von Kalzium und Phosphat sind beim Menschen metastabil, was ein intrinsisch erhöhtes Risiko für Verkalkungen birgt. Über CPPs geschehen der Transport und die Ausscheidung von überschüssigem Kalziumphosphat aus dem Blutkreislauf. Gerät dieser Prozess in ein Ungleichgewicht, so kommt es zu einer Ansammlung von Kalziumphosphat in den Gefässen.

Kapitel 1 dieser Arbeit bietet eine umfangreiche Zusammenfassung über die Phytinsäure (IP6), einem Hexaphosphorsäureester des *myo*-Inosits. Dieses Molekül ist ein starker Chelator für Kalzium und ein bekannter, in klinischen Studien erprobter, Inhibitor der vaskulären Verkalkung. Die Plasmahalbwertszeit von IP6 ist jedoch relativ kurz, da es nach Applikation schnell metabolisiert wird. Es stellt die Ausgangssubstanz dieser Forschungsarbeit dar, die sich zum Ziel gesetzt hat, stabilere und potentere Derivate von IP6 zu entwickeln und in präklinischen Studien zu untersuchen. Die primäre Hypothese ist, dass durch eine stufenweise Veränderung von IP6 durch Substitution von Phosphatgruppen (P) durch Sulfatgruppen (S) oder Oligoethylenglycol (OEG) Polymerketten Derivate entstehen können, die eine verlängerte Plasmahalbwertszeit aufweisen, stärker an CPPs binden und diese stabilisieren sowie eine verbesserte klinische Wirksamkeit aufweisen. Die untersuchte Molekülserie enthält Strukturen der Art OEG-IP5, OEG<sub>2</sub>-IP4, OEG<sub>3</sub>-IP3 und OEG-IP2S3.

Kapitel 2 erläutert die klinischen Aspekte der vaskulären Verkalkung und gibt einen umfassenden Überblick über Arzneimittelkandidaten, die sich aktuell in der klinischen Entwicklung befinden. Das Kapitel endet mit der Schlussfolgerung, dass der ideale Inhibitor unabhängig der Ätiologie der vaskulären Verkalkung wirken sollte, indem er an der finalen Stufe der Krankheitsentwicklung angreift, der Entstehung und Ablagerung von Kalziumphosphat.

In Kapitel 3 wird die *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung von 4,6-di-O-(methoxydiethylenglycol)-*myo*-inositol-1,2,3,5-tetrakis(phosphate), abgekürzt (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4, dem wirkungsvollsten Kandidaten beschrieben. Dazu wurde ein Kalzifizierungs-Inhibitions-Test adaptiert, der derzeit für die Risikoabschätzung von vaskulärer Verkalkung in Patienten verwendet wird. In Summe wurden zehn IP6-Derivate getestet, wovon alle CPPs länger stabilisieren konnten als IP6. Das wirkungsvollste Molekül war (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4, welches eine circa 7-fach tiefere Wirkkonzentration als IP6 aufwies. In *in vitro*-Stabilitätstests erwies sich (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4 auch als resistenter gegenüber enzymatischer Dephosphorylierung, und es wurde nach Inkubation des Moleküls in Serum kein Aktivitätsverlust im Kalzifizierungstest gemessen. In Zellexperimenten mit VSMCs konnte (OEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-IP4 die Ablagerung von Calciumphosphat auf der Zellkultur verhindern und zwar mit nachgewiesener Dosisabhängigkeit und bei tieferen Konzentrationen als IP6. Das pharmakokinetische

Profil von  $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$  wurde in Ratten evaluiert. Eine intravenöse Injektion von 10 mg/kg  $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$  führte zu einer fast 10-mal längeren Plasma-Halbwertszeit im Vergleich zu IP6 (78 vs. 8 min). Zusätzlich war die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve circa sieben Mal grösser in der  $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$  Gruppe. Dieser Unterschied war nach subkutaner Applikation der Moleküle noch stärker ausgeprägt. In diesem Setting war eine Dosis von 10 mg/kg  $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$  vergleichbar mit einer Dosis von 100 mg/kg IP6. Schliesslich, konnte in Zusammenarbeit mit Forschern am Universitätsspital Lausanne die Effektivität von  $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$  in einem Rattenmodell nachgewiesen werden.

In Kapitel 4 werden unterschiedliche Modalitäten im Hinblick auf eine subkutane Formulierung von  $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$  mit verzögerter Wirkstofffreisetzung untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ladungsneutralisierte Komplexe getestet, die aus dem negativ geladenem  $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$  und dem positiv geladenem Protein Protamin zusammengesetzt sind. Es konnte jedoch keine Formulierung entwickelt werden, welche zu stabilen Komplexen mit  $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$  führte. Des Weiteren wurde die Formulierung von  $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$  als hydrophobes Salz untersucht und es wurden erste Experimente mit multilamellaren, konzentrisch aufgebauten Liposomen durchgeführt. In letztere, sogenannte Spheruliten, kann  $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$  verpackt werden.

Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Doktorarbeit werden schliesslich in Kapitel 5 rekapituliert und diskutiert.

Diese Arbeit liefert erste präklinische Resultate, welche die Effektivität von  $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$  für die potentielle Therapie der vaskulären Verkalkung aufzeigen, und beschreibt Möglichkeiten für eine subkutane Formulierung mit verzögerter Wirkstofffreisetzung. Eine weiterführende klinische Entwicklung dieses Moleküls kann in Erwägung gezogen werden.