



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

**Joanna Zielińska**

Molekularna ocena mechanizmu działania amfoterycyny B i jej pochodnych  
w kontekście poszukiwania nowych leków przeciwgrzybiczych

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
Promotor: prof. dr hab. Tomasz Bączek

**Gdańsk 2020**

# Streszczenie

Pomimo intensywnego rozwoju medycyny, ciężkie zakażenia grzybicze są wciąż dużym problemem w terapii, zwłaszcza u osób z upośledzoną odpornością. Jednym z kluczowych leków stosowanych w leczeniu grzybic układu krążenia jest amfoterycyna B – antybiotyk z grupy makrolidów polienowych. Lek ten posiada dużo pożądanych właściwości, jak zdolność przenikania bariery krew-mózg czy brak indukowania oporności. Niestety wywołuje też wiele reakcji ubocznych. Pomimo istnienia amfoterycyny B na rynku farmaceutycznym od ponad sześćdziesięciu lat, dokładny mechanizm jej działania jest zbyt słabo znany, żeby zaproponować racjonalne modyfikacje struktury. Obszar tematyczny niniejszej pracy doktorskiej obejmuje analizę pierwszych etapów działania amfoterycyny B na poziomie molekularnym.

Przeprowadzone w ramach badań symulacje procesu wnikania cząsteczki amfoterycyny B do wnętrza błony komórkowej wykazały, że proces wnikania leku jest korzystny termodynamicznie i w minimalnym stopniu zależy od rodzaju błony komórkowej. Błony zawierające sterole (30% mol cholesterolu i 30% mol ergosterolu) stabilizują ułożenie leku na poziomie jednej z dwuwarstw błony pozwalając na korzystne oddziaływania pomiędzy makrolidem a niepolarnym wnętrzem błony. Dodatkowo błony zawierające sterole faworyzują ułożenie cząsteczek leku prostopadle do płaszczyzny błony komórkowej, co może wpływać na tworzenie się i stabilność kanałów transbłonowych.

Analiza kinetyki i termodynamiki dimeryzacji amfoterycyny B w środowisku wodnym wykazała, że dimery przyjmują zarówno orientację równoległą (52%), jak i antyrównoległą (47%) z niemal identycznym prawdopodobieństwem, co odzwierciedla brak preferencji dla którejkolwiek orientacji. Ustalono także, że stała szybkości dimeryzacji wynosi ok.  $k_{ol} = 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Dimeryzacja jest głównie napędzana przez oddziaływania hydrofobowe, natomiast na przebieg reakcji nie ma wpływu obecność grup zjonizowanych (karboksylowej i aminowej).

Dzięki zastosowaniu dynamiki molekularnej możliwa była ostatecznie interpretacja wyników uzyskanych techniką spektroskopii fluorescencyjnej dotyczących wnikania cząsteczek amfoterycyny B do wnętrza liposomów złożonych z różnych rodzajów fosfolipidów (DPPC, DMPC, POPC). Ustalono, że większe oligomery jak np. tetramery znajdujące się wewnątrz dwuwarstwy lipidowej są stabilizowane przez sterole, które są także odpowiedzialne za zmianę organizacji oligomerów we wnętrzu błony.

# Abstract

Despite the intensive development of medicine, severe fungal infections still remain a pressing problem in the therapy of mycoses, especially for people with impaired immunity. One of the drugs used in systemic antifungal therapy is amphotericin B – a prominent polyene macrolide antibiotic. This drug has many unique properties, such as the ability to penetrate the blood-brain barrier or the very low resistance induction rates. Unfortunately, it also causes many adverse reactions. Despite its 60-years presence on the pharmaceutical market, the mechanism of action of amphotericin B is still insufficiently known to propose reasonable changes in its structure. The scope of the doctoral thesis covers the initial steps in the mechanism of action of amphotericin B on the molecular level.

Molecular dynamics simulations of the process of penetration of the amphotericin B molecule into the cell membrane have shown that drug penetration is thermodynamically favourable and minimally depends on cell membrane composition. Membranes containing sterols (30 mol % cholesterol and 30 mol % ergosterol) stabilize the drug alignment at one of the membrane bilayers, allowing for favorable interactions between the macrolide and the non-polar interior of the membrane. Nevertheless, sterol-rich membranes (30% cholesterol and ergosterol) induce a perpendicular alignment of the antibiotic molecules relative to the cell membrane plane, which can affect the formation and stability of transmembrane channels.

Analysis of kinetic and thermodynamic properties of amphotericin B dimerization in an aqueous environment showed that dimers exist in both parallel (52%) and antiparallel (47%) orientations with almost identical probabilities – reflecting the lack of preference for either orientation. The dimerization rate constant was also calculated as about  $k_{ol} = 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Dimerization is mainly hydrophobically driven, while the reaction is not affected by the presence of ionized (carboxyl and amino) groups.

By using molecular dynamics, it was finally possible to interpret the results obtained by fluorescence spectroscopy on the penetration of amphotericin B molecules into liposomes composed of various types of phospholipids (DPPC, DMPC, POPC). It was established that larger oligomers, such as tetramers inside the lipid bilayer, are stabilized by sterols, which are also responsible for reorganizing the oligomers inside the membrane.