

## Zusammenfassung

Cyclodepsipeptide sind nicht-ribosomale Peptid-Naturstoffe von komplexer Struktur oftmals mit pharmakologischem Potential. Im Jahr 1992 wurde eine neue Klasse an Cyclodepsipeptiden aus *Microbispora sp* ATCC 55140 isoliert, die Cochinmicine. Cochinmicin I-V fungieren als Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, indem sie dosisabhängig die Endothelin-stimulierte Phosphoinositol-Kaskade hemmen. Ihr Grundgerüst ist ein Macrolactonring bestehend aus 5 Aminosäuren, die größtenteils in der D-Form vorliegen. Die zweifach vorkommende sehr seltene Aminosäure 3,5-Dihydroxyphenylglycin (Dpg) und die Pyrrol-Einheit am N-Terminus, machen die Cochinmicine zu synthetisch herausfordernden Molekülen. Entscheidend für eine erfolgreiche Synthese ist die Wahl einer geeigneten Position für die Zyklisierung und die selektive Veresterung der racemisierungsfälligen Aminosäure Dpg. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschreibt die Totalsynthese des pharmakologisch aktivsten Derivats Cochinmicin I und dessen nicht-natürlich vorkommenden Isomers Cochinmicin VI. Die Synthese beruht auf der retrosynthetischen Zerlegung der Peptidstruktur in drei Hauptfragmente. Der konvergente Aufbau des Moleküls gewährleistet nicht nur eine bestmögliche Ausbeute, sondern erlaubt ebenfalls eine schnelle Modifizierung des Moleküls, um in nachfolgenden SAR-Studien potente Derivate zu identifizieren. Bei der Entwicklung einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie zur selektiven Adressierung aller funktionellen Gruppen, stellten die sensitive Aminosäure Dpg und das Pyrrol einen limitierenden Faktor dar. Die Anwesenheit dieser Aminosäure verboten den Einsatz vieler gängiger Schutzgruppen, was die Synthesestrategie für den Aufbau der Fragmente zur Darstellung des Zielmoleküls maßgeblich beeinflusste. Die erste Cochinmicin-Synthese im Milligramm-Maßstab wurde erfolgreich etabliert und das synthetische Produkt wurde vollständig mittels NMR-Spektroskopie und HRMS charakterisiert, wodurch die Korrektheit der zuvor publizierten absoluten Stereochemie von Cochinmicin I bewiesen wurde. Eine Genom-Sequenzierung und die nachfolgende Identifizierung des Genclusters bestätigte zudem, dass es sich bei den Cochinmicinen um reine NRPS-synthetisierte Peptid-Naturstoffe handelt.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Entwicklung einer alternativen Aufreinigungsstrategie von SPPS-synthetisierten Peptiden. Für die schnelle Synthese von Peptiden ist die SPPS ist ein etabliertes Verfahren, dessen Prinzip auf dem Einsatz von Überschüssen an Reagenzien basiert, welche durch ein anschließendes Waschen der festen Phase leicht entfernt werden können. Diese Vorgehensweise liefert jedoch nicht ausschließlich das gewünschte Peptid, sondern ebenfalls kürzere Abbruchsequenzen, wodurch chromatographische Reinigungsschritte erforderlich sind. Durch den N-terminalen Einbau eines Affinitätslinkers, der durch definierte Stimuli selektiv gespalten werden kann, ist es möglich das Zielpeptid auf einem Aufreinigungsharz zu binden und ähnlich zum SPPS-Konzept die Verunreinigungen mittels Waschschritten zu entfernen. Das Peptid kann nach der Reinigung durch die eingebaute Spaltgruppe wieder vom Aufreinigungsharz gelöst werden. Dieses Prinzip wird als HPLC-freie *Catch & Release* Aufreinigung bezeichnet und wurde erstmals 1976 angewandt. Die bisher publizierten Methoden besitzen jedoch Einschränkungen hinsichtlich der Kompatibilität mit vereinzelt funktionellen Gruppen, sind unwirtschaftlichen oder aus technischen Gründen nachteilig. Durch die systematische Analyse der bereits bekannten Affinitäts- und Spaltgruppen wurde im Zuge dieser Arbeit eine innovative Form der Immobilisierung auf einem Aufreinigungsharz entwickelt. Diese besitzt gegenüber den klassischen Bindungsarten wesentliche Vorteile. Die Affinitätsbindung basiert auf der Adsorption von organischen Liganden auf Metalloxidoberflächen. Die Komplexierung durch Adsorption ist selektiv, schnell und besitzt eine hohe Bindungskonstante, sodass das Peptid hocheffizient auf dem Metalloxid immobilisiert wurde. Die Herstellung von Metalloxiden mit hoher spezifischer Oberfläche erlaubte zudem eine adäquate Beladung und gewährleistet dadurch eine sehr gute Handhabung im großen Maßstab sowie einen ökonomisch sinnvollen Einsatz. In Kombination mit dieser bisher nicht bei *Catch & Release* Methoden zum Einsatz gekommenen Immobilisierung wurden verschiedene Spaltgruppen getestet. Dabei haben sich sowohl die Photospaltung als auch die nukleophile Spaltung als geeignet erwiesen. Durch den Einsatz der neu entwickelten Linkersysteme wurde die Aufreinigung eines Testpeptids erfolgreich durchgeführt und somit der konzeptionelle Beweis für die vorliegende Methode geliefert.

## Abstract

Cyclodepsipeptides are non-ribosomally synthesized peptides of complex structure with pharmacological potential. In 1992, a new class of cyclodepsipeptides was isolated from *Microbispora sp.* ATCC 55140, the cochinmicins. Cochinmicins I-V function as endothelin receptor antagonists by dose-dependent inhibition of the endothelin-stimulated phosphoinositol cascade. Their basic structure is a macrolactone-ring consisting of 5 amino acids, most of which are in the D-form. The dual occurrence of the very rare amino acid 3,5-dihydroxyphenylglycine (Dpg) and the pyrrole unit at the N-terminus, make the cochinmicins synthetically challenging molecules. Crucial for a successful synthesis is the determination of a suitable position for the cyclization as well as a selective esterification of the racemization-prone amino acid Dpg. The first part of the present work describes the total synthesis of the pharmacologically most active derivative cochinmicin I and its non-naturally occurring isomer cochinmicin VI. The retrosynthetic analysis divided the peptide structure into three main fragments. The resulting convergent synthesis strategy not only ensures the best possible yield, but also allows for a rapid modification of the molecule to identify potent derivatives in subsequent SAR studies. In the development of an orthogonal protecting group strategy to selectively address all functional groups, the sensitive amino acid Dpg and the pyrrole carboxylic acid imposed a limiting factor as they prohibited the use of many common protecting groups, which influenced the fragment synthesis strategy significantly. The first milligram-scale cochinmicin synthesis was successfully established. Subsequently, the synthetic product was fully characterized by NMR spectroscopy and HRMS, proving the correctness of the previously published absolute stereochemistry of cochinmicin I. Genome sequencing and successive gene cluster identification also confirmed that cochinmicins are pure NRPS-synthesized natural products.

The second part of the present work deals with the development of an alternative purification strategy of SPPS-synthesized peptides. For the rapid synthesis of peptides, SPPS is an established procedure whose principle is based on the use of reagents, which can be easily removed by subsequent washing of the solid support. However, this approach does not only yield the desired peptide, but also shorter truncated sequences, requiring chromatographic purification steps. By incorporating an N-terminal affinity linker which can be selectively cleaved by defined stimuli, it is possible to bind the target peptide on a purification resin and, similar to the SPPS approach, remove the impurities by washing steps. After purification, the peptide can then be released from the purification resin utilizing the incorporated cleavage group. This principle is called HPLC-free catch & release purification and was first applied in 1976. Unfortunately, the methods published so far either have limitations in terms of compatibility with specific functional groups, are uneconomical, or are disadvantageous for technical reasons. By systematically analyzing the affinity and cleavage groups already known, an innovative form of immobilization on a purification resin was developed as a result of this work. The established method has significant advantages over the former types of binding. Its affinity binding is based on the adsorption of organic ligands on metal oxide surfaces. Complexation by adsorption is selective, fast and has a high binding constant. Hence, the immobilization of the peptide on the metal oxide was highly efficient. In addition, the production of metal oxides with a high specific surface area facilitated an adequate loading, thus ensuring very good large-scale handling and economically viable use. In combination with this immobilization, which has not been used in catch & release methods so far, different cleavage groups were tested. Both photo cleavage and nucleophilic cleavage proved to be suitable. By using the newly developed linker systems, the purification of a test peptide was successfully performed, providing proof of concept for the presented method.