



Doctoral Thesis

Novel amphotericin B conjugates synthesis and biological relevance

Author(s):

Zumbühl, Andreas

Publication Date:

2004

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004782948> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH No. 15594

Novel Amphotericin B Conjugates

Synthesis and Biological Relevance

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology
ETH Zürich

For the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by
Andreas Zumbühl

Dipl. Chem. ETH
Born February 26, 1974
Citizen of Büren/Oberdorf, NW

accepted on the recommendation of

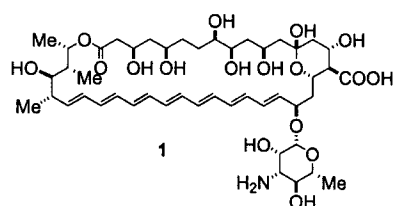
Prof. Erick M. Carreira, examiner
Prof. Peter Walde, co-examiner

June 16, 2004

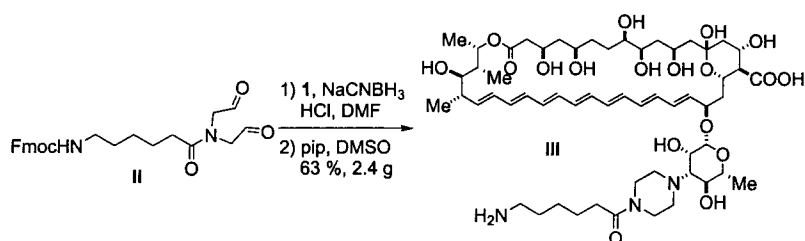
Zusammenfassung

Amphotericin B (**1**) ist eines der wichtigsten Medikamente zur Behandlung von Pilzinfektionen bei Menschen. Die Verbindung ist bereits seit 50 Jahren bekannt und Tausende von Publikationen wurden zu diesem Thema verfasst. Trotzdem bleibt der Wirkungsmechanismus von Amphotericin B (**1**) weiterhin rätselhaft.

Synthetisch hergestellte Amphotericin B Konjugate können mithelfen, Theorien zum Mechanismus von Amphotericin B (**1**) zu überprüfen.



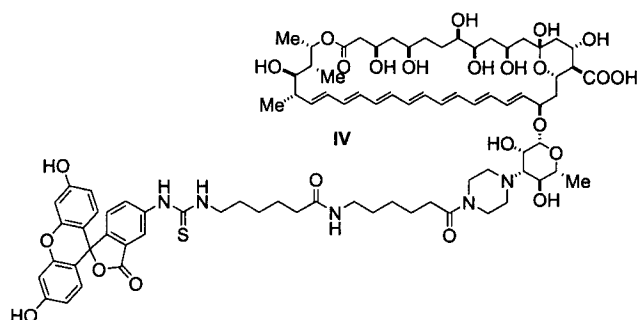
Die Amphotericin B-Analoga wurden durch die Anwendung einer neuartigen Linkerstrategie synthetisiert, basierend auf einer milden, chemoselektiven, doppelten reduktiven Aminierung. Ein Dialdehyd (**II**) reagiert mit dem primären Amin von Amphotericin B (**1**) zum Piperazinderivat. So bleibt das basische Amin erhalten, welches wichtig ist für die biologische Aktivität des Medikaments.



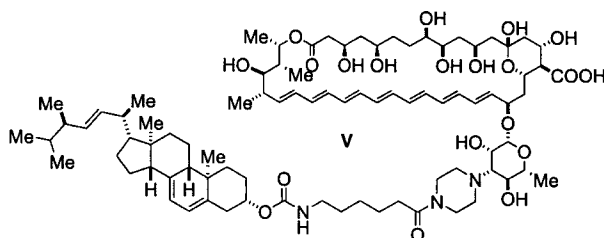
Das Aminohexanoylpiperazinyl-Amphotericin B (**III**) kann nun mit ver-

schiedenen anderen Molekülen gekoppelt werden. Alle neuen Konjugate wurden in der Folge auf ihre biologische Aktivität getestet und auch darauf, ob und wie stark die Durchlässigkeit von unilamellaren Liposomen für K^+ erhöht wird, ein wichtiges Indiz für einen eventuell vorhandenen Ionenkanal.

Das Fluorescein-Amphotericin B Konjugat **IV** reagiert sehr verschieden in Pilz-, resp. Säugetier-Zellmembranen. So wird das Konjugat in Jurkatzellen sofort internalisiert. In Pilzzellen lokalisiert man das Molekül allerdings nur in der Membran und es wird auch keine Aufnahme gemessen. Diese Daten ermöglichen den Rückschluss auf einen möglichen Mechanismus, der die Selektivität von Amphotericin B (**1**) für Pilzzellen erklärt.



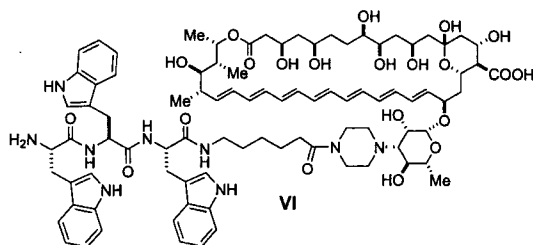
Eine Reihe von Steroid-Amphotericin B Konjugaten (z.B. **V**) wurde hergestellt, die es ermöglichten, die Bildung eines 1:1 Ergosterin-Amphotericin B Komplexes zu belegen. Amphotericin B (**1**) bildet keinen entsprechenden Komplex mit Cholesterin, was ebenfalls gezeigt werden konnte. Keines der Steroid Amphotericin B Konjugate zeigte biologische Aktivität. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass das Konjugat einen Zweiphasenmechanismus unterbindet, bei dem Amphotericin B (**1**) erst mit der Zellmembran interagieren muss, bevor es in die Membran aufgenommen werden kann.



Durch die Kombination von Membran-lokalisierenden Tryptophan Oligo-

meren mit dem kanalbildenden Amphotericin B (1) wurde ein Konjugat (VI) synthetisiert, mit welchem zum ersten Mal ein schneller K^+ -Ausfluss aus steroidfreien und cholesterinhaltigen Liposomen induziert wurde. Zudem konnte eine hohe Selektivität für Pilzzellen gegenüber Säugetierzellen festgestellt werden.

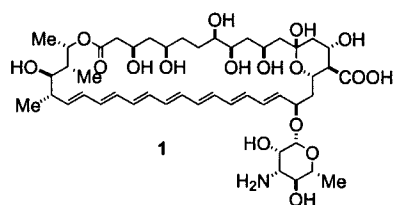
Ein vorgeformter Amphotericin B Kanal wurde ausgehend von Calix[4]-aren synthetisiert. Die biologische Aktivität des Moleküls und seine Aktivität im Liposomentest blieben erhalten. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Kanalhypothese, welche als Wirkungsmechanismus von Amphotericin B vorgeschlagen wurde.



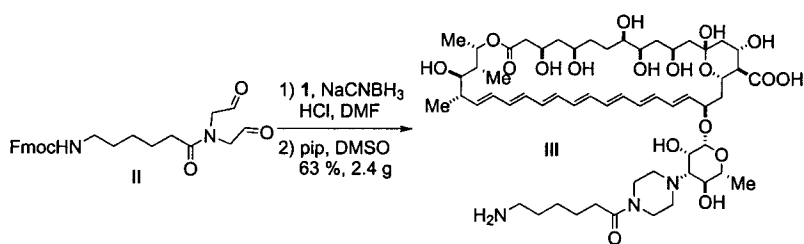
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mittels der Piperazinyllinker-Strategie eine Reihe von Amphotericin B Konjugaten synthetisiert werden konnte, die wertvolle Informationen zum Wirkungsmechanismus geliefert haben. Die so hergestellten Moleküle haben weitere interessante Eigenschaften, welche im Rahmen von Zusammenarbeiten mit anderen Gruppen untersucht wurden.

Abstract

Amphotericin B (**1**) is an important antifungal agent. Despite over 50 years of research the mechanism of action of this drug is still not completely elucidated. Synthetically modified conjugates of amphotericin B bearing different reporter groups could help testing various existing hypothesis.

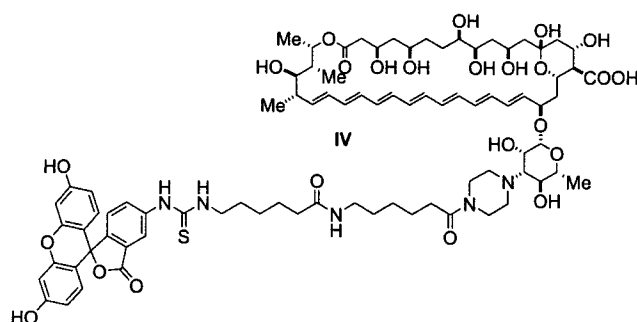


A novel linker strategy was introduced, based on a mild chemoselective double reductive amination of a dialdehyde (**II**) to the primary amine of amphotericin B (**1**). This strategy preserves the protonable amine function that is crucial for the antifungal activity of the molecule.

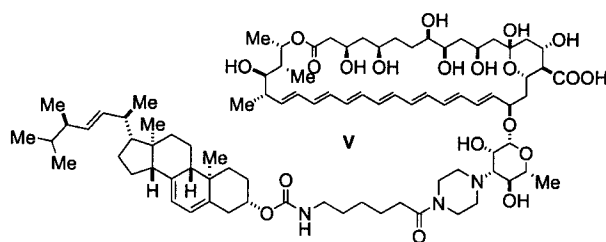


Different reporter groups were attached to the aminohexanoyl piperazinyl amphotericin B (**III**) scaffold. Every new conjugate was tested on its anti-fungal activity and its potency to induce K^+ leakage from large unilamellar vesicles.

A fluorescein-amphotericin B conjugate (**IV**) was shown to interact differently with mammalian cell or fungal cell membranes. Whereas the conjugate was internalized into Jurkat cells no internalization occurred in yeast cells, suggesting a possible answer to why amphotericin B (**1**) selectively destroys fungal cells over mammalian cells.



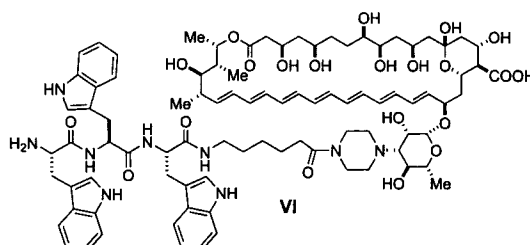
A series of sterol-amphotericin B conjugates (**V**) established the formation of an ergosterol-amphotericin B 1:1 complex and the absence of complex formation with cholesterol. The low antifungal activity of both compounds speaks in favor of a biphasic mechanism of action of amphotericin B (**1**) involving first an interaction with cellular membrane lipids and the subsequent uptake into the bilayer.



The membrane-localizing effect of tryptophan oligomers was combined with the pore-inducing activity of amphotericin B (**1**) to form a conjugate (**VI**) showing enhanced K^+ efflux from non-sterol containing vesicles and high selectivities for ergosterol- over cholesterol-containing membranes.

A preformed amphotericin B channel was synthesized based on a calix[4]-arene scaffold showing preserved K^+ leakage inducing effects on vesicles and antifungal activity. This fact is in accordance with the pore-forming hypoth-

esis in the mechanism of action of amphotericin B (**1**).



Overall the usefulness of the piperazinyl linker strategy is demonstrated on various compounds giving valuable information on the mechanism of action of amphotericin B (**1**). Furthermore molecules could be synthesized bearing interesting features for medical, biological, physical and chemical experiments that were performed in a series of worldwide collaborations.