

Diss. ETH No.18892

# **Amphotericin B Derivatives as Mechanistic Probes**

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

for the degree of  
**Doctor of Sciences**

presented by

**Ock Youm Jeon**

M. Sc. POSTECH, Pohang

Born December 01, 1979

Citizen of the Republic of Korea

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Erick M. Carreira, examiner

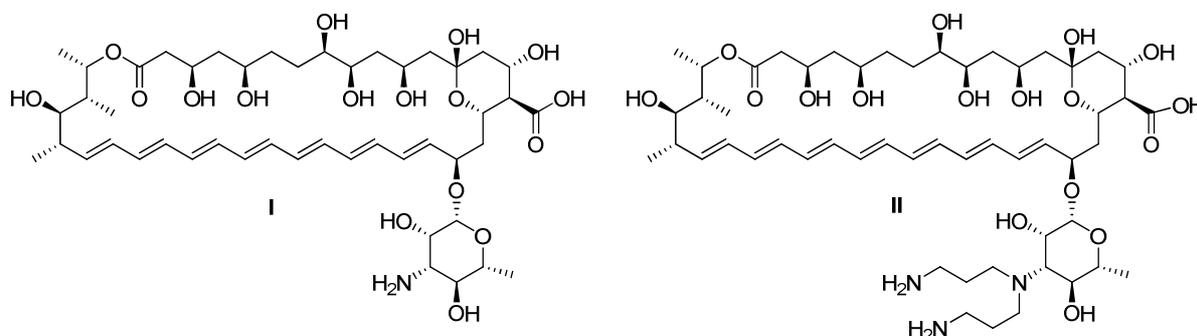
Prof. Dr. Donald Hilvert, co-examiner

Dr. Bernd Wollscheid, co-examiner

Zürich, 2010

## Abstract

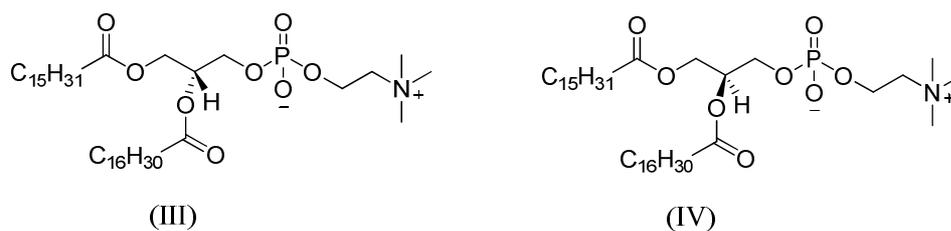
Amphotericin B (AmB, **I**), a commonly used antifungal agent for numerous systemic fungal infections, has been proposed to induce the formation of pores when associated with sterols in the cellular membrane. AmB analogues have been studied for a better understanding of its mechanism of action and selective toxicity to fungal cells. However, the mechanism of action for AmB is not completely clear yet. Additionally, *N,N*-bis(3-aminopropyl) AmB (**II**) was synthesized by the Carreira group and shows a remarkable increase in activity compared to AmB. This thesis is composed of four different parts, each of which describes the mechanistic study of AmB or *N,N*-bis(3-aminopropyl) AmB action by different approaches. Each section begins with a description of the past literature.



Chapter I provides a new approach to understand the mechanism of action of AmB. *N,N*-Bis(3-aminopropyl) AmB is attached to a TiO<sub>2</sub> surface by a fouling strategy using the anachelin chromophore. The AmB analogue conjugate immobilized surface will be discussed to understand the behavior of AmB. Chapter II covers an overview of the past and current literature with respect to the synthesis of derivatives of AmB with improved therapeutic action. In this second chapter is shown the strategy for the derivatization of AmB from the aglycone (amphoteronolide B) to add a primary amine to mimic the amine of mycosamine, which is crucial for the activity of AmB. In addition, it will discuss attempts to enhance the potency of AmB by chemically modifying or adding other antifungal agents.

It is hypothesized that AmB initiates cell death by forming pores on the membrane. Chapter III describes an overview of studies of the interactions between components (sterol, lipid) in the biological membrane and AmB molecule. These studies have so far resulted in inconsistent patterns; therefore the function of sterol or lipid has not been fully understood. In the

third chapter is reported the differential interactions with polyene antibiotic agents (AmB, *N,N*-bis(3-aminopropyl) AmB and nystatin) between a natural phospholipid, *nat*-POPC (**III**), and unnatural phospholipid, *ent*-POPC (**IV**). The enantiomer of POPC is synthesized in 6 steps in optically enriched form. Importantly, with the *N,N*-bis(3-aminopropyl) AmB analogue in the presence of ergosterol the degree of the potassium ion efflux differed depending on the enantiomer of the lipid. This means *ent*-POPC lipid induced the differential interactions with *N,N*-bis(3-aminopropyl) AmB as compared to *nat*-POPC.

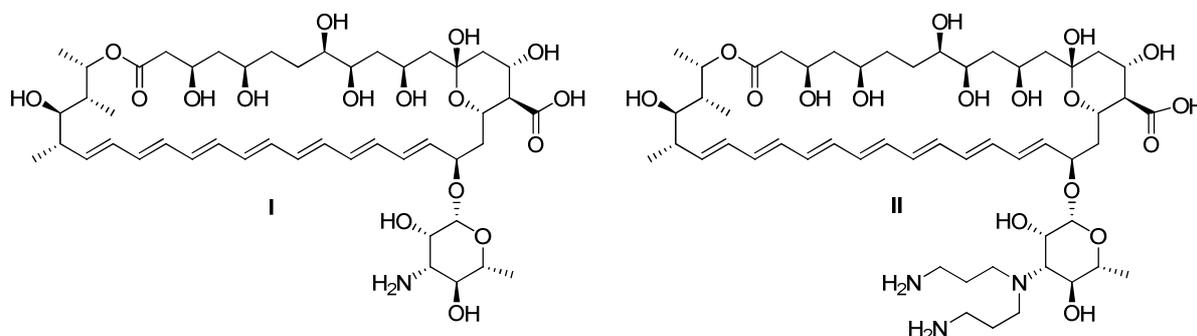


The cell surface capturing (CSC) technology is used for the unbiased and highly specific identification and quantification of cell surface glycoproteins by mass spectrometry (MS). This technique demonstrates the powerful applicability of chemical reagents in the tagging and purification of cell surface glycopeptides and provides the basis for further chemical approaches that enable the detection of interactions of cell surface proteins with other proteins or bioactive substances such as AmB. In chapter IV, the synthesis of novel trifunctional cross-linkers is discussed that allow for the development of CSC towards a cell surface receptor capturing (CSRC) technique for the identification of ligand-receptor interactions on live cells. In several approaches, different trifunctional and highly reactive cross-linkers were synthesized and applied in successful proof-of-principal experiments with protein ligands. Consequently, one of these cross-linkers was coupled to AmB and the resulting conjugate was used in CSRC experiments in order to detect potential interactions of AmB with plasma membrane proteins on live cells. In these experiments, the AmB conjugate showed initial binding to live cells in flow cytometric analyses, suggesting that the conjugate is still able to interact with biomembranes. However, a first series of CSRC experiments was not able to identify specific protein receptors for AmB on the one cell line tested. Therefore, further studies will be necessary to demonstrate the suitability of this conjugate for CSRC applications and further CSRC experiments will have to be conducted with cell lines that are more likely to express potential receptors for AmB.

In conclusion, this thesis describes different types of AmB derivatives as mechanistic probes and these derivatives are studied in various approaches.

## Zusammenfassung

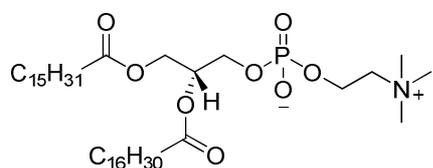
Es wurde vorgeschlagen, dass Amphotericin B (AmB, **I**), ein häufig verwendetes Antimykotikum gegen eine Vielzahl von systemischen Pilzinfektionen, mit Hilfe von Steroiden in der Zellmembran Poren bildet. Um den Wirkmechanismus und die Selektivität für Pilzzellen besser zu verstehen wurde daraufhin eine Reihe von AmB-Analoga studiert. Trotz dieser Anstrengungen ist der genaue Wirkmechanismus bis heute noch nicht vollständig geklärt. Zudem besitzt die in der Forschungsgruppe von Prof. Carreira hergestellte Verbindung *N,N*-bis(3-aminopropyl) AmB (**II**) eine markant höhere Aktivität als AmB. Diese Dissertation behandelt vier verschiedene Ansätze um den Wirkmodus von AmB und *N,N*-bis(3-aminopropyl) AmB aufzuklären. Jedem Ansatz ist ein eigenes Kapitel, welches mit einer Übersicht über die bereits existierenden Arbeiten beginnt, gewidmet.



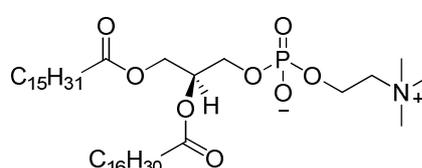
Kapitel I beschreibt einen neuartigen Ansatz um den Wirkmechanismus von AmB zu verstehen. Dabei wurde *N,N*-bis(3-aminopropyl) AmB mit Hilfe des Anachelin Chromophors auf einer TiO<sub>2</sub>-Oberfläche fixiert. Das Verhalten dieser neuartigen Oberflächenbeschichtung wird diskutiert um das Verhalten von AmB zu verstehen. Kapitel II beinhaltet einen Literatur-Überblick über die Synthese von AmB-Derivaten mit einer erhöhten therapeutischen Wirksamkeit. Dieses Kapitel beinhaltet auch eine Beschreibung der Strategie für die Derivatisierung von AmB ausgehend vom Aglycon (Amphoteronolid B), wobei ein primäres Amin die Aminfunktion des essentiellen Mykosamins imitieren soll. Zusätzlich werden Ansätze besprochen wie die Wirksamkeit von AmB durch chemische Modifikation oder Kombination mit weiteren Fungiziden erhöht werden könnte.

Es wird angenommen, dass AmB den Zelltod induziert, indem es Poren in der Zellmembran bildet. Kapitel III beschreibt einen Überblick über die Studien, welche sich mit der Interaktion von AmB mit Komponenten der Zellmembran (Steroide, Lipide) befassen. Die

widersprüchlichen Resultate dieser Studien lassen jedoch den Schluss zu, dass die genannten Interaktionen noch nicht vollständig verstanden wurden. Das dritte Kapitel beschreibt auch die unterschiedliche Wechselwirkung von polyenen Antibiotika (AmB, *N,N*-bis(3-aminopropyl) AmB und Nystatin) mit natürlichen, *nat*-POPC (**III**), und unnatürlichen Phospholipiden, *ent*-POPC (**IV**). Das Enantiomer von POPC wurde in 6 Schritten in optisch angereicherter Form hergestellt. Das Ausmass des von *N,N*-bis(3-aminopropyl) AmB induzierten Kalium-Ausflusses in Gegenwart von Ergosterol zeigte grosse Unterschiede wenn die unterschiedlichen Enantiomere von POPC verwendet wurden. Dies bedeutet, dass *ent*-POPC eine unterschiedliche Wechselwirkung mit *N,N*-bis(3-aminopropyl) AmB im Vergleich zu *nat*-POPC eingeht.



(III)



(IV)

Cell Surface Capturing (CSC) ist eine etablierte Methode, welche die unvoreingenommene und hochspezifische Identifizierung und Quantifizierung von Glykoproteinen auf Zelloberflächen mittels Massenspektrometrie (MS) ermöglicht. Diese Methode veranschaulicht die Anwendung von chemischen Reagenzien in der Markierung und Aufreinigung von Zelloberflächen-Glykopeptiden und liefert die Basis für weitere chemische Ansätze, welche die Detektion von Interaktionen von Zelloberflächenproteinen mit anderen Proteinen oder bioaktiven Substanzen wie AmB ermöglichen. Kapitel IV behandelt die Synthese von neuartigen, trifunktionalen Cross-linkern, mit denen die CSC Methode zu einer Cell Surface Receptor Capturing (CSRC) weiterentwickelt wurde, welche die Identifikation von Ligand-Rezeptor-Interaktionen auf lebenden Zellen ermöglicht. In mehreren Ansätzen wurden verschiedene trifunktionale, hochreaktive Cross-linker synthetisiert und in erfolgreichen Testexperimenten mit Protein-Liganden angewendet. Daraufhin wurde einer dieser Cross-linker mit AmB verbunden und das so enthaltene Konjugat in CSRC-Experimenten eingesetzt, um mögliche Wechselwirkungen zwischen AmB und Plasmamembranproteinen auf lebenden Zellen zu detektieren. In diesen Experimenten zeigte das AmB-Konjugat zunächst Bindung an lebende Zellen in fließzytometrischen Analysen, was darauf schliessen lässt, dass das Konjugat immer noch mit Biomembranen interagieren kann. Eine erste Serie von CSRC-Messungen konnte hingegen keine spezifischen Proteinrezeptoren in der untersuchten Zelllinie identifizieren. Daher

sind weitere Studien nötig um die Anwendbarkeit des AmB-Konjugats in CSRC-Experimenten aufzuzeigen. Ausserdem müssen weitere CSRC-Studien durchgeführt werden mit Zelllinien die eher potentielle Protein-Rezeptoren für AmB exprimieren.

Zusammenfassend beschreibt diese Dissertation verschiedene Typen von AmB-Derivaten als mechanistische Proben, die in verschiedenen Ansätzen untersucht wurden.