

Synthese von Peptiden, Peptoiden und Protein-ähnlichen Strukturen im  
μ-Arrayformat

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl. Chem. Daniela Silke Mattes

aus

Karlsruhe

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Frank Breitling

Korreferent: Prof. Dr. Stefan Bräse

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2017



Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2014 bis Juni 2017 unter Anleitung von Prof. Dr. Frank Breitling und Prof. Dr. Stefan Bräse am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) und am Institut für Organische Chemie (IOC) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) angefertigt.

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis beachtet habe. Des Weiteren erkläre ich, dass ich mich derzeit in keinem laufenden Promotionsverfahren befinde, und auch keine vorausgegangenen Promotionsversuche unternommen habe. Die elektronische Version der Arbeit stimmt mit der schriftlichen Version überein und die Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. A (6) der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT ist beim Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) am KIT gesichert.

Karlsruhe, 19.06.2017

Daniela Silke Mattes



# Kurzzusammenfassung

Für das Verständnis von biologischen Prozessen ist die Erforschung von Protein-Protein-Wechselwirkungen unabdingbar. Diagnostische Marker oder neue Impfstoffe können dadurch zugänglich gemacht werden. Arrays, die unterschiedliche, voneinander räumlich getrennte Peptide oder Proteine tragen, erlauben ein Hochdurchsatz-Screening um Bindungsstellen zu untersuchen, die für biologisch relevante Interaktionen verantwortlich sind. Peptidarrays werden für die Untersuchung linearer und zyklischer Bindungsstellen verwendet. Für konformationelle- oder diskontinuierliche-Bindemotive werden Protein-Arrays benötigt, die bisher nur mittels biologischer Methoden hergestellt werden können. Allerdings ist die Herstellung von hochdichten Protein-Arrays teuer, die Faltung der biologisch synthetisierten Proteine ist meistens unbekannt, spezifische Epitope verbergen sich gegenseitig und nur eine begrenzte Anzahl verschiedener Proteine ist verfügbar. Daher haben Peptid-basierte Arrays, die Protein-ähnliche Strukturen nachahmen können, ein enormes Potenzial.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit einer Methode zur Herstellung solcher Strukturen im Array-Format als mögliche Alternative zu Protein-Arrays. Dazu wurden Trifunktionale Linker, als Anker für zwei oder drei verschiedene Peptide, an der festen Phase synthetisiert. Aufgrund der räumlichen Nähe können die Peptide miteinander interagieren und eine Protein-ähnliche Struktur bilden. Proteinartige Strukturen wurden erfolgreich an der festen Phase synthetisiert. Durch die Verwendung einer Transfermethode, die eine *in situ* Aufreinigung der erzeugten Peptidarrays ermöglicht, konnten gereinigte Arrays mit Protein-ähnlichen Strukturen generiert werden. Der Nachweis erfolgte massenspektrometrisch und mittels Immunfärbung.

Im zweiten Teil dieser Arbeit geht es um die Synthese von Peptidarrays mit Sonderbausteinen unter der Verwendung einer Laser-basierten Methode. Mit dieser Methode sind Peptidarrays mit einer Dichte von mehr als 17 000 Peptiden/cm<sup>2</sup> möglich. Hierfür werden die benötigten Chemikalien in ein festes Lösungsmittel (Polymermatrix) eingebettet. Diese Mischung wird in einem gewünschten Spotmuster mit Hilfe eines Lasers auf eine Oberfläche (Akzeptor) transferiert. In einem separaten Hitze-Schritt erfolgen dann die Diffusion und die Kupplung der transferierten Chemikalien an die vorhandenen

funktionellen Gruppen der Oberfläche. Zahlreiche Sonderbausteine wie posttranslational modifizierte Aminosäuren oder Fluorophore konnten in einen Peptidarray eingebaut werden. Zudem konnten Peptidarrays via Click-Chemie erfolgreich mit der Laser-basierten Methode modifiziert werden.

Der dritte Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Synthese von hochdichten Peptoidarrays. In Bindungsstudien erwies sich die große Vielfalt der Peptoide als gute Alternative zu Peptiden. Sie können Peptide auf Grund ihrer Strukturähnlichkeit nachahmen, bieten jedoch den Vorteil einer Resistenz gegenüber enzymatischem Abbau, eine längere *in vivo* Halbwertszeit, eine bessere Löslichkeit und bessere Membrandurchlässigkeit.

Peptoidarrays mit mehr als 1600 Peptoiden/cm<sup>2</sup> können mit Hilfe der Submonomer-Methode von Zuckermann und der Monomer-Methode mittels des Laser-basierten Verfahren generiert werden und die synthetisierten Peptoide konnten massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Zudem konnten Peptoide via ortsaufgelöster *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation* (MALDI) Massenspektrometrie (MS) nachgewiesen werden. Hierbei wurde die Laser-basierte Methode eingesetzt, um die benötigte MALDI-Matrix zu transferieren.

# Summary

The investigation of protein-protein interactions plays an important role in understanding biomolecular processes. This allows for the investigation of diagnostic markers and the development of new vaccines. Arrays, which bear different peptides or proteins arranged as separate spots, permit high-throughput screening to investigate binding sites. Peptide arrays are used to study linear and cyclic binding sites, responsible for the interactions. To study the more abundant conformational or discontinuous binding sites, protein arrays are the major choice, where proteins still have to be produced with biological methods. However, the drawbacks of such arrays are the high costs of generating high-density protein arrays, the protein conformations are largely unknown, specific epitopes can conceal each other, and only a limited number of proteins are available. Therefore, peptide-based arrays, which can mimic protein-like structures, have an enormous potential.

Therefore, the focus of the first part of this thesis lies on a method to create such structures in the array format as a versatile alternative to protein arrays. A trifunctional linker, which can react with two or three different peptides, was synthesized. Due to the spatial proximity, the peptides interact and can form a protein-like structure. As a proof of concept, protein-like structures were generated on beads and on a polymer synthesis surface. Moreover, a multistep transfer process allows for the synthesis of purified high-density arrays.

The second part of this thesis is focused on the synthesis of arrays with special building blocks or the coupling of fluorophores via a Laser-based approach. With this method, peptide arrays with densities of  $> 17\ 000$  spots/cm<sup>2</sup> were built up. The required chemicals embedded in a solid solvent (a polymer matrix) were Laser-transferred to an acceptor surface in a desired pattern. In a separate heating step, the matrix becomes viscous and allows for the diffusion and coupling of the chemicals to the free functional groups on the synthesis surface. Numerous dedicated building blocks, e.g. post-translationally modified amino acids were successfully coupled to an array via the Laser-based approach. Fluorophores were built up or modifications of their side chains via click chemistry were shown.

In the third part, the main focus was on the Laser-based synthesis of high-density peptoid arrays. In binding studies, peptoids have already proven to be versatile binders for proteins.

They can mimic peptides, due to their structural similarity. Furthermore, they have the advantages in e.g. resistance to proteolytic cleavage, a better solubility, and cell membrane permeability. Peptoid arrays with  $> 1600$  peptoids/cm<sup>2</sup> could be synthesized with the Laser-based approach by following the submonomer method of Zuckermann or the monomer method and the peptoid synthesis could be successfully validated via *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation* (MALDI) mass spectrometry.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Peptide und Proteine .....	3
1.2. Chemische Peptid-Synthese .....	4
1.3. Festphasenchemie .....	5
1.4. Peptidarrays.....	7
1.4.1. Combinatorial Laser-induced forward transfer (cLIFT).....	9
1.4.2. Reinigungsmethoden für Peptidarrays .....	11
1.5. Proteinarrays und Arrays mit Protein-ähnlichen Strukturen.....	12
1.6. Peptoide.....	14
1.6.1. Monomer-Methode .....	15
1.6.2. Submonomer-Methode .....	16
1.7. Peptoidarrays.....	18
1.8. Immunosignaturing .....	20
1.9. Fluoreszenzfarbstoffe.....	20
1.10. Methoden zur Reaktionskontrolle .....	21
1.11. Click-Reaktionen.....	22
2. Ziel der Arbeit.....	26
3. Hauptteil.....	27
3.1. Aufreinigung von in situ erzeugten Peptidarrays und Arrays mit Protein-ähnlichen Strukturen.....	27
3.1.1. Vorbetrachtungen.....	27
3.1.2. Benennung der Moleküle.....	30
3.1.3. Optimierung der Transfer- und Kupplungsbedingungen von Peptidarrays auf eine Zieloberfläche .....	31
3.1.4. Peptidarray-Replika mit fluoreszierenden Molekülen.....	47
3.1.5. Peptidarray-Replika von hunderten Peptiden .....	50
3.1.6. Alternative orts aufgelöste Abspaltbedingungen für Peptidarrays .....	52
3.1.7. Synthese von Peptidarrays auf einem Photo- oder Rink-Linker.....	62
3.1.8. Serum-Färbungen mit transferierten Peptidarrays .....	63
3.1.9. Synthese von multifunktionalen Linkern.....	65
3.1.10. Peptidarray-Transfer via bifunktionalem Linker .....	75
3.1.11. Erzeugung von Dipeptiden mittels Transfermethode .....	77

3.1.12. Erzeugung von Dipeptiden im Arrayformat mittels Transfermethode .....	79
3.1.13. Synthese von Protein-ähnlichen Strukturen an Beads .....	84
3.1.14. Synthese von Protein-ähnlichen Strukturen an der Oberfläche .....	87
3.1.15. Synthese von aufgereinigten Protein-ähnlichen Strukturen durch einen mehrfachen Transfer .....	90
3.1.16. Synthese von aufgereinigten Arrays mit Protein-ähnlichen Strukturen durch einen mehrfachen Transfer .....	92
3.2. Generierung von Peptidarrays mit der cLIFT-Methode.....	95
3.2.1. Vorbetrachtungen.....	95
3.2.2. Kupplungseffizienz und repetitive Ausbeute.....	97
3.2.3. Massenspektrometrische Untersuchungen.....	100
3.2.4. Transfer und Kupplung von nicht aktivierten Aminosäuren .....	104
3.2.5. Alternative Kupplungsbedingungen .....	113
3.2.6. Modifikation von Peptidarrays mit der cLIFT-Methode .....	119
3.2.7. Click-Chemie mit der cLIFT-Methode.....	128
3.3. Synthese von Peptoiden in Arrayformat mit der cLIFT-Methode .....	132
3.3.1. Vorbetrachtungen.....	133
3.3.2. Generierung der ersten Peptoidarrays mit der cLIFT-Methode.....	136
3.3.3. Detektion der Peptoide via Massenspektrometrie.....	141
3.3.4. Peptoidsynthese nach der Submonomer-Methode mit Bromessigsäure-Aktivestern .....	143
3.3.5. Optimierung der Peptoidsynthese .....	147
3.3.6. Bestimmung der idealen Bedingungen für den Laser-Prozess .....	149
3.3.7. Monomer-Methode .....	151
4. Zusammenfassung und Ausblick .....	153
4.1. Arrays mit Protein-ähnlichen Strukturen .....	153
4.2. Generierung von Peptidarrays mit Sonderbausteinen mit einer Laser-basierten Synthesemethode.....	154
4.3. Generierung von Peptoidarrays mit einer Laser-basierten Methode.....	156
5. Experimenteller Teil .....	159
5.1. Allgemeines.....	159
5.1.1. Analytik und Geräte.....	159

5.1.2. Lösungsmittel, Reagenzien und Syntheseoberflächen.....	166
5.1.3. Präparatives Arbeiten.....	167
5.1.4. Festphasenreaktionen.....	168
5.2. Array-Design.....	168
5.3. Layouts für die cLIFT-Methode.....	171
5.4. Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	173
5.4.1. Festphasenreaktionen am Harz.....	173
5.4.2. Festphasenreaktionen auf einem Objektträger.....	176
5.5. Versuchsbeschreibungen.....	188
5.5.1. Synthesevorschriften und Charakterisierung der eingesetzten Edukte.....	188
5.5.2. Synthese und Charakterisierung der bi- und trifunktionalen Linker.....	194
5.5.3. Synthese von gereinigten Peptidarrays via Transfermethode.....	200
5.5.4. Synthese und Charakterisierung der Dipeptide via Transfermethode.....	207
5.5.5. Synthese und Charakterisierung der an der festen Phase (Harz) erzeugten Protein-ähnlichen Strukturen.....	209
5.5.6. Synthese und Charakterisierung der an der festen Phase synthetisierten Protein-ähnlichen Strukturen (Oberfläche).....	213
5.5.7. Synthese der synthetisierten Protein-ähnlichen Strukturen an der festen Phase im Arrayformat.....	217
5.5.8. Laser-basierte Synthese und Charakterisierung von Peptidarrays.....	219
5.5.9. Laser-basierte Synthese von Peptidarrays mit Sonderbausteinen auf einer PEGMA-co-MMA Oberfläche.....	221
5.5.10. Laser-basierter Transfer und Kupplung von Fluorophoren mit auf einer PEGMA-co-MMA Oberfläche.....	223
5.5.11. Laser-basierte Synthese von Sonderbausteinen auf einer PEGMA-co-MMA Oberfläche.....	227
5.5.12. Laser-basierte Darstellung von Peptoidarrays auf einer PEGMA-co-MMA Oberfläche mittels Submonomer Methode.....	229
5.5.13. Laser-basierte Darstellung und Charakterisierung von Peptoiden auf einer PEGMA-co-MMA Oberfläche.....	231

5.5.14. Laser-basierte Darstellung von Peptoidarrays auf einer PEGMA-co-MMA Oberfläche mittels der Monomer-Methode .....	235
6. Abkürzungen.....	239
7. Anhang.....	246
7.1. Lebenslauf .....	246
7.2. Publikationen.....	247
7.3. Konferenzbeiträge .....	248
7.4. Danksagungen .....	249
8. Literaturverzeichnis .....	251

# 1. Einleitung

Heutzutage entwickeln Wissenschaftler immer effizientere Methoden für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die eine wichtige Rolle spielen, um unbekannte biomolekulare Prozesse zu entschlüsseln.<sup>[1]</sup> Für diese Interaktionen ist jedoch nicht das komplette Protein verantwortlich, sondern ein Proteinfragment (Peptid bzw. Epitop) des Proteins, welches mit Hilfe von Epitopkartierungs-Techniken<sup>[2]</sup> analysiert werden kann. Es gibt drei Arten dieser Bindungsdomänen: Das lineare Epitop, das aus einer kurzen linearen Aminosäuresequenz besteht, das konformationelle Epitop, welches durch Faltung einer linearen Aminosäuresequenz entsteht, und das diskontinuierliche Epitop, das durch die Interaktion unterschiedlicher Proteindomänen gebildet wird.<sup>[3]</sup> Die Analyse der Wechselwirkungen kann über Bindungsstudien wie Phage Display<sup>[4]</sup> oder Protein/Peptidarrays<sup>[1b, 5]</sup> durchgeführt werden. Peptidarrays, die aus zahlreichen unterschiedlichen Peptidspots bestehen, erlauben eine Entschlüsselung von linearen und zyklischen Epitopen, die allerdings nur Teile der Epitop-Diversität abbilden können. Für die Analyse von häufig vorkommenden konformationellen und diskontinuierlichen Bindungsdomänen werden Proteinarrays eingesetzt<sup>[6]</sup> (Kap. 1.5.). Peptidarrays, die normalerweise aus den 20 proteinogenen Aminosäuren<sup>[7]</sup> bestehen, werden heutzutage mittels SPOT-Synthese<sup>[8]</sup> hergestellt, wobei nur hohe Dichten ( $< 10\,000$  Spots/m<sup>2</sup>) erreicht werden können, wenn gereinigte vorsynthetisierte Peptide verwendet werden. Diese Technik ist deshalb sehr kostenintensiv und ist für die Synthese von vielen identischen Arrays mit wenigen hunderten bis etwa eintausend Peptiden vorzuziehen. Aus diesem Grund werden Peptidarrays bevorzugt *in situ* generiert. Beispielsweise mittels lithographischen Methoden<sup>[9]</sup>, mittels eines Laserdruckers<sup>[10]</sup> oder einer Laser-basierten Methode, wie zum Beispiel „combinatorial Laser Induced Forward Transfer (cLIFT)“<sup>[11]</sup>, die in dieser Arbeit verwendet wurde. Dabei können je nach Methode Spotdichten bis zu einigen Millionen/cm<sup>2</sup><sup>[5d]</sup> erreicht werden. Von besonderem Interesse ist die Verwendung von Sonderbausteinen, wie zum Beispiel posttranslational veränderten Aminosäuren<sup>[12]</sup>, Peptidomimetika<sup>[13]</sup>, etc., die bis jetzt selten in der Peptidarray-Synthese verwendet werden, obwohl dadurch zusätzliche Bindungsstudien biologischer Prozesse zugänglich gemacht werden können. Des Weiteren nehmen Peptidarrays eine immer größere Rolle ein, um Bindungsstudien durchzuführen.<sup>[14]</sup> Peptide (*N*-substituierte Glycine) haben den Vorteil, dass sie eine Resistenz gegenüber enzymatischem Abbau<sup>[15]</sup>, eine bessere

## 2 Einleitung

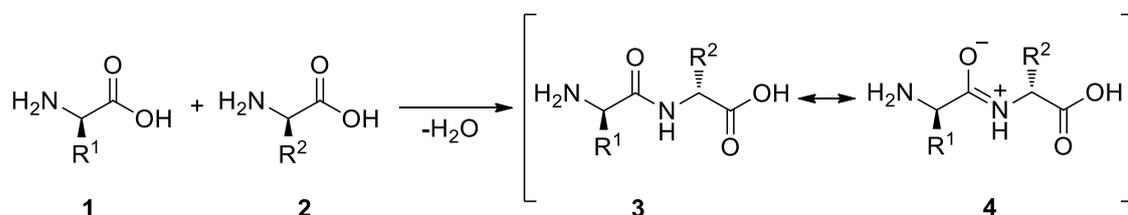
Löslichkeit und bessere Membrandurchlässigkeit besitzen.<sup>[16]</sup> Zudem konnten bereits antibiotische Aktivitäten von Peptoiden gezeigt werden, sodass Peptoide vielversprechend für klinische Studien sind.<sup>[14a, 17]</sup> Hochdichte Peptoidarrays werden meistens nach gegenwärtigem Stand der Technik nur aus vorsynthetisierten Peptoiden mittels Spotting-Verfahren<sup>[18]</sup> angefertigt, sodass hohe Kosten pro Peptoid entstehen. Dabei können die Peptoide z.B. mittels der Submonomer-Methode von Zuckermann<sup>[19]</sup> oder der Monomer-Methode<sup>[20]</sup>, die analog der *9H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl (Fmoc)-Festphasensynthese<sup>[21]</sup> durchgeführt wird, hergestellt werden. Eine weitere Möglichkeit ist eine arbeitsintensive lithographische Methode<sup>[22]</sup>, die theoretisch Spotdichten von ca. < 6 000 Peptoiden/cm<sup>2</sup> erlauben könnte. Von großem Interesse ist deshalb die Entwicklung neuer, hochdichter und kostengünstiger Peptoidarrays, um Bindungsstudien im Hochdurchsatzverfahren durchzuführen zu können.

Für die Synthese von Proteinarrays sind zahlreiche Verfahren bekannt. Die häufigste Methode ist das Spotten bereits exprimierter und gereinigter Proteine, wobei nur geringe Spotdichten erreicht werden können.<sup>[1a]</sup> Die Herstellung von Proteinarrays im Vergleich zu Peptidarrays ist wesentlich aufwendiger und somit kostenintensiver, weshalb sogenannte „protein-mimetic“-Arrays, die proteinähnliche Strukturen enthalten, von großem Interesse sind.<sup>[3, 23]</sup>

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf neue Synthesemöglichkeiten für Peptidarrays mit Sonderbausteinen, Peptoidarrays und Arrays proteinähnlicher Moleküle gelegt, um hochdichte Arrays mit guten Ausbeuten zu synthetisieren, die neue Bindungsstudien ermöglichen sollten.

## 1.1. Peptide und Proteine

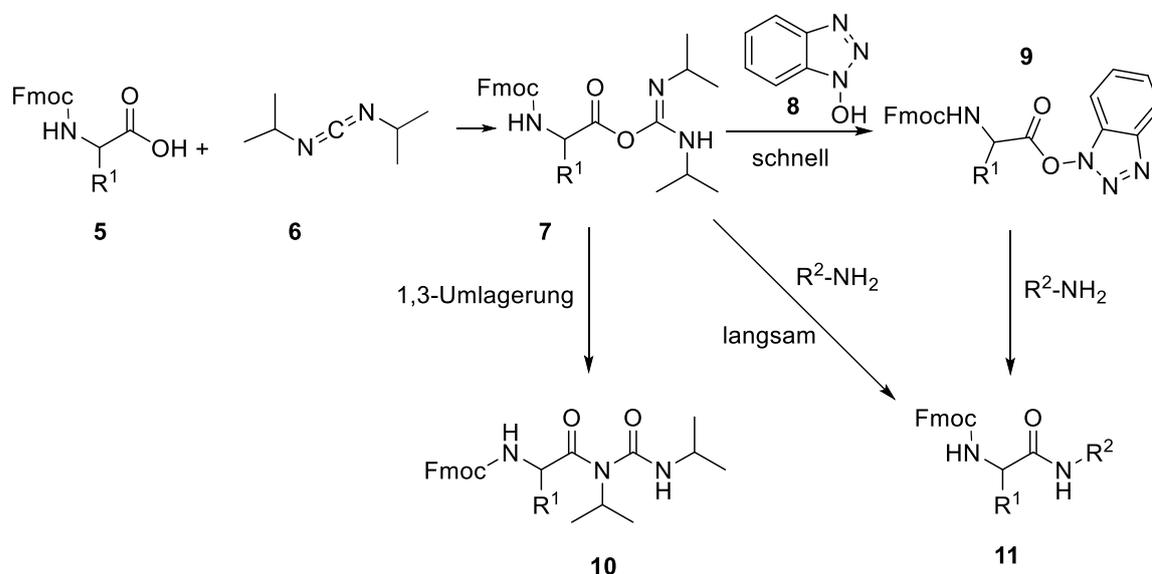
Peptide und Proteine spielen eine wichtige Rolle in unserem Organismus. Beispielsweise fungieren sie als Strukturelemente (z.B. Actin-Filamente<sup>[24]</sup>) oder als Transporter (z.B. Hämoglobin<sup>[25]</sup>). Sie schützen uns vor Mikroorganismen (z.B. Antikörper) und spielen eine wichtige Rolle bei der Energieversorgung.<sup>[26]</sup> Seit Beginn des 20. Jahrhunderts ist bereits bekannt, dass Peptide und Proteine aus Aminosäuren, die über eine Peptidbindung (Amidbindung) verknüpft sind, bestehen.<sup>[27]</sup> Der Unterschied zwischen einem Peptid und Protein ist ihre Kettenlänge (Protein > 50 Aminosäuren).<sup>[28]</sup> In der Natur sind 20 proteinogene Aminosäuren, zu den zahlreichen weiteren existierenden (> 100), vertreten.<sup>[28-29]</sup> Die gemeinsamen Merkmale der Aminosäuren sind die Aminogruppe (N-Terminus) und die Carboxylgruppe (C-Terminus). Die Aminosäuren differenzieren sich durch ihre Seitenkette (R), welche die chemischen und physikalischen Eigenschaften bestimmt. Die Eigenschaften von Peptiden werden durch die Aminosäuren und ihre Reihenfolge (Sequenz) bestimmt (Primärstruktur). Polypeptide können stabile Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen ausbilden. Zudem sind sie flexibel und können zahlreiche Konformationen, auf Grund von Drehungen um ihre Einzelbindungen und der möglichen Wechselwirkungen (elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken etc.), eingehen (Tertiärstruktur). Die Ausbildung von Proteinkomplexen von Polypeptiden oder Proteinen wird Quartärstruktur genannt.<sup>[26, 28]</sup> Alle  $\alpha$ -Aminosäuren, mit Ausnahme von Glycin, sind chiral (L- und D-Aminosäuren). In der Natur kommen hauptsächlich L-Aminosäuren vor,<sup>[28]</sup> um Peptide und Proteine aufzubauen. Eine Peptidbindung<sup>[27]</sup> wird gebildet, indem die Carboxy-Gruppe einer Aminosäure **1** mit der Aminogruppe einer anderen Aminosäure **2** unter der Abspaltung von Wasser reagiert (Schema 1).<sup>[26]</sup>



**Schema 1:** Bildung einer Peptidbindung und Darstellung der beiden Resonanzstrukturen.

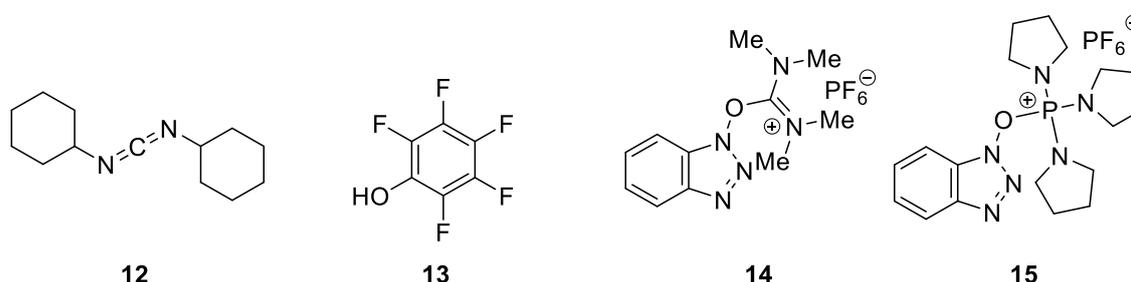
## 1.2. Chemische Peptid-Synthese

In der Natur werden Peptide bzw. Proteine in einem fünf stufigen Prozess im Ribosom unter der Verwendung zahlreicher Enzyme gebildet.<sup>[26]</sup> Die chemische Synthese ist hingegen auf Peptide mit bis zu 50 Aminosäuren beschränkt.<sup>[30]</sup> Diese müssen zudem modifiziert eingesetzt werden: 1) Verwendung von Schutzgruppen, da Aminosäuren mehrere funktionelle Gruppen tragen und somit unkontrolliert miteinander reagieren würden. Das Amin der Aminosäure wird beispielsweise in der Fmoc-Schutzgruppenstrategie<sup>[31]</sup> mit der basenlabilen temporären Fmoc-Schutzgruppe<sup>[32]</sup> geschützt. Die funktionellen Gruppen der Seitenketten, die ebenfalls geschützt werden müssen, werden hingegen mit säurelabilen Schutzgruppen z.B. *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) für Amine<sup>[33]</sup> oder *tert*-Butyl (tBu) für Carboxy-Gruppen geschützt, um alle Seitenketten-Schutzgruppen am Ende einer Peptidsequenz orthogonal abspalten zu können und 2) Aktivierung der Carboxy-Gruppe für eine Synthese, da sie mit Aminen bei Normbedingungen Ammoniumcarboxylate bilden, die erst bei höheren Temperaturen zu Amiden umgesetzt werden können, wobei zahlreiche Nebenreaktionen stattfinden würden. Zur Aktivierung können Diimide wie z.B. *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) (**6**) oder *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (**12**)<sup>[34]</sup> eingesetzt werden.



**Schema 2:** Carbodiimid-Aktivierung unter Verwendung von DIC (**6**) und HOBt (**8**) zur Generierung einer Peptidbindung.<sup>[35]</sup>

Zuerst reagieren die freie Säure (COOH) der Aminosäure **5** und das Carbodiimid **6** zu einem O-Acylisoharnstoff **7**, der abschließend mit einem Amin eine Peptidbindung ausbildet. Es handelt sich jedoch um eine langsame Reaktion, sodass eine 1,3-Umlagerung zu einem *N*-Acylisoharnstoff **8** als Nebenreaktion stattfinden kann. Zur Unterdrückung der unerwünschten Nebenreaktion, kann der gebildete Acylisoharnstoff **7** zu einem Aktivester<sup>[36]</sup>, wie Pentafluorphenyl-(OPfp)-ester, Hydroxybenzotriazolyl-(HOBt)-ester (**9**)<sup>[35, 37]</sup> umgesetzt werden, der mit dem Amin und Bildung einer Peptidbindung reagiert (Schema 2). In den 1970ern wurden weitere hochreaktive Aktivierungsreagenzien, beispielsweise Uroniumsalze<sup>[38]</sup> wie O-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphat (HBTU) (**14**)<sup>[39]</sup> oder Phosphoniumsalze<sup>[40]</sup> wie (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat (PyBOP) (**15**)<sup>[41]</sup> entwickelt (Abbildung 1). Ein weiterer Nachteil der chemischen Peptidsynthese ist eine unerwünschte Racemisierung, die in der Natur nicht vorkommt.<sup>[26, 35]</sup> Eine Möglichkeit diese Racemisierung zu unterdrücken, ist die Verwendung von HOBt (**8**)<sup>[42]</sup> unter der Verwendung von Uroniumsalzen/Phosphoniumsalzen.



**Abbildung 1:** *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (**12**), Pentafluorphenol (**13**), O-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat (HBTU) (**14**), (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat (PyBOP) (**15**).

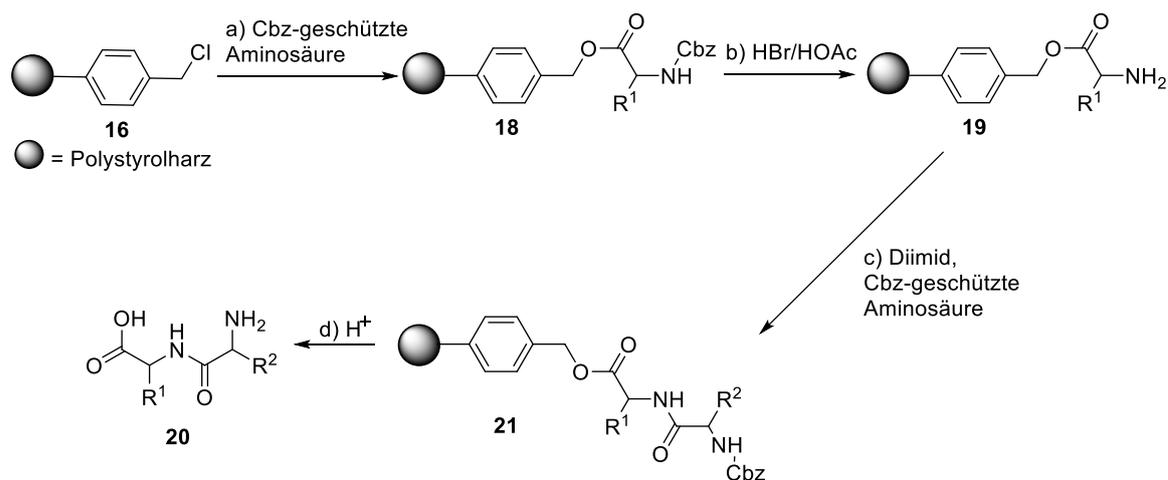
### 1.3. Festphasenchemie

Früher war die Synthese von Peptiden in flüssiger Phase aufgrund der benötigten Reinigungsschritte sehr zeit- und kostenintensiv. In den 1980ern wurden immer mehr Hochdurchsatz-Screening Methoden zugänglich, um Moleküle zu testen, sodass neue schnelle und effiziente Synthesemöglichkeiten benötigt wurden.<sup>[28]</sup> Im Jahre 1984 erhielt deshalb der Wissenschaftler R. B. Merrifield den Nobelpreis für das von ihm im Jahre 1963 entwickelte Verfahren zur Synthese von Peptiden aus Aminosäuren an fester Phase

## 6 Einleitung

(Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)), das den Beginn der kombinatorischen Synthese darstellt.<sup>[43]</sup> Ein Trägermaterial aus Polystyrol, an dem Chlorbenzyl-Gruppen (**16**) angebracht sind, dient als feste Phase. Diese funktionellen Gruppen fungieren als Linker, um eine kovalente Bindung zwischen Harz und Molekül zu ermöglichen. Dadurch ist es möglich, gewünschte Modifikationen an einem immobilisierten Substrat durchzuführen und anschließend durch Einsetzen der geeigneten Abspaltungsreagenzien und anschließender Filtration das Produkt selektiv vom Harz abzuspalten (Schema 3).<sup>[44]</sup> Eine abschließende Aufreinigung kann beispielsweise chromatographisch erfolgen.

Ein großer Vorteil gegenüber der Flüssigphase sind die einfachen Aufarbeitungsschritte und Möglichkeit zur Automatisierung der Synthesesequenz. Heutzutage ist die Festphasenchemie eine gängige Synthesemethode und findet hauptsächlich in der Peptidsynthese und in der kombinatorischen Chemie Anwendung.<sup>[43b]</sup>



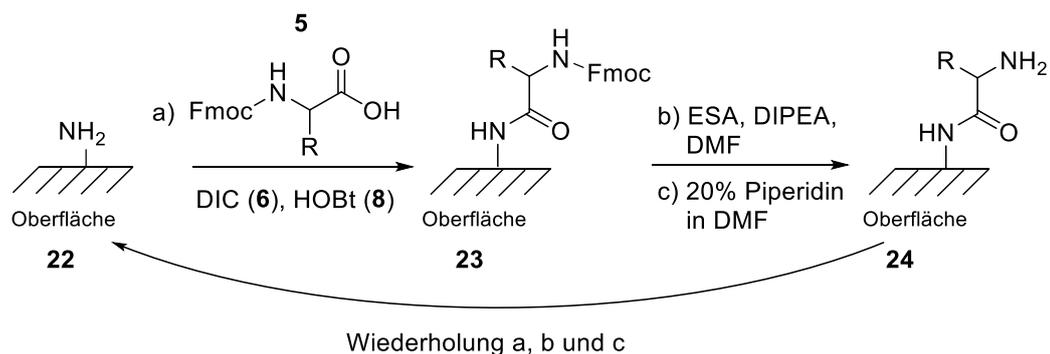
**Schema 3:** Schema der Festphasensynthese.<sup>[43a]</sup> (a) Anbindung einer Aminosäure an das Harz. (b) Abspaltung der Benzyloxycarbonyl (Cbz)-Schutzgruppe via Bromwasserstoff (HBr) und Essigsäure (HOAc). (c) Diimid vermittelte Acylierung. (d) Säurelabile Abspaltung des Peptids **20** vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung der Schutzgruppe.

## 1.4. Peptidarrays

Die Peptidsynthese via SPPS ermöglicht es große Mengen an unterschiedlichen Peptiden zu synthetisieren. Die verwendeten polymeren Träger sind jedoch nicht für Hochdurchsatz-Screenings, wie die Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen, geeignet.

Die Erfindung der SPOT-Synthese<sup>[8]</sup> für die Generierung von Peptidarrays durch R. Frank machte es möglich, räumlich adressiert Peptidsequenzen *in situ* an einer Oberfläche aufzubauen und diese anschließend direkt für biologische Studien zu nutzen.

Die unterschiedlichen, aktivierten Aminosäuren **5** werden in einem Lösungsmittel auf die Oberfläche (z.B. aminofunktionalisierte Cellulose) in einem gewünschten Muster gespottet. Das polymergebundene Peptid **24** wird dann nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie aufgebaut (Schema 4). Sobald die gewünschte Kettenlänge erreicht ist, werden die säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen der Aminosäure abgespalten, um die Peptidarrays für biologische Studien zugänglich zu machen.



**Schema 4:** SPOT-Synthese. (a) Spotting der Aminosäure **5**, die mit DIC (**6**) und HOBt (**8**) aktiviert wird, in Dimethylformamid (DMF) auf die Oberfläche, (b) Acetylierung der noch freien Amine mit Essigsäureanhydrid (ESA), Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (c) Fmoc-Entschützung via 20% Piperidin in DMF (v/v).

Der *in situ* Aufbau von Peptidarrays ermöglicht jedoch lediglich 25 Peptide/cm<sup>2</sup>. Durch die Weiterentwicklung der Methode sind heutzutage Spotdichten > 700 Peptide (Preis pro Peptid 1 – 25 Euro) pro Array zugänglich. Als Alternative um größere Spotdichten zu erreichen, können auch gereinigte, vorsynthetisierte Peptide auf eine Oberfläche gespottet werden.

In den letzten Jahren wurden weitere *in situ* Peptidarray-Synthesemethoden entwickelt, um noch höhere Spotdichten zu erreichen. Die höchsten Spotdichten größer als

## 8 Einleitung

1 Million/cm<sup>2</sup><sup>[5d]</sup> wurden mit lithographischen Methoden zugänglich gemacht. S. Fodor<sup>[9a]</sup> entwickelte bereits 1991 dieses Verfahren. Dazu wurden die Aminosäuren mit einer photolabilen Schutzgruppe versehen. Durch die Verwendung von teuren Masken können die immobilisierten Aminosäuren gezielt entschützt werden und abschließend aus Lösung eine weitere Aminosäure an die entschützte angeknüpft werden. Bei dieser Methode müssen die 20 verschiedenen Aminosäuren jedoch nacheinander aufgebracht und gekuppelt werden, sodass die Methode sehr zeit-intensiv ist. Die Firma LC Sciences<sup>[45]</sup> kommerzialisierte diese Methode.

Ein weiteres kommerzielles Verfahren der Firma PEPperPRINT<sup>[46]</sup>, das Peptidarrays von ~800 Peptiden/cm<sup>2</sup> zugänglich macht, nutzt die Verwendung eines Laserdruckers.<sup>[10]</sup> Die Methode hat den Vorteil, dass alle 20 proteinogenen Aminosäuren gleichzeitig abgelagert und abschließend gekuppelt werden können. Dabei werden die Aminosäuren in Form von Aminosäuren-Tonerpartikeln auf eine Oberfläche gedruckt. Die Partikel bestehen hauptsächlich aus einer voraktivierten Fmoc-geschützten Aminosäure (OPfp-Ester) und einem Polymer, das als festes Lösungsmittel und Matrixmaterial fungiert. In einem separaten Ofenschritt wird das Polymer viskos und erlaubt dann die Diffusion und Kupplung der Aminosäuren an die freien Amine der Oberfläche. Abschließend wird die Oberfläche acetyliert, um noch vorhandene freie Amine zu blockieren. Abschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Für die Herstellung der verwendeten Tonerpartikeln werden hohe Materialmengen benötigt, sodass teure Sonderbausteine für diese Methode nicht geeignet sind.

Eine weitere Möglichkeit für die Synthese von Peptidarrays ist die Laser Fusions-Methode von Märkle *et al.* die Spotdichten von bis zu 40 000 Peptiden pro cm<sup>2</sup> ermöglicht. Hierbei werden 20 verschiedene Sorten Aminosäurepartikel hintereinander auf einem Array positioniert und fixiert, bevor sie im Ofen an die Oberfläche gekuppelt werden. Diese Methode hat den Nachteil, dass die Partikelpositionierung und Fixierung sehr zeitintensiv sind, da sie für jede Aminosäure einzeln erfolgen muss.

Ein weiteres Laser-basierendes Verfahren, die sogenannte *combinatorial Laser-induced forward transfer* (cLIFT)-Methode, wurde von Loeffler und Foertsch *et al.*<sup>[11]</sup> 2016 präsentiert. Hierbei wurde die 1986 entwickelte LIFT-Methode<sup>[47]</sup> ausgenutzt. Laserphotonen lösen hierbei kleine Materialmengen aus einer Schicht (Donor) heraus und übertragen es auf einen Akzeptor.<sup>[48]</sup> Das Verfahren wird in Abschnitt 1.4.1.

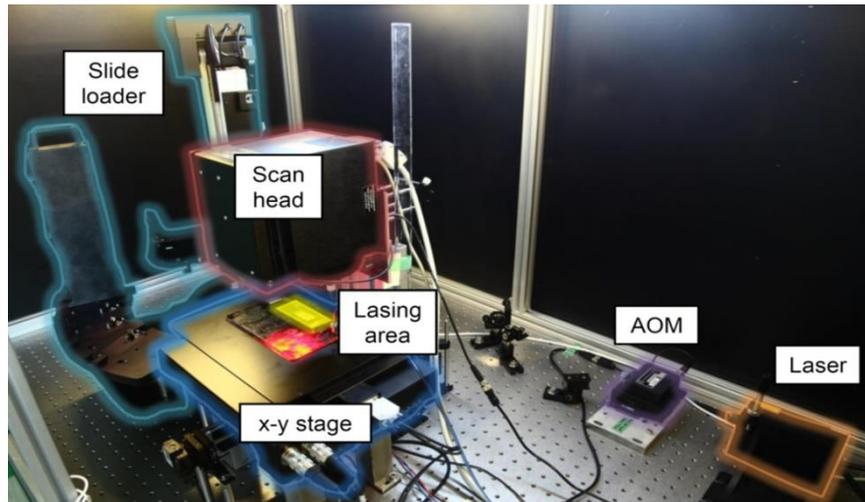
näher beschrieben. Hochdichte Peptidarrays mit Spotdichten von  $\sim 18\,000$  Spots/cm<sup>2</sup> können hierbei erreicht werden.

Peptidarrays besitzen ein breites Anwendungsspektrum. Sie werden in den Material- und Lebenswissenschaften angewendet. Beispielsweise zur Erkennung von Bindungsmotiven von monoklonalen und polyklonalen Serumantikörpern (Immunosignaturing, siehe 1.9.)<sup>[5a, 5c, 5d]</sup>, zur Entschlüsselung von Enzymaktivitäten<sup>[49]</sup>, zur Früherkennung von Krankheiten<sup>[50]</sup>, zur Detektion von Autoantigenen<sup>[51]</sup>, zur Entwicklung neuer Medikamente<sup>[52]</sup> oder sogar für Zellbindungsstudien.<sup>[53]</sup>

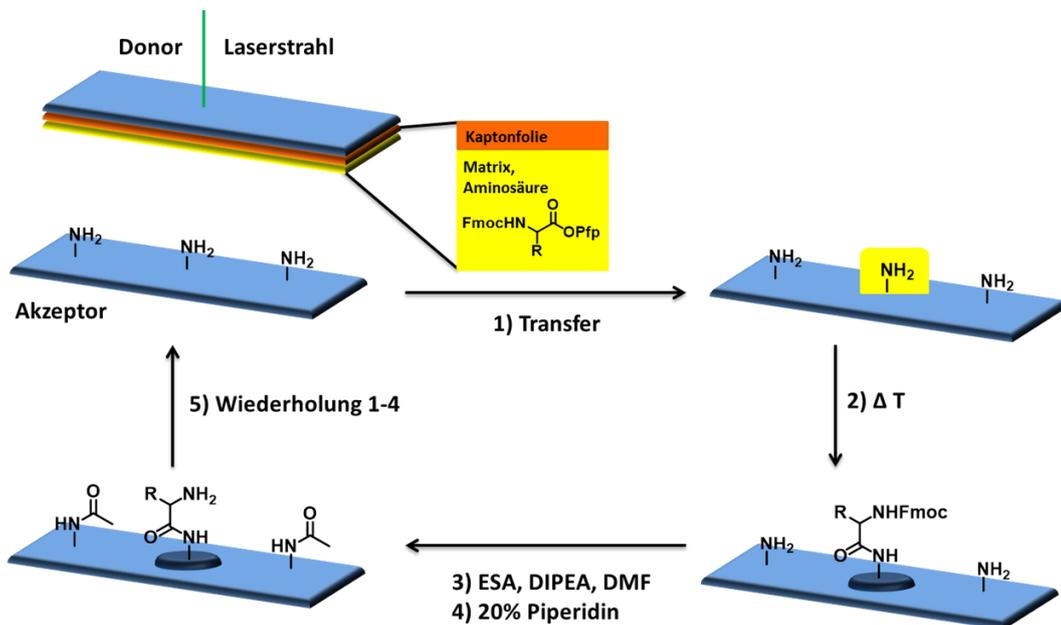
### 1.4.1. Combinatorial Laser-induced forward transfer (cLIFT)

Für die Generierung von Peptidarrays mit der LIFT-Technologie<sup>[11]</sup>, werden Objektträger, die mit einer selbstklebenden und lichtabsorbierenden Kaptonfolie beklebt sind eingesetzt. Diese sogenannten Donoren werden mittels Rotationsbeschichtungs-Verfahren (Spin Coating) mit einer Mischung aus der Polymermatrix (modifiziertes Styrol-co-Acryl-Polymer) und einer voraktivierten Aminosäure (OPfp-Aktivierung) beschichtet. Diese Donoren können bis zu zwanzigmal wiederverwendet werden.<sup>[11]</sup> In dem cLIFT-Aufbau (Abbildung 2) wird ein Donor mit der beschichteten Seite auf eine Akzeptor-Oberfläche mit freien funktionellen Gruppen (Aminen) gelegt und mit Hilfe eines Laserstrahl (532 nm) werden Matrixmaterial und die Aminosäure auf den Akzeptor transferiert (Dicke: 1.00 – 50.0 nm (1.00 – 500 pg)).<sup>[11]</sup>

Dabei können Spotabstände (*Pitches*) größer als 75  $\mu\text{m}$  erzeugt werden. In einem separaten Kupplungsschritt im Ofen bei 90° C wird die Matrix viskos, sodass die Diffusion und Kupplung der Aminosäuren ermöglicht wird (Abbildung 3). Ein großer Vorteil dieser Methode ist das Aufbringen der 20 proteinogenen Aminosäuren, bevor die Kupplung an den Syntheseträger stattfindet. Es werden außerdem nur sehr geringe Materialmengen benötigt, sodass zahlreiche weitere Aminosäuren in die Arrays eingebaut werden können.



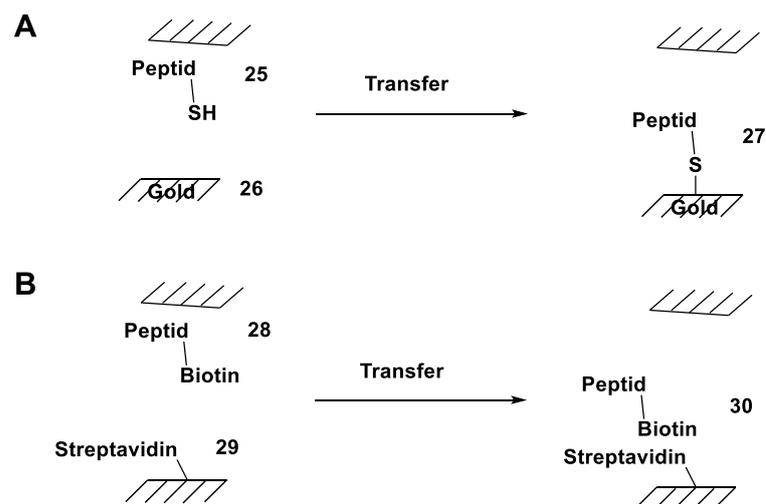
**Abbildung 2:** cLIFT-Aufbau. Der Lasertransfer wird auf der sogenannten „x-y stage“ durchgeführt. Ein Roboter (Slide loader) ermöglicht es die Oberflächen (Akzeptor und Donor) vollautomatisch in die Maschine einzulegen. Der Laserstrahl wird mit Hilfe eines Akustooptischer Modulators (AOM) reguliert und in ein „Scan head-System“ geführt, um den Materialtransfer durchzuführen. Reproduziert unter CC-BY, Loeffler and Foertsch et al.<sup>[11]</sup>



**Abbildung 3:** cLIFT-Verfahren. (1) Transfer einer Aminosäure auf einen Akzeptor (10:90 Polyethylenglykoldimethacrylat (PEGDMA)-co-Methylmethacrylat (MMA)-Oberfläche verestert mit einem  $\beta$ -Alanin mit freien Aminen). (2) Bildung der Peptidbindung im Ofenschritt ( $\Delta$  = Temperatur). (3) Acetylierung der noch freien Amine mittels ESA, DIPEA in DMF. (4) Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe via 20% Piperidin in DMF (v/v). (5) Wiederholung der Schritte 1 – 4 bis zur gewünschten Kettenlänge.

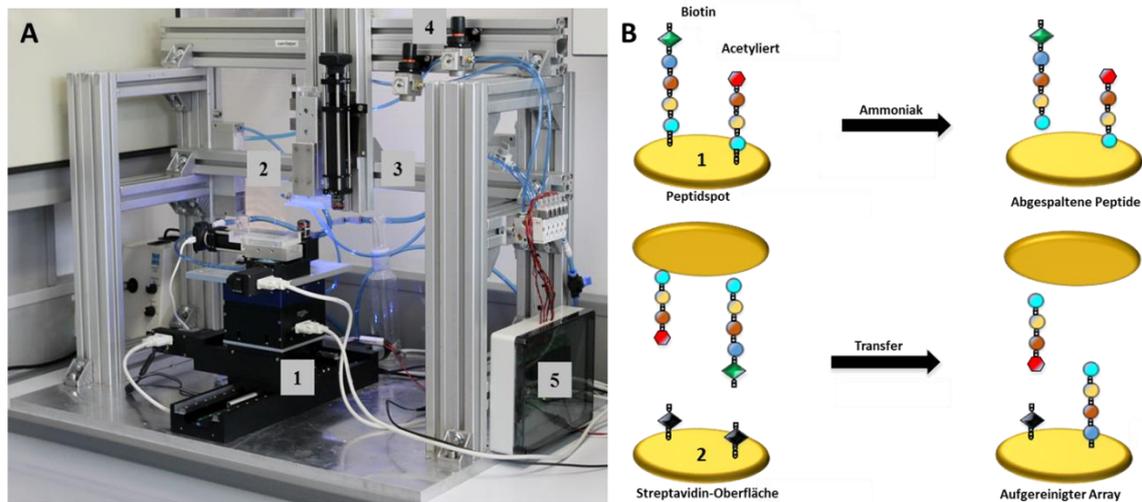
### 1.4.2. Reinigungsmethoden für Peptidarrays

Peptidarrays, die *in situ* an der festen Phase erzeugt werden, haben das Problem, dass mit steigender Peptidlänge eine immer größere Anzahl von Abbruchsequenzen entsteht. Je nach Peptidsequenz konnten Ausbeuten von 40% –> 92 % in der SPOT-Synthese<sup>[54]</sup> erreicht werden. In biologischen Anwendungen können diese Peptidartefakte jedoch zu „falschen“ positiven oder negativen Signalen führen. Aus diesem Grund werden Methoden gesucht, um diese Arrays aufzureinigen.<sup>[54a]</sup> Peptidarrays wurden bereits über zeitintensive mehrstufige Prozesse aufgereinigt.<sup>[55]</sup> Erstmals wurde 2013 von Schirwitz *et. al*<sup>[54a]</sup> eine Methode beschrieben, um Peptidarrays in einem Schritt schnell und effizient aufzureinigen. Hierbei wird ein *in situ* synthetisierter Array auf eine goldbeschichtete Membran ortsaufgelöst transferiert und gekuppelt, wobei nur vollsynthetisierte Peptide, die endständig ein Thiol tragen, transferiert werden können (Schema 5A). Ein großer Nachteil dieser Methode ist jedoch die zeitgleiche Abspaltung der Schutzgruppen der Peptide, da ein säurelabiler Rink-Amid-Linker verwendet wird, um die Peptide während des Transfervorganges abzuspalten. Zudem werden Cysteine innerhalb einer Sequenz nicht toleriert und müssen orthogonal geschützt werden. Ein weiterer großer Nachteil ist die Verwendung von Gold, das Quenchingeffekte während einer fluoreszenzbasierten Detektion, die eine Standardmethode in der Biologie darstellt, auslösen kann.<sup>[56]</sup>



**Schema 5:** (A) Peptidtransfer via Thiol/Gold. (B) Peptidtransfer via Biotin/Streptavidin.

Um diese Nachteile zu beheben, präsentierte Stiffler und Mattes *et al.* eine neue Methode, um Peptidarrays zu transferieren.<sup>[57]</sup> Hierbei werden die *in situ* generierten Arrays, die am *N*-Terminus ein Biotin tragen mit Hilfe von Ammoniak von einer esterhaltigen Oberfläche abgespalten und auf eine Streptavidin-immobilisierte Akzeptoroberfläche mit Hilfe einer Transfermaschine transferiert (Schema 5B, Abbildung 4).



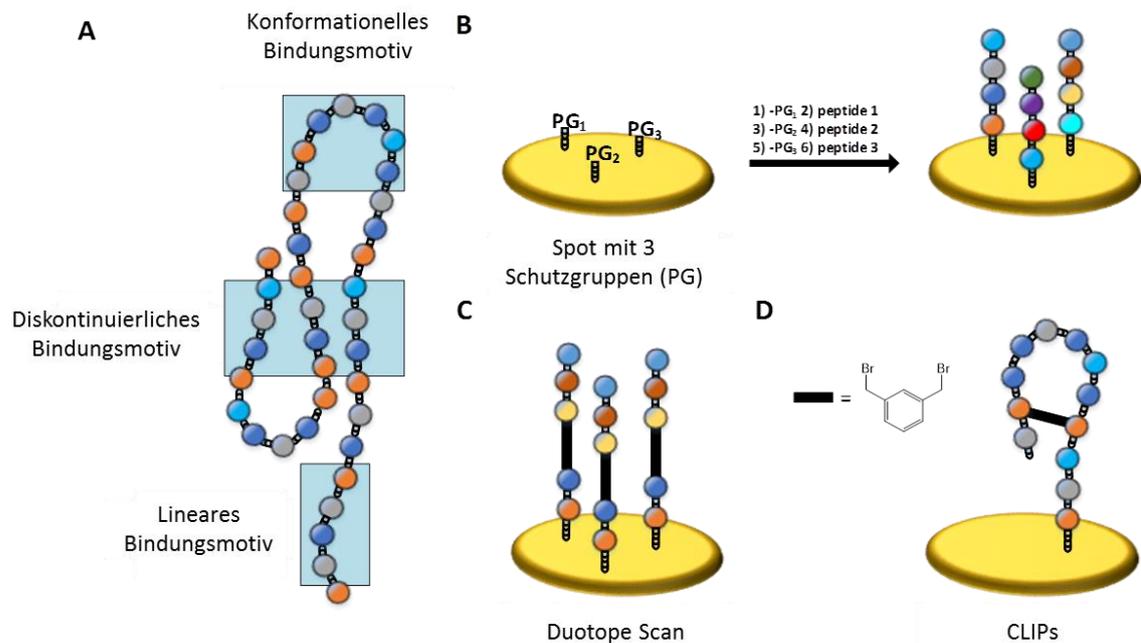
**Abbildung 4:** (A) Transfermaschine. Stiffler und Mattes *et al.*; Reproduziert mit einer Genehmigung von Chemnanomat. 1) Vakuumgreifer für die Akzeptoroberfläche. 2) Vakuumgreifer für die Donoroberfläche 3) Vorrichtung zur möglichen Installation eines Kamerasystems zur Positionierung. 4) Zwei Druckventile um die Transferkraft anzupassen 5) Kontrolleinheit, die an einen Computer angeschlossen ist. (B) Prinzip der Erzeugung von aufgereinigten Peptidarrays (Replikate) 1) Abspaltung der Peptide 2) Transfer der Peptide, die am *N*-Terminus ein Biotin tragen, auf eine Streptavidin-Oberfläche.<sup>[57]</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass aus einem Peptidarray, bis zu 15 Peptidreplikate hergestellt werden konnten. Diese Arrayreplikate wurden jedoch bis jetzt noch nicht in biologischen Anwendungen eingesetzt.

## 1.5. Proteinarrays und Arrays mit Protein-ähnlichen Strukturen

Die ersten Proteinarrays, mit Tausenden von Proteinen, wurden von Büsow *et al.* generiert, indem Bakterienklone gespottet wurden, die ungereinigte Proteinfragmente von cDNA Bibliotheken exprimierten.<sup>[6]</sup> Der Nachteil dieser Methode ist jedoch die unterschiedliche Expressionsausbeute jedes Peptidfragments und der große Hintergrund

der bakteriellen Proteine. Für die kommerziell erhältlichen Protein-Arrays<sup>[58]</sup> werden jedoch üblicherweise die Proteine zuerst exprimiert, aufgereinigt und dann an einem Träger immobilisiert. Proteinarrays ermöglichen es konformationelle und diskontinuierliche Bindungsmotive zu untersuchen, die mit Standard-Peptidarrays nur bedingt zugänglich sind (Abbildung 5). Beispielsweise können zirkuläre Peptide konformationelle Bindungsmotive nachahmen.<sup>[46]</sup>



**Abbildung 5:** (A) Darstellung der drei möglichen Bindungsmotive. (B) Immobilisierung mehrere Peptide in einem Spot. (C) Duotope-Scan, (D) CLIPs-Technologie.

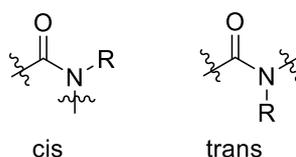
Sie können beispielsweise genutzt werden, um Autoimmunkrankheiten<sup>[49b]</sup> oder Infektionskrankheiten<sup>[59]</sup> zu untersuchen oder neue Medikamente zu entwickeln.

Für die Untersuchung von konformationellen Bindungsmotiven oder die gleichzeitige Interaktion von mehreren Epitopen sind sie jedoch nicht wirklich geeignet (Abbildung 5A). Deshalb wurden peptid-basierte Arrays entwickelt, die Protein-ähnliche Strukturen nachahmen können. Die *in situ* hochdichte „protein mimetic“ Synthese bringt jedoch das Problem der Abbruchsequenzen, das in Abschnitt 1.4.2. beschrieben wird, mit sich. In diesen Methoden wird versucht ein Peptid bzw. Peptide so zu positionieren, dass sie miteinander interagieren können um sekundäre oder tertiäre Strukturen aufbauen können. Espanel *et al.*<sup>[23a]</sup> entwickelt eine Methode, die 2 – 4 Peptide in einem Spot zugänglich macht, um Peptid-Peptid-Interaktionen zu studieren (Abbildung 5B). Dabei werden 2 – 4

orthogonale Schutzgruppen verwendet, um die Peptide nach einer Abspaltung der Schutzgruppen hintereinander aufzubauen. Jedoch lässt diese Methode nicht die nötige Nähe der Peptide, um Protein-ähnliche Strukturen nachzuahmen, zu. Hoffmüller *et al.*<sup>[23b]</sup> entwickelte die Duotope-Scan-Methode, die es ermöglicht, konformationelle Bindungsmotive zu untersuchen (Abbildung 5C). Dabei werden zwei Peptide über einen Linker in eine bestimmte Distanz (Abstand in der nativen 3D-Struktur) gebracht, um die benötigte Flexibilität zur Erzeugung von protein-ähnlichen Strukturen zu erlangen. Der Nachteil dieser Methode ist die verwendete SPOT-Synthese, die es nicht möglich macht hochdichte Arrays *in situ* mit einer Aufreinigung der Peptide zu erzeugen. Eine weitere Möglichkeit stellt die CLIPs-Technologie dar, mit der konformationelle und diskontinuierliche Bindungsmotive untersucht werden können (Abbildung 5D). Ein Benzylbromid Linker, der mit Thiolen reagieren kann, zwingt die Peptide dabei in die richtige Konformation.<sup>[3]</sup> Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass zusätzliche orthogonale Schutzgruppen für die Thiole, die nicht reagieren sollen, eingesetzt werden müssen. Zudem können auch hier keine aufgereinigten *in situ* synthetisierten Peptidarrays erhalten werden.

## 1.6. Peptoide

Peptoide (*N*-alkylierten Glycin-Oligomere)<sup>[19]</sup>, sind den Peptiden topologisch sehr ähnlich. Jedoch unterscheiden sie sich an der Verschiebung der Seitenkette (R = Rest) vom  $\alpha$ -Kohlenstoff auf den Stickstoff (Abbildung 6).



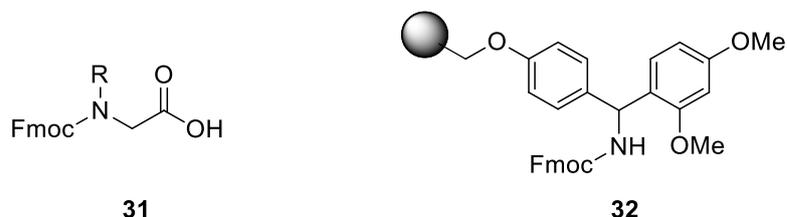
**Abbildung 6:** Strukturausschnitt eines Peptoids mit der cis- und trans-Amidbindung.<sup>[60]</sup>

Peptoide sind aus diesem Grund am  $\alpha$ -Kohlenstoff nicht chiral und können dort keine Wasserstoffbrücken ausbilden. Trotzdem sind Peptoidsequenzen in der Lage sehr stabile Konformationen<sup>[61]</sup>, via elektrostatischer Wechselwirkungen und des sterischen Anspruchs der Seitenketten<sup>[62]</sup> auszubilden. Beispielsweise wurden Peptoid-Nanosheets mit funktionellen Schleifen entdeckt, die Antikörper nachahmen können.<sup>[63]</sup> Aufgrund ihrer

Peptid-ähnlichen Struktur sind sie in der Lage Peptide nachzuahmen und zählen deshalb zur Gruppe der Peptidomimetika.<sup>[13a, 64]</sup> Peptoide werden in zahlreichen diagnostischen, therapeutischen Anwendungen<sup>[14b, 17, 65]</sup> bereits eingesetzt, um Peptide zu ersetzen, da sie im Vergleich zu Peptiden den Vorteil einer Resistenz gegenüber enzymatischem Abbau<sup>[15]</sup>, eine bessere Löslichkeit und Zellmembranpermeabilität<sup>[16]</sup> besitzen. In zahlreichen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Peptoide zudem als bioaktive Verbindungen, beispielsweise antibiotische Peptoide<sup>[17]</sup> oder Transkriptionsfaktoren<sup>[66]</sup>, fungieren können. Peptoide können in flüssiger Phase synthetisiert werden, jedoch sind hier aufwendige Reinigungsschritte notwendig. Als eine alternative Methode kann die Festphasensynthese genutzt werden. Hierbei wird zwischen der Monomer-<sup>[20]</sup> (1.6.1.) und der Submonomer-Methode<sup>[67]</sup> (1.6.2.) unterschieden.

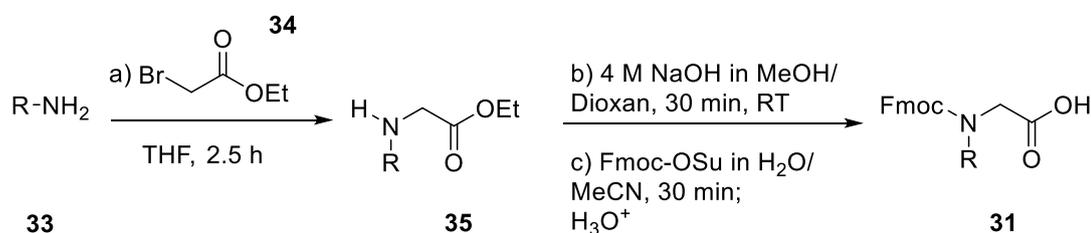
### 1.6.1. Monomer-Methode

Bei der Monomer-Methode werden Monomere, *N*-geschützte, *N*-alkylierte Glycine (**22**)<sup>[19]</sup>, analog der Merrifield-Synthese von Peptiden an die feste Phase angebunden (Abbildung 6). Die Monomere tragen an ihrem Amino-Terminus eine Fmoc-Schutzgruppe und eventuell eine geschützte Seitenkette (Abbildung 7). Ein Peptoid wird aufgebaut in dem zunächst das Monomer über eine Amidbindung z.B. an das Rink-Amid-Harz (**32**) mittels eines Carboxylat-Aktivierungsreagenz (z.B. DIC (**6**)) angeknüpft wird. Anschließend erfolgt die Abspaltung der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe und ein weiteres Monomer wird mittels DIC-vermittelter Acylierung an den neuen Amino-Terminus angeknüpft.<sup>[20]</sup> Diese Schritte werden bis zum Erreichen der gewünschten Kettenlänge wiederholt, die Schutzgruppen der Seitenketten entfernt und das Produkt von dem polymeren Träger abgespalten.



**Abbildung 7:** Fmoc-*N*-alkyliertes Glycin **31**<sup>[20]</sup> und Fmoc-Rink-Amid-Harz (**32**).<sup>[68]</sup>

Die Methode hat den Vorteil, dass eine Reaktionskontrolle durchgeführt werden kann. Nach der Fmoc-Entschützung mit Piperidin, kann die Absorption des gebildeten Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes spektrometrisch ermittelt werden (Abschnitt 1.9.).<sup>[10]</sup> Ein Monomerbaustein kann beispielsweise in drei Reaktionsschritten synthetisiert werden. Zuerst reagiert das Amin **3** mit dem Bromessigsäureethylester **34** in einer nucleophilen Reaktion. Durch eine Verseifung des Esters **35** und eine Schützung mit Fmoc-OSuccinimid (Fmoc-OSu) wird das Monomer **31** zugänglich. (Schema 6). Auf Grund der existierenden Aminen (> 10 000<sup>[61b]</sup>) ist die Methode aufgrund der aufwendigen Synthese der Monomere aus den zahlreichen Aminen jedoch nicht weitverbreitet und wurde später durch die Submonomer-Methode<sup>[19]</sup> ersetzt.

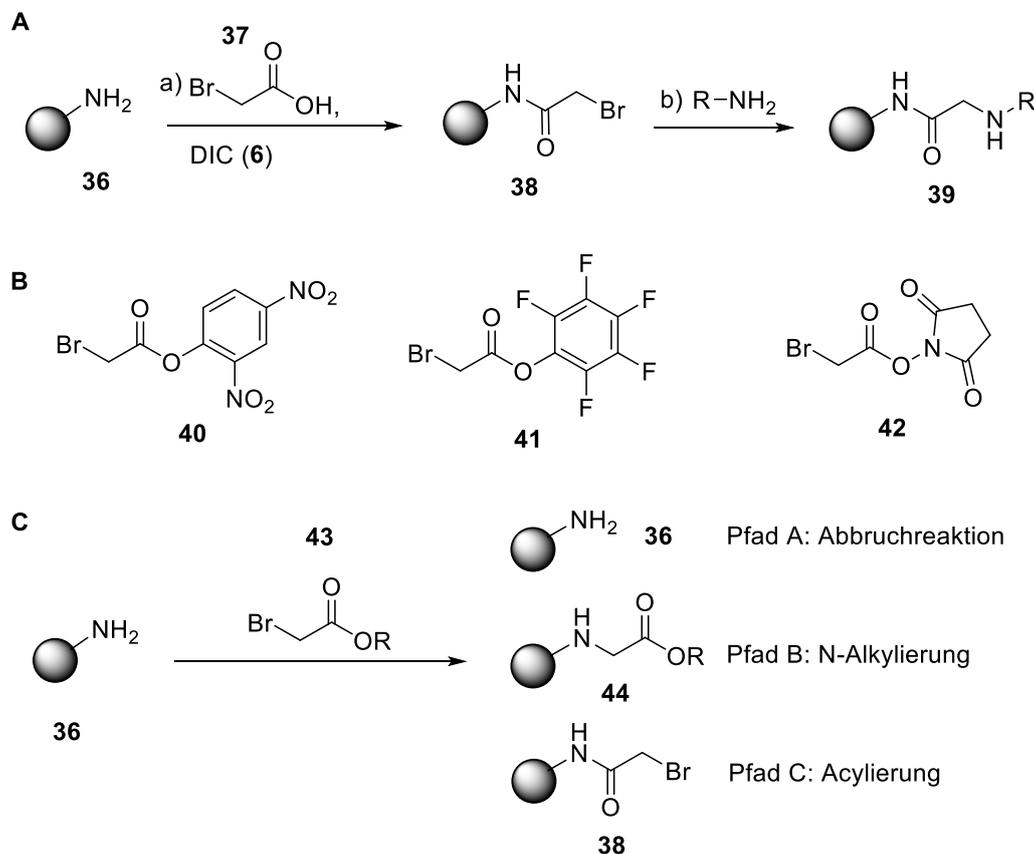


**Schema 6:** Synthese eines Fmoc-*N*-substituierten Glycins: (a) Nucleophile Substitution eines Amins mit Ethylbromoacetat (**34**) in Tetrahydrofuran (THF). (b) Verseifung des Esters mittels Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung in Methanol (MeOH) und Dioxan zur Freisetzung der Carboxy-Gruppe. (c) Fmoc-Schützung des sekundären Amins mit Fmoc-OSu in H<sub>2</sub>O und Acetonitril (MeCN).

## 1.6.2. Submonomer-Methode

Im Gegensatz zur Monomer-Methode, werden bei der Submonomer-Methode keine Monomere verwendet, sondern stattdessen wird das Peptoid am Harz aus Acyl- und Aminbausteinen aufgebaut. Zuerst wird eine DIC-vermittelte Acylierung mit einer halogenierten Essigsäure am Rink-Amid-Harz (**32**) durchgeführt und anschließend durch eine nucleophile Substitution eine Seitenkette (Rest, (R)) eingeführt. Die Acylierung und Substitution werden bis zur gewünschten Kettenlänge durchgeführt, die Schutzgruppen der Seitenketten entfernt und das Produkt vom polymeren Träger abgespalten (Schema 7A).

Für die Acylierung wird die Bromessigsäure (BrAcOH) (**37**) bevorzugt verwendet. Jedoch erwies sich Chloressigsäure bei der Einführung von ungeschützten Heteroatomen als die bessere Wahl, um Nebenreaktionen zu minimieren.<sup>[19, 69]</sup>



**Schema 7:** Submonomermethode<sup>[19]</sup>: (A) a) Acylierung und b) Nucleophile Substitution. (B) Bromessigsäure-2,4-dinitrophenol (BrAc-ODNP) (**40**), Bromessigsäure-pentafluorophenol (BrAc-OPfp) (**41**), Bromessigsäure-*N*-succinimidylester (BrAc-OSu) (**42**). (C) Mögliche Nebenreaktionen bei der Peptidsynthese. Pfad A: Abbruchreaktion: keine Reaktion findet statt, Pfad B: *N*-Alkylierung: Reaktion des Amins **36** und des Bromids der aktivierten Bromessigsäure **43** (R = -OSu, -OPfp, -ODNP), Pfad C: Acylierung: Bildung der gewünschten Amidbildung durch die Reaktion der aktivierten Carbonsäure mit dem immobilisierten Amin **36**.<sup>[70]</sup>

Anstatt der Verwendung einer Carboxylat-Aktivierungsreagenz können auch bereits aktivierte halogenierte Essigsäuren (Schema 7B) eingesetzt werden. Beispielsweise ermöglichte die Verwendung von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenolester (**40**) eine hohe Acylierungsausbeute mit einem geringen Anteil an Nebenreaktionen (*N*-Alkylierung, Abbruchreaktionen) (Schema 7C).<sup>[70]</sup> Weitere Nachteile der Submonomer-Methode sind

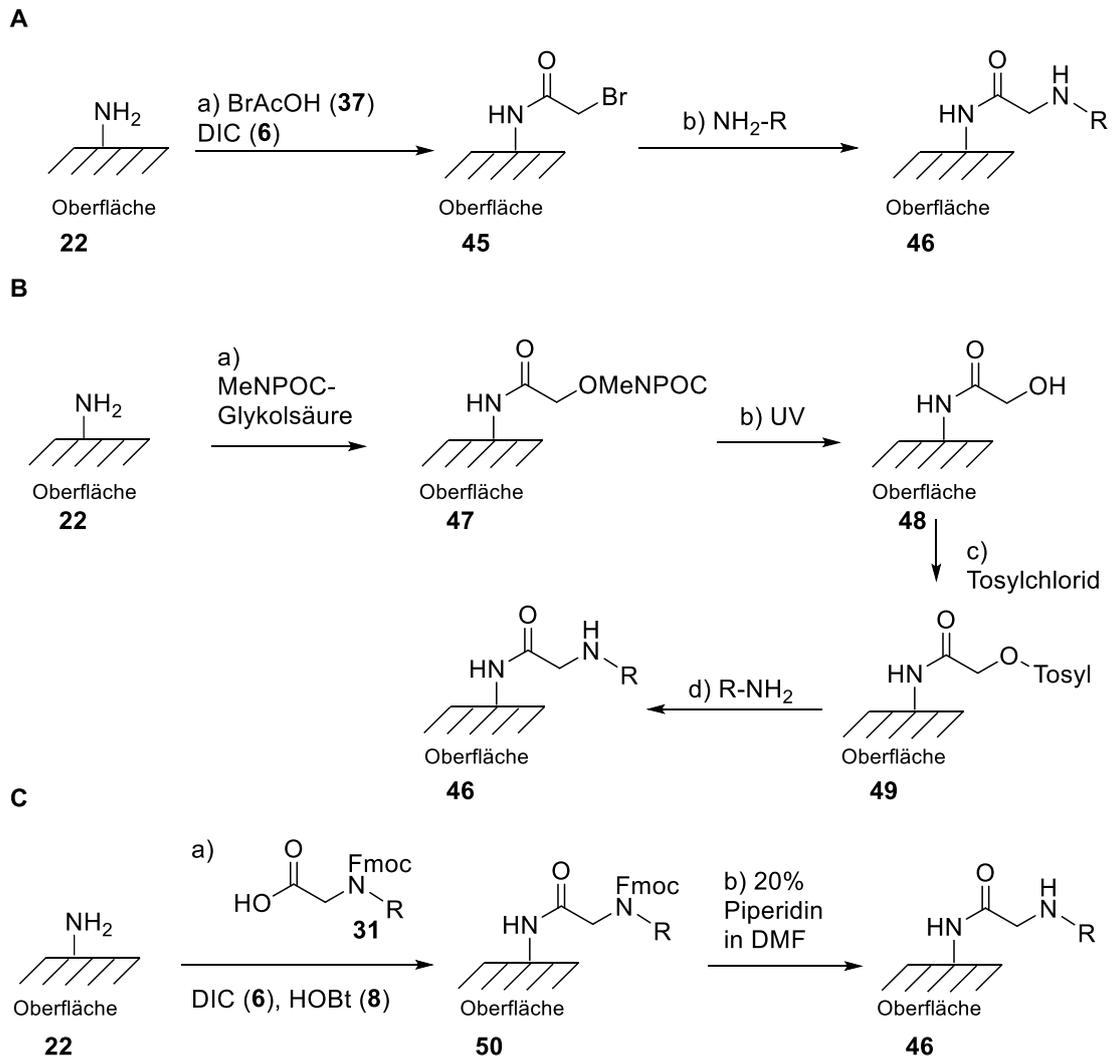
weitere Nebenreaktionen, wie z.B. Dimerisierungen, die zu verlinkten Peptoiden führen<sup>[71]</sup> und die fehlende Reaktionskontrolle während der Synthese.

## 1.7. Peptoidarrays

Für die Synthese von Peptoidarrays sind nur wenige Methoden bekannt, beispielsweise die SPOT-Synthese<sup>[70]</sup> oder photolithographische Methoden.<sup>[22]</sup> Spotdichten von bis ca. 6000/cm<sup>2</sup> könnten erreicht werden. Der erste kombinatorische Ansatz an Oberflächen wurde 1998 von Bartlett *et al.*<sup>[72]</sup>, der auf der Submonomer-Methode von Zuckermann<sup>[67]</sup> und der SPOT-Synthese von Frank<sup>[8]</sup> basiert, präsentiert. Zuerst wird Bromessigsäure (**37**) (BrAcOH) und DIC (**6**) in der Form von räumlich adressierten Spots auf die Oberfläche gebracht. Nach der Acylierung wird das Amin zur Substitution des Bromatoms räumlich adressiert abgelagert (Schema 8A).

Mit dieser Methode sind jedoch nur geringe Spotdichten möglich (< 25 Spots/cm<sup>2</sup>). Für höhere Spotdichten werden Peptide vorsynthetisiert und dann in einem zweiten Schritt an der Oberfläche immobilisiert, um höhere Dichten auf einem Peptoidarray zugänglich zu machen (RayBio® peptoid array<sup>[73]</sup> < 1000 Spots/cm<sup>2</sup>).

Eine weitere Möglichkeit, um *in situ* hochdichte Array zu synthetisieren ist ein lithographisches Verfahren.<sup>[22]</sup> In einem 4-stufigen Prozess kann eine Peptoidbindung an der Oberfläche erzeugt werden. Zuerst wird die Glykolsäure, die eine lichtensitive Schutzgruppe trägt, (1-(3,4-(Methylenedioxy)-6-nitrophenyl)ethylchloroformat (MeNPOC)) an das freie Amin **22** gebunden. Nachdem die Schutzgruppe mittels UV-Bestrahlung entfernt wurde, wird die freie Hydroxy-Gruppe mittels Tosylchlorid aktiviert und kann schließlich durch ein Amin ersetzt werden, um eine Peptoidbindung zu generieren (Schema 8B). Die Wiederholung der Schritte a – d ermöglicht es ein Peptoid bis zur gewünschten Kettenlänge aufzubauen. Ein großer Nachteil ist jedoch, dass die vorhandenen Amine (> 10 000<sup>[61b]</sup>) nacheinander gekuppelt werden müssen. Somit ist die Synthese sehr zeitintensiv und kostspielig. Als eine Alternative zur Submonomer-Methode können Arrays mittels der SPOT-Synthese und der Monomer-Methode erzeugt werden. Jedoch wird diese Methode auf Grund der aufwendigen Synthese der Monomere mit der großen Amin-Vielfalt sehr zeit- und kostenintensiv (Schema 8C).



**Schema 8:** Synthesemöglichkeiten von Peptiden. (A) *In situ* Peptidarray-Synthese via SPOT-Synthese und der Submonomer-Methode a) Kupplung der Bromessigsäure (**37**) mittels DIC (**6**), b) Nucleophile Substitution mit einem Amin, c) Wiederholung a und b bis zur gewünschten Kettenlänge. (B) Photolithographische Methode. a) Knüpfung der 1-(3,4-(Metylendioxy)-6-nitrophenyl)ethyl (MeNPOC)-geschützten Glykolsäure mit einem Aktivierungsreagenz und das polymergebundene Amin (**22**), b) UV-Bestrahlung zur Entfernung der Schutzgruppe. c) Aktivierung der OH-Gruppe mittels Tosylchlorid, d) Reaktion mit einem Amin e) Wiederholung a bis d bis zur gewünschten Kettenlänge. (C) Mögliche *in situ* Peptidarray-Synthese via SPOT-Synthese und der Monomer-Methode. (Alternativ: Acetylierung der unreaktierten freien Amine) a) Kupplung des Fmoc-*N*-substituierten Glycins **31** mit DIC (**6**) und HOBt (**8**) an das Amin **22**, b) Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe via 20% Piperidin in DMF (v/v), c) Wiederholung a, b bis zur gewünschten Kettenlänge.

## 1.8. Immunosignaturing

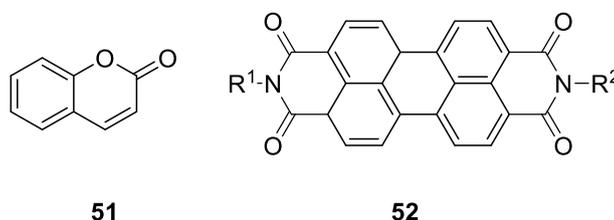
Das Immunosignaturing<sup>[74]</sup> ist eine Standardmethode in der Biologie, um Protein/Peptid- oder Protein/Protein-Interaktionen zu untersuchen. Dabei kann ein Proteincocktail ( $>10^8$  Möglichkeiten) mit Peptiden bzw. Peptoiden, die an einer Oberfläche räumlich getrennt immobilisiert sind, interagieren und binden. Die Methode ist auf Grund der Anzahl der möglichen Peptide oder Proteine auf einem Array beschränkt ( $<$  einige Millionen).<sup>[49c, 74]</sup>

Es handelt sich hierbei um einen dreistufigen Prozess: 1) Synthese eines Arrays, 2) Inkubation eines Arrays mit einem Serum und abschließende Anknüpfung eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers zur Detektion. 3) Fluoreszenzdetektion und Interpretation der Daten. Als Alternative zum Immunosignaturing kann Phage Display<sup>[75]</sup> genutzt werden. Bei dieser Methode werden Peptide auf der Oberfläche von Phagen präsentiert, um anschließend nach einer Serum-Inkubation mögliche Binder zu selektieren und diese dann zu sequenzieren. Diese Methode erlaubt es aus  $10^6$  ca. Peptiden<sup>[75]</sup> mögliche Binder zu detektieren und ist somit dem Immunosignaturing ( $>$  einige Millionen) weit überlegen. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass unnatürliche Aminosäuren oder posttranslational veränderte Aminosäuren, beispielsweise Glykosylierungen, Acetylierungen oder Phosphorylierungen, die für jedoch bei Protein-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen, nicht zugänglich sind.<sup>[76]</sup>

## 1.9. Fluoreszenzfarbstoffe

Fluorophore spielen in biologischen Methoden eine wichtige Rolle, um Ergebnisse visualisieren zu können. Beispielsweise können mit Organellenmarkern die Mitochondrien lebender Zellen gezielt angefärbt werden.<sup>[77]</sup> Zur Detektion können z.B. Fluoreszenzmikroskope<sup>[78]</sup> genutzt werden. Das Grundprinzip der Fluoreszenz ist, dass die Fluorophore, die sich im sogenannten Schwingungsgrundzustand befinden, in ihren elektronisch angeregten Zustand überführt werden, indem sie Photonen, die eine Strahlungsquelle aussendet, absorbieren. In einer strahlungslosen Relaxation (Abgabe von Schwingungsenergie) wird dann ein angeregter Grundzustand erreicht. Durch eine abschließende Emission der Photonen nimmt der Farbstoff dann wieder seinen Grundzustand ein.<sup>[79]</sup> Diese Photonen werden detektiert und erlauben dadurch eine

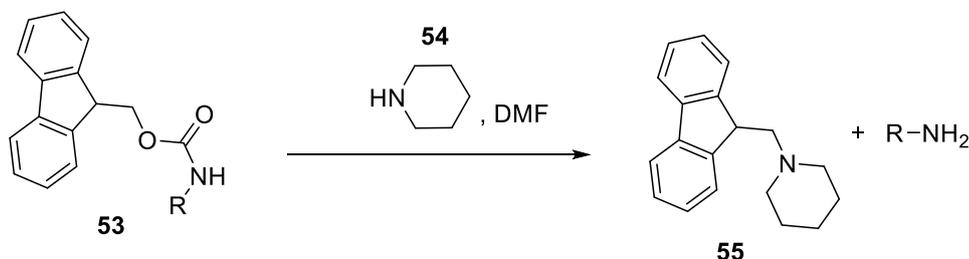
ortsaufgelöste optische Abbildung. Zudem können anhand der Fluoreszenzintensitäten z.B. Rückschlüsse über Ausbeuten einer chemischen Synthese<sup>[22]</sup> gemacht werden. Zahlreiche Fluorophorfarbstoffklassen sind bekannt, beispielsweise Cumarin-basierte Farbstoffe<sup>[80]</sup> oder Perylen-basierte-Farbstoffe<sup>[81]</sup> (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Grundgerüste von Cumarin (**51**)- und Perylen (**52**)-basierten Farbstoffen.

## 1.10. Methoden zur Reaktionskontrolle

Für die Generierung von Arrays mit langkettigen Molekülen ist eine Reaktionskontrolle jedes Syntheseschrittes notwendig. Im Falle der Peptidarrays können diese Kontrollen nach einer Fmoc-Entschützung (Bildung des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes (DFPA) (**55**)) spektrometrisch durchgeführt werden (Schema 9).



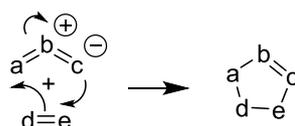
**Schema 9:** Fmoc-Entschützung mittels 20% Piperidin (**54**) in DMF (v/v) unter Bildung des DFPA (**55**) zur spektrometrischen Untersuchung bei 301 nm.<sup>[32]</sup>

Zudem können am Ende einer Synthese Kontrollpeptide am *N*-Terminus mittels Fluoreszenz detektiert werden, da nach jedem Schritt, die noch vorhanden freien Amine acetyliert werden können. Alternativ können Peptid-TAGs wie HA (Aminosäuresequenz: YPYDVPDYA) oder FLAG (Aminosäuresequenz: DYKDDDDK) genutzt werden, die mit einem Fluorophor-gelabelten Antikörper nachgewiesen werden können.

Bei der Peptoidarray-Synthese, mittels Submonomer-Methode, ist jedoch solch eine Kontrolle nicht möglich, sodass eine Methode benötigt wird, die ein orts aufgelösten Nachweis ermöglicht. Dazu kann MALDI<sup>[82]</sup>-MS-Imaging genutzt werden. Bei diesem Verfahren werden mit Hilfe eines Laserstrahls ein Matrixmaterial, das die Energie des Lasers stark absorbiert, und das zu untersuchende Molekül an der Oberfläche herausgelöst und ionisiert. Danach folgt eine Detektion mittels Massenspektrometrie.<sup>[83]</sup> Dabei sind Auflösungen zwischen 20  $\mu\text{m}$  und 200  $\mu\text{m}$  mit kommerziell erhältlichen Lasern möglich.<sup>[84]</sup> Bei MALDI-MS-Imaging an chemisch modifizierten Oberflächen werden die Moleküle auf einem abspaltbaren Linker z.B. Rink-Amid-Linker (**87**) (Abspaltung mit TFA-Dampf (siehe Abschnitt 1.4.1.)), der eine orts aufgelöste Abspaltung ermöglicht, aufgebaut. Nach einer Abspaltung der Moleküle wird die Oberfläche mit einer MALDI-Matrix beschichtet, bevor Messung durchgeführt werden kann.<sup>[85]</sup> Die Probenvorbereitung stellt hierbei eine besondere Herausforderung dar, um eine möglichst hohe Auflösung zu erlangen. Das Matrixmaterial darf nur in geringen Mengen an Lösungsmitteln gelöst werden, um eine Diffusion zu vermeiden. Des Weiteren sollte eine gute Co-Kristallisation mit dem Analyten erfolgen, die möglichst kleine Kristalle erzeugt.<sup>[84]</sup> Zahlreiche Beschichtungsmethoden, beispielsweise Sprüh<sup>[86]</sup>-, Sublimations<sup>[87]</sup>-, Spotting<sup>[88]</sup>- oder Druckmethoden, sind bekannt.<sup>[89]</sup>

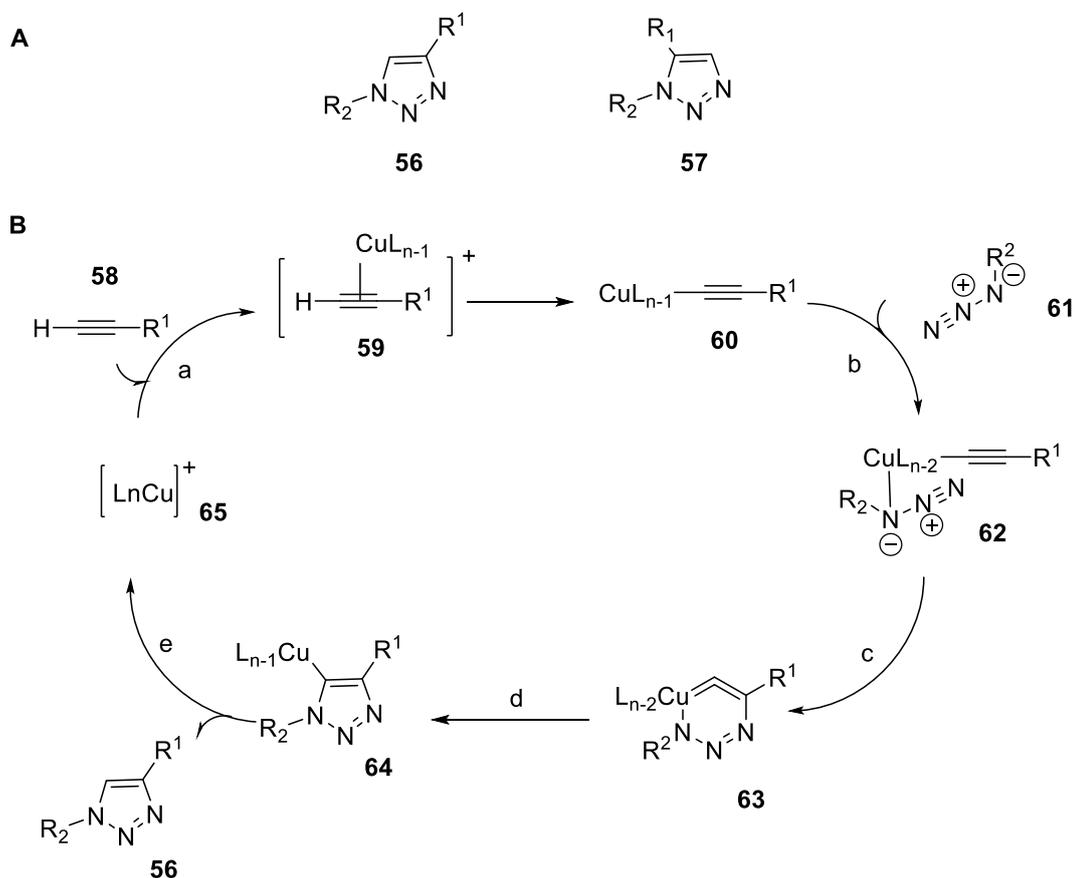
## 1.11. Click-Reaktionen

Im Jahre 1957/58 gelang es R. Huisgen, die Kinetik und den Mechanismus der 1,3-dipolaren Cycloaddition zur Bildung von fünfgliedrigen Ringen aufzuklären.<sup>[90]</sup> Bei dieser Reaktion wird ein ladungsfreier fünfgliedriger Ring durch die Reaktion eines 1,3-Dipols mit einem Dipolarophil unter synchroner Bildung zweier  $\sigma$ -Bindungen gebildet (Schema 10).



**Schema 10:** Mechanismus der 1,3-dipolaren Cycloaddition.<sup>[90]</sup>

Eine weitere Methode der Cycloaddition ist die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC), die von Sharpless *et al.* beschrieben wurde.<sup>[91]</sup> Dabei führt die Reaktion zwischen einem 1,3-Dipol (Azid, Nitriloxid etc.) und einem terminalen Alkin zur Bildung von 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazolen. Die Vorteile hierbei sind breite Anwendungsmöglichkeiten, häufige quantitative Ausbeuten, milde Reaktionsbedingungen und hohe Toleranzen gegenüber unterschiedlichen Reaktionsbedingungen. Zum Beispiel die Durchführung im wässrigen Milieu, die Toleranz gegenüber einem großen pH - (4 – 12) und Temperaturbereich (0 – 160 °C) und die mögliche Verwendung vieler funktioneller Gruppen.<sup>[91]</sup> Zudem kommen in der Natur Azide und Alkine nur selten vor, z.B. in Toxinen<sup>[92]</sup>, sodass das Interesse der CuAAC für biologische Anwendungen stark gestiegen ist.<sup>[92a]</sup>

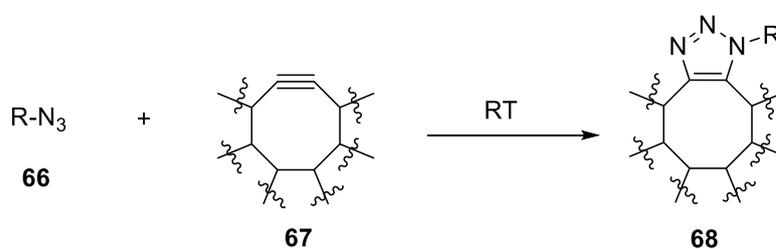


**Schema 11:** (A) Darstellung des 1,4- und 1,5-substituierten Triazols. (B) Mechanismus der CuAAC-Reaktion. a) Koordination des Alkins an die Cu(I)-Spezies unter Abspaltung eines Liganden und Bildung des Acetylids **60**, b) Anbindung des Azids **61** an das Kupferatom unter Bildung des Intermediats **62**, c) Das Stickstoffatom des Azids greift das C<sup>2</sup>-Atom des Alkins an und es kommt zur Bildung eines ungewöhnlichen sechsgliedrigen Ringes **63**, d) Umlagerung zum Triazol-Kupferderivat **64** und e) Bildung des Triazols **56** durch Protonolyse.<sup>[91]</sup>

Im Jahre 2001 wurde von K. B. Sharpless der Begriff "Click-Reaktion" eingeführt. Dies sind Reaktionen, die eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit und einen großen Anwendungsbereich besitzen, hohe Ausbeuten ermöglichen und stereospezifisch verlaufen. Zusätzlich soll die Reaktion unter einfachen Reaktionsbedingungen ablaufen, verfügbares Ausgangsmaterial und leicht entfernbare Lösungsmittel verwendet werden und das Produkt einfach aufzureinigen sein.<sup>[93]</sup>

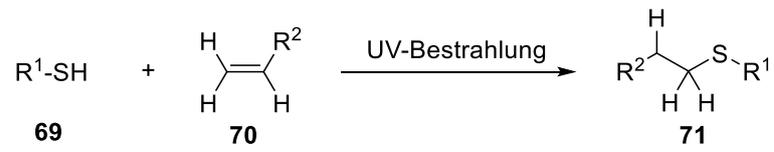
Die CuAAC ist ein Beispiel für solch eine Click-Reaktion. Der Mechanismus, der in Schema 4 dargestellt ist, unterscheidet sich von dem von R. Huisgen aufgeklärten Mechanismus der 1,3-dipolaren Cycloaddition (Schema 10), der zur Bildung eines 1,4- und 1,5-substituierten Triazols führt (Schema 11).<sup>[91]</sup> 1,5-substituierte Triazole können mittels einen Ruthenium-Katalysator erhalten werden.<sup>[94]</sup>

Eine weitere Methode, um Triazole zu synthetisieren ist die *Strain Promoted Alkyne Azide Cycloaddition (SPACC)* Reaktion<sup>[95]</sup>, die auf Grund der Verwendung eines Cyclooctins, kein cytotoxisches Cu<sup>+</sup>-Katalysator<sup>[96]</sup> benötigt. Aus diesem Grund wird sie in zahlreichen biologischen Anwendungen, z.B. um Zellen spezifisch zu markieren, verwendet (Schema 12).



**Schema 12:** Bildung eines Triazols **68** durch die Reaktion eines Azides **66** mit einem Cyclooctin **67**.<sup>[95]</sup>

Weitere Click-Reaktionen stellen die Thiol/-in<sup>[97]</sup> und die Thiol/-en<sup>[98]</sup> Reaktion dar. Ein Thiol **69** reagiert hierbei mit einem Alkin oder einem Alken **70** unter Bildung eines Alkenyl- oder Alkylsufids **71**. Diese Reaktionen laufen unter Verwendung von UV-Strahlung oder eines Initiators nach einem radikalischen Mechanismus ab (Schema 13).



**Schema 13:** Thiol/-en Reaktion.<sup>[99]</sup>

## 2. Ziel der Arbeit

Wie im vorangehenden Kapitel beschrieben wurde, sind Arrays von kleinen Molekülen ein wichtiges Werkzeug, um eine große Anzahl von Substanzen simultan auf Interaktionen zu untersuchen. Besonders die Interaktionen von Proteinen bzw. Peptiden sind hierbei von großem Interesse, da dadurch biomolekulare Prozesse entschlüsselt werden können. Peptoide, die zahlreiche Konformationen von Peptiden nachahmen können, nehmen auf Grund ihrer zahlreichen Vorteile gegenüber Peptiden, eine immer wichtigere Rolle ein. Durch die große Vielfalt der existierenden Proteine werden immer weitere Methoden entwickelt um hochdichte Arrays zu generieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, hochdichte Arrays von Protein-ähnlichen Strukturen, modifizierten Peptiden und Peptoiden zugänglich zu machen.

Im ersten Teil der Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht Arrays von Protein-ähnlichen Strukturen zu generieren. Ein trifunktionaler Linker sollte entwickelt werden, der Peptide in räumliche Nähe bringen kann, damit sie interagieren können und somit Proteine nachahmen können. Dazu sollte der im vorangehenden Kapitel gezeigte entwickelte Transferprozess ausgenutzt werden, der es ermöglicht *in situ* generierte Peptidarrays aufzureinigen.

Der zweite Teil der Arbeit sollte sich mit einer Laser-basierten Methode (cLIFT) zur Generierung von Peptidarrays beschäftigen. Dazu sollte zuerst die bereits entwickelte Methode chemisch optimiert werden und abschließend weitere Reaktionstypen, beispielsweise die *in situ* Aktivierung von Aminosäure und Carbonsäuren oder die Click-Chemie, auf die Kompatibilität mit der Methode überprüft werden, um Modifikationen der Seitenketten der Peptide durchzuführen. Von besonderem Interesse war hierbei der gezielte Einbau von Fluorophoren in einen Peptid-Spot, da in vorherigen Arbeiten eine starke unspezifische Einlagerung diverser Fluorophore in die verwendeten Polymeroberflächen detektiert wurde. Aus diesem Grund sollten Fluorophore mittels der cLIFT-Methode in einen Array eingebaut werden.

Der letzte Teil dieser Arbeit sollte sich mit der Generierung von hochdichten Peptoidarrays via Submonomer-Methode oder Monomer-Methode beschäftigen. Dabei sollte ebenfalls die Laser-basierte Methode ausgenutzt werden. Die Detektion der synthetisierten Peptoide sollte hierbei massenspektrometrisch erfolgen.

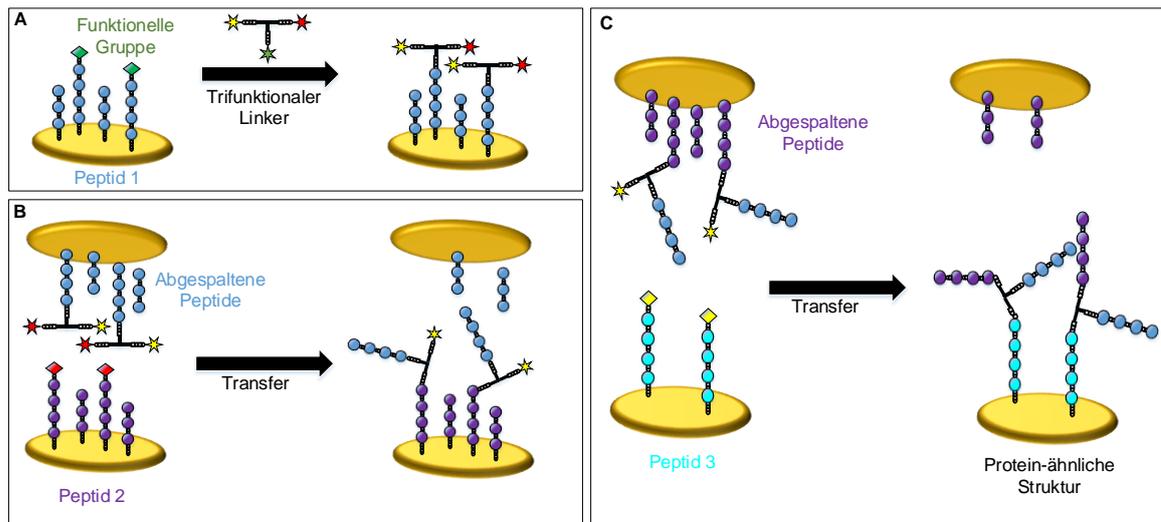
## 3. Hauptteil

### 3.1. Aufreinigung von *in situ* erzeugten Peptidarrays und Arrays mit Protein-ähnlichen Strukturen

#### 3.1.1. Vorbetrachtungen

In vorherigen Arbeiten wurde eine Methode entwickelt, um *in situ* generierte Peptidarrays über einen Transferprozess aufzureinigen.<sup>[54a, 100]</sup> Dazu wurden Peptidarrays am *N*-Terminus mit einer funktionellen Gruppe versehen, abgespalten und auf eine Akzeptor-Oberfläche, die ebenen falls eine funktionelle Gruppe trug, ortsaufgelöst transferiert. Hierbei wurden die Oberflächen aneinandergedrückt, um eine Diffusion zu vermeiden. Die Diffusion und Kupplung der Peptide an die Akzeptor-Oberfläche zur Erzeugung eines sogenannte „Peptidarray-Replikats“ wurde durch die Verwendung eines Transfermediums zwischen den Oberflächen ermöglicht (Kap. 2.4.2.). Diese Methode hat zudem den Vorteil, dass der Peptidarray gereinigt wird, da alle acylierten Abbruchsequenzen, die bei der Synthese entstehen, die für den Transfer benötigten funktionellen Gruppen am *N*-Terminus nicht besitzen. Diese Transfermethode könnte nun für die Synthese Protein-ähnlicher Strukturen ausgenutzt werden. Mit Hilfe eines multifunktionalen Linker könnten transferierte Peptide in räumliche Nähe gebracht werden, sodass sich miteinander interagieren können und möglicherweise diskontinuierliche oder konformationelle Bindungsdomänen von Proteinen nachahmen können. Eine mögliche Syntheseroute für die Erzeugung solcher Protein-ähnlicher Strukturen (aus bis zu drei Peptiden) ist in Abbildung 9 dargestellt.

Zuerst wird ein *in situ* generierter Array endständig mit einem trifunktionalen Linker funktionalisiert (9A). Anschließend werden die Peptide abgespalten und auf einen *in situ* erzeugten Peptidarray, der endständig eine geeignete funktionelle Gruppe trägt, transferiert und dort *via* einer chemischen Reaktion immobilisiert (9B). Anschließend wird das Dipeptid abgespalten und auf einen bereits aufgereinigten Array transferiert und immobilisiert (9C).

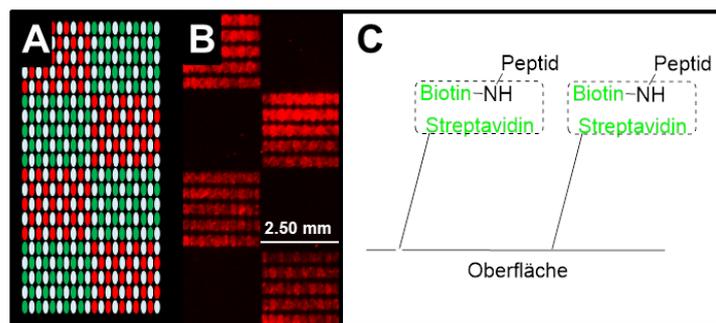


**Abbildung 9:** Generierung von aufgereinigten Arrays mit Protein-ähnlichen Strukturen mit einem trifunktionalen Linker und eines mehrfachen Transfers. (A) Anknüpfung des trifunktionalen Linkers an einen *in situ* erzeugten Peptidarray. (B) Transfer der abgespaltenen Peptide auf einen zweiten *in situ* generierten Peptidarray. (3) Transfer des abgespaltenen Dipeptids auf einen dritten bereits aufgereinigten Peptidarray.

Für die Umsetzung dieses Konzeptes ist es notwendig, geeignete funktionelle Gruppen für einen trifunktionalen Linker zu finden, die einen Peptidarraytransfer ermöglichen. Der Transfer erfordert zudem eine hohe orts aufgelöste Abspalteeffizienz der Peptide um gute Ausbeuten der Protein-ähnlichen Strukturen zu erlangen. Des Weiteren muss ein Peptidarray-Transfer auf einen Peptidarray ohne großartige unspezifische Einlagerung erfolgen, um Selbstassemblierung der Peptide untereinander ausschließen zu können.

In vorherigen Arbeiten von Christopher Schirwitz, Jakob Striffler und Anitha Golla wurden fünf Immobilisierungsverfahren, die es ermöglichen sollten Peptidarrays auf eine Zieloberfläche zu übertragen, untersucht. Darunter den Transfer eine Peptidarrays, der am N-Terminus ein freies Thiol trägt, auf eine goldbeschichtete Membran.<sup>[54a]</sup> (Kap. 2.4.2.) Jedoch hat diese Methode zahlreiche Nachteile: 1) Für eine fluoreszenzbasierte Detektion, die in der biologischen Forschung als Standardmethode eingesetzt wird, können goldbeschichtete Membranen zu Quenchingeffekten führen. 2) Die Aminosäure Cystein wird innerhalb einer Sequenz nicht toleriert, sodass zusätzliche orthogonale Schutzgruppen nötig sind. 3) Eine Membran ist mit den gängigsten Fluoreszenz-Scan-Tools nicht kompatibel und schwieriger zu handzuhaben. Ein funktionalisierter Glas-Objekträger ist zu bevorzugen.

Die zweite Transfer-Möglichkeit ist das Biotin/Streptavidin System (Kap. 2.4.2.).<sup>[100]</sup> Für den Peptidarraytransfer wurde ein Peptidarray-Layout als Schachbrettmuster, das aus einem HA-Tag (YPYDVPDYA) und einem FLAG-Tag (DYKDDDDK) besteht, entworfen (Abbildung 10A). Diese Sequenzen finden in biologischen Methoden oft ihre Anwendungen, da sie mittels einer Immunfärbung leicht detektierbar sind. Zudem wurden acetylierte HA- und FLAG- Sequenzen (hellblau) verwendet, die als Kontrolle dienen sollten, da sie aufgrund der fehlenden funktionellen Gruppe am *N*-Terminus nicht durch einen Transfer gekuppelt werden können. Die Peptide wurden auf einer 100% PEGMA Oberfläche, die mit einem  $\beta$ -Alanin verestert wurde, über eine Amidbindung immobilisiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Spots aufgrund einer Kontamination vom Nachbarspot im Herstellungsprozess auch geringe Mengen an HA- und FLAG-Sequenzen mit freiem *N*-Terminus besitzen, sodass diese auch gekuppelt wurden. Jedoch ist hier eine schwächere Intensität detektierbar (10B).



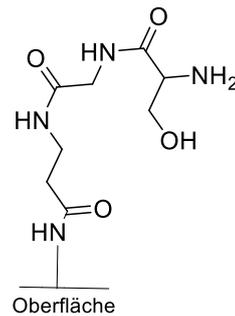
**Abbildung 10:** (A) Ausschnitt des Array-Layouts: 1, grün: FLAG-Epitop, rot: HA-Epitop, hellblau: acetylierte HA- oder FLAG-Sequenzen (B) Fluoreszenzscan (700 nm) nach einer Immunfärbung mit Anti-HA-*DyLight* 680 eines Peptidarray-Replikats. Hierbei wurde ein 100% PEGMA-Peptidarray (Array-Layout: 1), der am *N*-Terminus ein Biotin trägt und mittels Ammoniak-Inkubation abgespalten wurde, auf eine 3D-Streptavidin Oberfläche in PBS transferiert und gekuppelt.<sup>[100]</sup> Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert. (C) Veranschaulichung der Streptavidin/Biotin-Wechselwirkung zur Erzeugung eines Peptidreplika.

Dieses System bringt jedoch Nachteile mit sich, da die Peptide nicht kovalent auf den Zielträger übertragen werden. Die Bindung von Biotin, einem Vitamin, an Streptavidin, einem Protein, entsteht durch nicht kovalente Kräfte (hauptsächlich Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Kräfte). Eine starke Reversibilität der Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung wurde hierbei festgestellt.<sup>[100]</sup>

Auf Grund dieser Nachteile wurde in vorherigen Arbeiten als dritte Transfermöglichkeit die Thiol-Epoxid-Click-Chemie getestet.<sup>[100]</sup> Auch hier ist der Einsatz von orthogonalen Schutzgruppen nötig. Jedoch führte diese Methode zu einem inhomogenen Transfer eines Peptidarrays. Zudem erwiesen sich die eingesetzten Epoxidoberflächen als instabil, sodass die vorbereiteten Oberflächen nicht lagerfähig waren. Diese Methode ist aus diesem Grund als Routineverfahren zur Erzeugung von aufgereinigten Arrays nicht geeignet.<sup>[100]</sup> Des Weiteren wurde die Thiol-en und die Reaktion zwischen einem Thiol und einem Maleimid getestet.<sup>[101]</sup> Auch hier ist der Einsatz von orthogonalen Schutzgruppen erneut nötig. Beide Reaktionstypen führten auch hier zu inhomogenen Spots, jedoch zeigte die Maleimid-Thiol Reaktion Potenzial für einen homogenen Peptidtransfer, da bis dato noch keine Optimierung des Transfers durchgeführt wurde. Um einen homogenen Peptidarraytransfer für den Einsatz eines trifunktionalen Linker zu ermöglichen, sollten nun weitere kovalente Alternativen gefunden werden.

### 3.1.2. Benennung der Moleküle

Die synthetisierten Moleküle wurden nach der IUPAC-Nomenklatur benannt. Im Falle einer Immobilisierung am Harz wurde das Wort „polymergebunden“ und bei einer Immobilisierung an der Oberfläche „oberflächengebunden“ angehängt. Für immobilisierte Peptide am Array wurde das Wort „Array“ oder „Spot“ angehängt. Vorsynthetisierte Peptidsequenzen wurden vom *N*-Terminus zum *C*-Terminus angegeben. Die Synthese erfolgte jedoch vom *C*- zum *N*-Terminus. Sobald eine Molekülkette an der festen Phase synthetisiert wurde, wurde die Reihenfolge der einzelnen Monomere (Sequenz) immer so angegeben, dass das von der Oberfläche am weitesten entfernte Monomer ganz links in der Sequenz steht. Das Beispiel in Abbildung 11 verdeutlicht diese Benennung. Für die Aminosäuren der Peptide wurde der Einbuchstabencode oder der Dreibuchstabencode verwendet.



### SGβA-oberflächengebunden

**Abbildung 11:** Benennung eines Moleküls aus den Monomeren (Serin (S oder Ser), Glycin (G oder Gly) und  $\beta$ -Alanin ( $\beta$ A oder  $\beta$ Ala) an einer Polymeroberfläche. Die Sequenzbenennung ist hier SGβA-oberflächengebunden.

Die Protein-ähnlichen Strukturen wurden aufgrund ihrer Komplexität nicht benannt. Es wurden lediglich die gekuppelten Peptide und der Name des verwendeten Linkers (z.B. Protein-ähnliche Struktur (Peptid 1, Peptid 2, Peptid 3, Linker) aufgezählt.

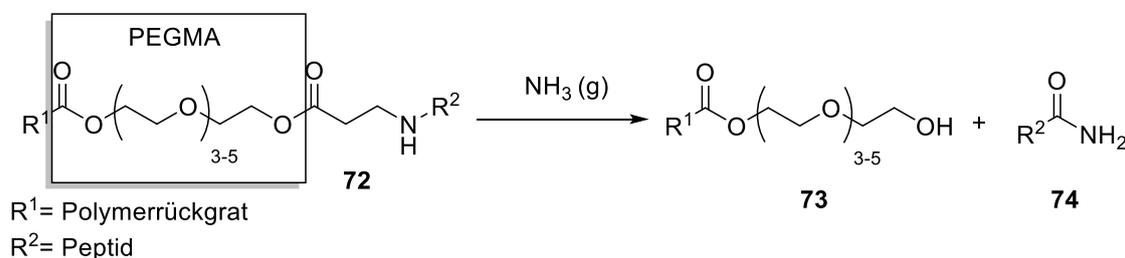
## 3.1.3. Optimierung der Transfer- und Kupplungsbedingungen von Peptidarrays auf eine Zieloberfläche

### 3.1.3.1. Transfer von Peptidarrays und Anbindung via Amid- oder Thioetherbindung

Zu Beginn wurde der Peptidarray-Transfer über die Knüpfung einer Amid- oder Thioetherbindung, die zuvor zu inhomogenem Transfer führte<sup>[101]</sup>, getestet. Der Vorteil ist hierbei, dass Amine, Carboxylgruppen und Thiole leicht zugänglich sind, in dem gezielt orthogonale Schutzgruppen für die Seitenketten der Peptide eingesetzt werden. Diese funktionellen Gruppen erlauben es jedoch nur geschützte Peptide zu transferieren, sodass möglicherweise der Transfer aufgrund sterischer Effekte gehindert ist. Hierzu wurde ein 100% PEGMA Peptidarray (Array-Layout 1) mit einem freien *N*-Terminus verwendet. Die Beladung einer 100% PEGMA, die mit einem  $\beta$ -Alanin funktionalisiert ist, beträgt ca. 2.00 – 4.00 nmol/cm<sup>2</sup>. Die Peptide können mit Ammoniak-Dampf orts aufgelöst abgespalten werden. Hierbei spaltet der Ammoniak eine Esterbindung, mit der das Peptid an der Oberfläche verankert ist (Schema 14). In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt

## 32 Hauptteil

werden, dass nach einer 24 h Inkubation mit Ammoniak ca. 1% der Peptide abgespalten werden.<sup>[57, 100]</sup>



**Schema 14:** Abspaltung des Peptides mit Ammoniak von einer 100% PEGMA-Oberfläche, die mit einem  $\beta$ -Alanin verestert wurde.

Als Akzeptoroberflächen wurden Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen<sup>[102]</sup> genutzt, die eine geringere Derivatisierung der Oberflächen (ca. 500  $\mu$ mol – 1.00 nmol/cm<sup>2</sup>) aufweisen. Dadurch kann eine höhere Ausbeute des transferierten Arrays erzielt werden.

Für das Experiment wurde der *N*-Terminus einer Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit der geeigneten funktionellen Gruppe ausgestattet (Tabelle 1).

Eine Maleimid-Oberfläche wurde erzeugt indem der *N*-Terminus einer NH<sub>2</sub>- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit Succinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) in PBS-T umgesetzt wurde. Die OPfp-aktivierte Oberfläche wurde generiert, indem eine NH<sub>2</sub>- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit Fmoc-Asparaginsäure-OPfp umgesetzt wurde. Anschließend wurden die säurelabilen Schutzgruppen mittels TFA, TIBS, H<sub>2</sub>O in DCM entfernt und die freie Carbonsäure mit Pentafluorphenol (**13**), DIC (**6**) und Pyridin aktiviert.

**Tabelle 1:** Durchgeführte Transferexperimente.

<b>Akzeptor</b>	<b>Donor</b>	<b>Bindung</b>	<b>Transfermedium</b>
Maleimid	Thiol (-SH)	Thioether	PBS-T
Amin	Säure (-COOH)	Amid	DMF, DIC (6)
Pentafluorophenol- ester (13) (-OPfp)	Amin	Amid	DMF

Der Transfer der Peptide wurde mit zwei Transfermaschinen (manuell und halbautomatisch) vollzogen, die am IMT entwickelt wurden.<sup>[57, 103]</sup> Der Array wird hierbei durch Druckluft mit einer Kraft von 2.20 N auf eine Zieloberfläche gepresst. Bei der manuellen Transfermaschine müssen der Akzeptor und der Donor selbstständig übereinander ausgerichtet und angepresst werden. In die halbautomatische Stempelmaschine müssen der Akzeptor und der Donor ebenfalls übereinander ausgerichtet werden. Jedoch wird das Anpressen automatisch per Computerbefehl durchgeführt, sodass eine Verschiebung der Oberfläche nicht stattfinden kann. Der Peptidtransfer findet durch das Transfermedium (Lösungsmittel bzw. Kupplungsreagenzien) statt (Kap.2.4.2.). Anschließend werden die Oberflächen mit der Hand voneinander getrennt, gewaschen und der erfolgreiche Transfer mit einer Immunfärbung nachgewiesen. Die automatische Stempelmaschine trennt die Oberflächen per Computerbefehl.

Es stellte sich heraus, dass diese Methoden (Tabelle 1) nur sehr schlechte inhomogene Arrays erzeugten. Diese funktionellen Gruppen können daher nicht für den Transfer mit einem multifunktionalen Linker genutzt werden.

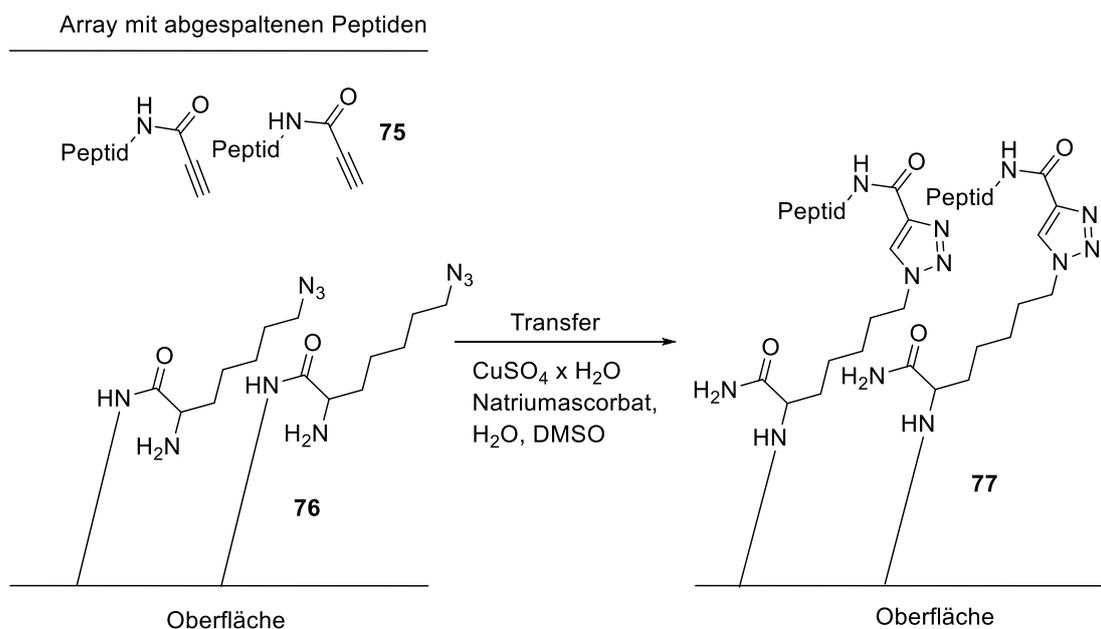
### 3.1.3.2. Peptidarraytransfer via Click-Chemie

Als nächstes wurde die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC)<sup>[104]</sup> getestet. Die Reaktion zwischen einem Azid und einem terminalen Alkin führt zur Bildung von 1,4 disubstituierten Triazolen (Kap.1.11) Die Vorteile hierbei sind hohe Ausbeuten,

milde Reaktionsbedingungen und hohe Toleranzen gegenüber unterschiedlichen funktionellen Gruppen. Im Falle der Anwendung an Peptidarrays können proteinogene Peptide vollentschützt eingesetzt werden, die funktionalisierten Oberflächen sind lagerfähig und die milden Reaktionsbedingungen führen zu keiner Zerstörung an den funktionalisierten Oberflächen.

### 3.1.3.2.1 Transfer eines alkylierten Arrays auf eine azidierte Oberfläche

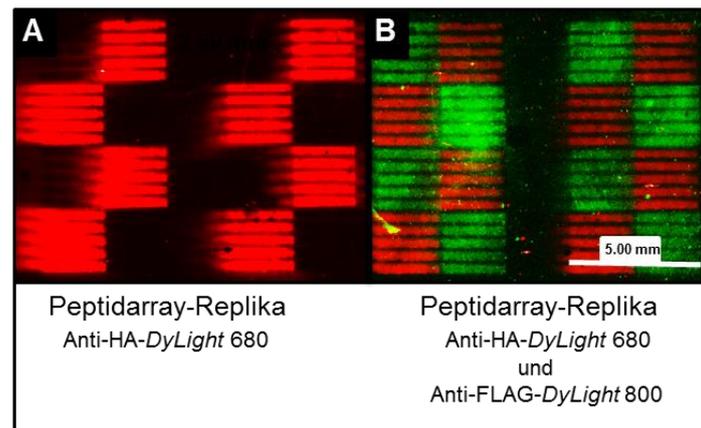
Für den Transfer eines 100% PEGMA Arrays auf eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90 PEGMA-co-MMA Akzeptor Oberfläche wurden die freien Amine mit Propiolsäure, HBTU (**14**) und Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF umgesetzt.



**Schema 15:** Peptidtransfer von einem Array auf eine Polymeroberfläche via CuAAC.

Anschließend wurden die Schutzgruppen der Seitenketten vor dem Übertrag durch Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA), DCM, Triisobutylsilan (TIBS) und  $\text{H}_2\text{O}$  entschützt. Der Akzeptor wurde mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt und anschließend mit Fmoc-Lys( $\text{N}_3$ )-OH (**110**), HBTU (**14**), DIPEA in DMF umgesetzt. Zur Quantifizierung einer erfolgreichen Anknüpfung des Azids wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und die Extinktion des Dibenzofulven-Piperidin Adduktes (DFPA) bei 301 nm bestimmt.<sup>[10]</sup>

Anschließend wurde der funktionalisierte Array für 24 h mit Ammoniak inkubiert, um die Peptide abzuspalten. Der Transfer der Peptide wurde mit der manuellen Transfermaschine vollzogen. Als Transfermedium wurde Kupfersulfatpentahydrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ), Natriumascorbat in DMSO und  $\text{H}_2\text{O}$  verwendet (Schema 15). Zur Detektion des erfolgreichen Übertrages wurde eine Anti-HA-DyLight 600 und eine Anti-FLAG-DyLight 800-Immundefärbung durchgeführt.



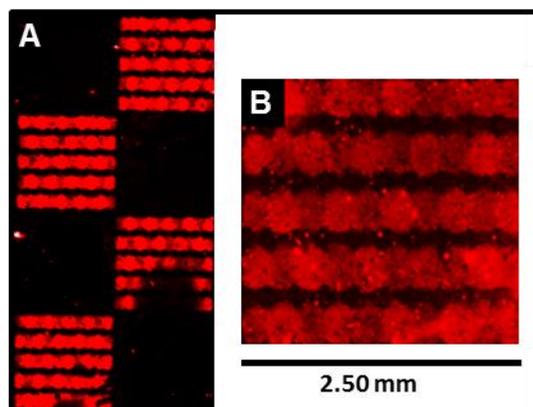
**Abbildung 12:** Fluoreszenzscans (700 und 800 nm) einer Immunfärbung eines Transfers von einem alkylierten Peptidarray auf einer azidierten R-NH-βAla-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche. (A) Anti-HA-DyLight 680 und (B) Anti-HA-DyLight 680 und Anti-FLAG-DyLight 800. Die Bilder wurden in Helligkeit und Kontrast optimiert.

Die Abbildung 12 veranschaulicht, dass der Transfer erfolgreich stattgefunden hat. Jedoch ist eine eindeutige Drift der Peptide (nach links), die wahrscheinlich durch das Anpressen des Arrays auf den Zielträger zustande kommt, vorhanden. Über eine laterale Diffusion kann in diesem Zustand keine Aussage getroffen werden. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass diese Drift durch ein vorheriges kurzes Waschen des Arrays, wodurch die obersten Peptidschichten entfernt werden, verhindert werden kann.<sup>[100]</sup> Sobald der Array und die Oberfläche aufeinander treffen, existieren keine Peptide an der Oberfläche, die verschleppt werden können. Die abgespaltenen Peptide müssen nun im Laufe der Reaktionszeit aus den unteren Polymerschichten an die Oberfläche diffundieren, um eine Reaktion eingehen zu können. Zudem bietet der Waschriff wahrscheinlich den Vorteil, dass eine geringe laterale Diffusion der Peptide unterbunden werden kann.

In zwei weiteren Versuchen wurde der Array deshalb für 30 Sekunden (s) mit DMF gewaschen. Ein Transfer wurde in 6 h unter der Verwendung der manuellen

Transfermaschine durchgeführt. Die Abbildung 13A veranschaulicht diesen Übertrag. Die Detektion erfolgte durch eine Immunfärbung mit Anti-HA-*DyLight* 680.

Das Schachbrettmuster ist zu erkennen. Die Kontrollspots wurden, auf Grund der erwähnten Kontamination, auch übertragen. Jedoch weisen sie eine geringere Fluoreszenz im Vergleich zu den anderen Peptidspots auf. Mit dieser Methode konnte ein Array fünfmal erfolgreich transferiert werden.



**Abbildung 13:** Fluoreszenzscan (700 nm (A) und 635 nm (B)). Immunfärbung mit Anti-HA-*DyLight* 680 eines Transfers (Transferzeit: 6 h) von einem Propiolsäure funktionalisierten-Peptidarray auf  $\text{NH}_2\text{-Lys(N}_3\text{)-}\beta\text{Ala-10:90-PEGMA-co-MMA}$  Oberfläche (A) Auflösung: 21.0  $\mu\text{m}$  (B) Ausschnitt von (A) Auflösung: 5.00  $\mu\text{m}$ . Die Bilder wurden in Helligkeit und Kontrast optimiert.

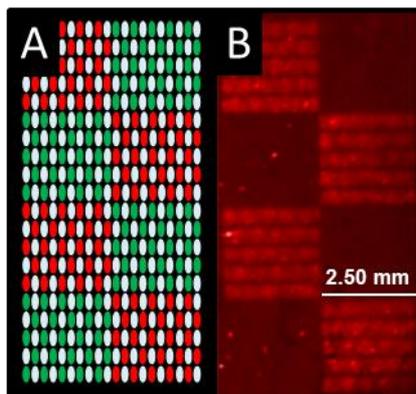
Eine Drift der Peptide bzw. eine feststellbare laterale Diffusion ist bei einer Transferzeit von 6 h nicht zu beobachten (Abbildung 13B). In einem weiteren Experiment wurde der Transfer in 16 h durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität der längeren Reaktionszeit ist deutlich stärker, sodass von einer höheren Ausbeute ausgegangen werden kann. Eine laterale Diffusion konnte nicht festgestellt werden. Jedoch besteht für noch längere Reaktionszeiten die Gefahr einer lateralen Diffusion und einer zusätzlichen unspezifischen Einlagerung der Peptide in tiefere Polymerschichten, sodass für weitere Experimente die Transferdauer von 16 h nicht überschritten wurde.

Als Alternative zu Kupfersulfat und Natriumascorbat wurde Tetrakis-(acetonitril)kupferhexafluorophosphat getestet.<sup>[105]</sup> Der Array wurde *N*-terminal mit Propiolsäure, HBTU (**14**) und DIPEA in DMF umgesetzt. Anschließend wurden die Aminosäureseitenketten vor dem Übertrag durch Zugabe von TFA, DCM, TIBS und  $\text{H}_2\text{O}$  geschützt. Anschließend wurde der funktionalisierte Array für 24 h mit Ammoniak inkubiert, um die Peptide abzuspalten. Der Array wurde 30 s mit DMF gewaschen. Eine

Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde mit Piperidin in DMF entschützt und anschließend mit Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**), DIC (**6**), HOBt (**8**) umgesetzt. Der Transfer auf die vorbereitete azidierte Oberfläche mit der manuellen Transfermaschine wurde für 16 h in einer Lösung von Tetrakis-(Acetonitril)kupferhexafluorophosphat und DIPEA in DMF durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch eine Immunfärbung mit Anti-HA-*DyLight* 680. Der Transfer der Peptide erfolgte ungleichmäßig und eine geringe Fluoreszenzintensität wurde detektiert. Wahrscheinlich wurde die Cu(I)-Spezies durch den Luftsauerstoff oxidiert. Aus diesem Grund wurde für weitere Experimente CuSO<sub>4</sub>/Natriumascorbat verwendet. Durch die *in situ* Erzeugung der Cu(I)-Spezies, wird die oxidierte Cu(II)-Spezies sofort wieder vom Natriumascorbat reduziert.

### 3.1.3.2.2 Transfer eines azidierten Arrays auf eine alkinylierte Oberfläche

Nachdem der Peptidtransfer und die Kupplung auf eine azidierte Oberfläche funktionierten, wurde der Transfer auf eine alkinylierte Oberfläche getestet. Dazu wurde der Array mit Azidoessigsäure (**113**) (Synthese Kap. 3.1.5.1.), DIC (**6**) und HOBt (**8**) in DMF umgesetzt. Die NH<sub>2</sub>- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-PMMA Oberfläche wurde mit Propiolsäure, HBTU (**14**) und DIPEA in DMF für 2 h unter Schutzgas bei RT im Exsikkator umgesetzt. Die Quantifizierung der alkinylierten Oberflächen erfolgte durch die Umsetzung mit Tetramethylrhodamin (TAMRA)-Azid in einer CuAAC. Dazu wurde die Oberfläche mit TAMRA-Azid, CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O und Natriumascorbat in H<sub>2</sub>O für 16 h inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Anregung des Fluorophors bei 530 nm. Für den Transfer wurde der funktionalisierte Array für 24 h mit Ammoniak inkubiert. Der Array wurde dann 30 sec mit DMF gewaschen und der Transfer mit der manuellen Transfermaschine und die Kupplung *via* Click Chemie für 6 h durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch eine Immunfärbung mit Anti-HA-*DyLight* 680 (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Fluoreszenzscan (700 nm). (A) Ausschnitt des Array-Layouts: 1. Rot: HA-Epitop, grün: FLAG-Epitop und hellblau: acetylierte HA-Epitop (im HA-Block) oder acetyliertes FLAG-Epitop (im FLAG-Block); (B) Immunfärbung eines Transfers (Transferzeit: 6 h) von einem mit Azidoessigsäure (**113**) funktionalisiertem Peptidarray auf einer mit Propiolsäure funktionalisierten R-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit Anti-HA-*DyLight* 680. Das Bild wurde in Helligkeit und im Kontrast optimiert.

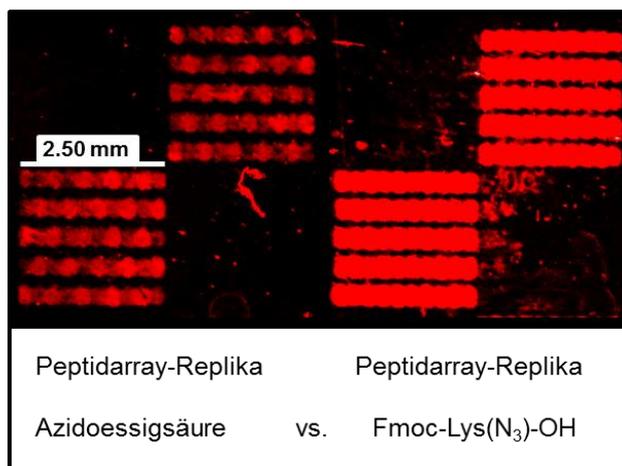
Der Peptid-Transfer war erfolgreich, jedoch wurde ein starker Fluoreszenz-Hintergrund detektiert (Abbildung 14). Der Fluoreszenz-markierte Antikörper interagiert wahrscheinlich mit der alkylierten Oberfläche, sodass eine homogene Fluoreszenz detektierbar ist. In weiteren Experimenten konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden.

### 3.1.3.2.3 Variationen der Kettenlängen der verwendeten Azide

Die azidierte Aminosäure Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**) wurde gegen die kurzkettinge Azidoessigsäure (**113**) ausgetauscht. Damit sollte herausgefunden werden, ob die kurze Alkylkette im Falle der Azidoessigsäure (**113**) sterische Nachteile mit sich bringt. Dazu wurde eine NH<sub>2</sub>- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-MMA-Oberfläche mit Azidoessigsäure (**113**), DIC (**6**), HOBt (**8**) umgesetzt. Die Quantifizierung der Oberflächenfunktionalisierung wurde durch den Fluorophor *DyLight* 650-Phosphine durchgeführt. Dazu wurde ein Stück (ca. 1.00 cm<sup>2</sup>) der azidierten Oberfläche mit *DyLight* 650-Phosphine in PBS bei RT für 16 h umgesetzt.

Für den Transfer wurde der funktionalisierte Array für 24 h mit Ammoniak inkubiert. Der Array wurde 30 s mit DMF gewaschen und der Transfer mit der manuellen Transfermaschine für 6 h in einer Lösung von CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat in DMSO

und H<sub>2</sub>O durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Immunfärbung mit Anti-HA-*DyLight* 680. Der Transfer des Arrays war erfolgreich, jedoch ist die Fluoreszenzintensität im Falle des kurzkettigen Azides deutlich geringer (Abbildung 15). Für die nachfolgenden Experimente wurde deshalb Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**) verwendet, um in kürzeren Reaktionszeiten höhere Ausbeuten zu ermöglichen.



**Abbildung 15:** Fluoreszenzscans (700 nm) einer Immunfärbung eines Transfers von einem Propiolsäure funktionalisiertem Arrays auf eine azidierte R-NH-βAla-10:90 PEGMA-co-MMA Oberfläche (Transferzeit: 6 h) mit Anti-HA-*DyLight* 680. (A) Azidoessigsäure (**113**) und (B) Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**). Die Oberflächen wurden zusammen mit dem Antikörper inkubiert und gescannt, um die Intensitäten miteinander vergleichen zu können. Die Bilder wurden in Helligkeit und Kontrast optimiert.

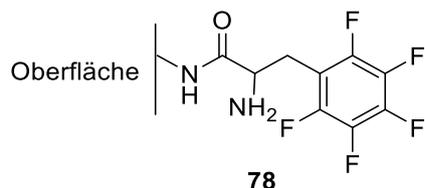
Des Weiteren wurde die Propiolsäure durch Heptinsäure ersetzt, um noch eine größere Flexibilität beim Transfer zu ermöglichen. In zahlreichen Experimenten konnten positive Transfers von Peptidarrays mit hohen Fluoreszenzintensitäten detektiert werden.

### 3.1.3.2.4 Verwendung von 10:90 PEGMA-co-MMA Arrays

#### 3.1.3.2.4.1 Bestimmung der Abspaltrate von einer Fmoc-NH-βAla-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit NH<sub>3</sub>

Die Abspaltrate von Fmoc-NH-βAla-100-PEGMA-Oberflächen wurde bereits von Jakob Striffler durchgeführt.<sup>[100]</sup> Damit die 10:90-PEGMA-co-MMA Arrays genutzt werden konnten, musste nun dieses Experiment wiederholt werden. Dazu wurde ein Siliziumwafer

mit einem 10:90-PEGMA-co-MMA Polymer funktionalisiert. Die endständigen Alkohole wurden mit einem  $\beta$ -Alanin unter der Verwendung von DIC (**6**) und *N*-Methylimidazol (NMI) verestert. Nach einer Acetylierung mit ESA, DIPEA in DMF und einer abschließenden Fmoc-Entschützung wurde die freien Amine mit Pentafluorphenylalanin (PheF<sub>5</sub>), DIC (**6**) in DMF umgesetzt (Abbildung 16).

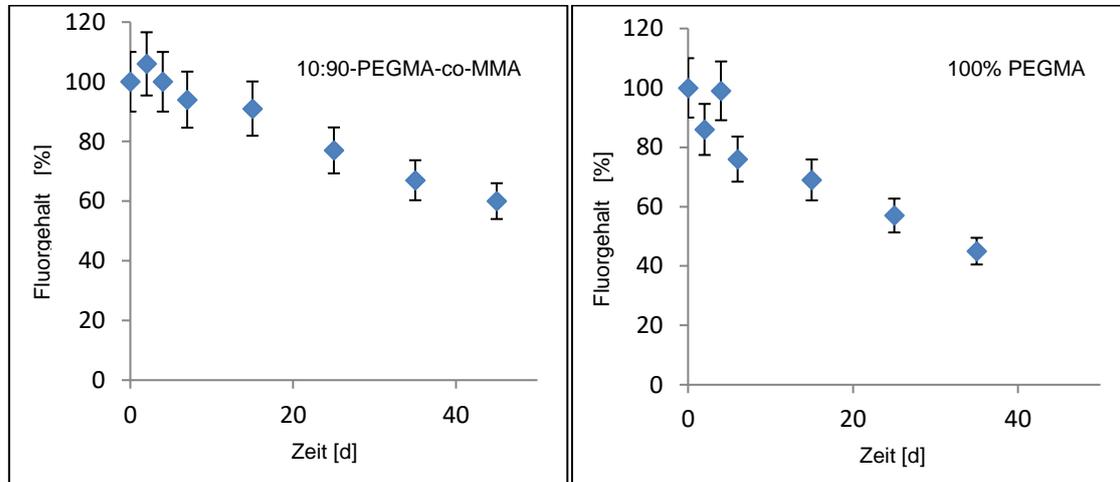


**Abbildung 16:** Immobilisiertes PheF<sub>5</sub> auf einer Polymeroberfläche

Eine Fluor-haltige Aminosäure wurde ausgewählt, um die Abspalteffizienz anhand der F1s-Signale, die aus einer XPS-Messung erhalten werden können, zu ermitteln. Bei einer Abspaltung der Aminosäure mittels Ammoniak nimmt die Intensität dieses Signal ab und lässt Rückschlüsse auf die Abspaltrate zu. Der funktionalisierte Wafer wurde anschließend in quadratische Stücke von ungefähr 0.25 cm<sup>2</sup> geschnitten und diese in einem Exsikkator mit Ammoniak inkubiert. Nach 2, 4, 7, 15, 25, 35 und 45 Tagen wurden die Proben entnommen und die abgespaltenen Peptide durch Waschritte mit DMSO und Methanol entfernt. Nach dem das Experiment abgeschlossen war, wurden XPS-Messungen durchgeführt. Für die Bestimmung der Abspaltrate wurde nun die Abnahme der Intensität des F1s-Signals betrachtet. Als Referenz wurde ein Waferstück, das nicht mit Ammoniak inkubiert wurde verwendet. Ein Fluorgehalt von 1.5% wurde ermittelt. Dieser Wert wurde auf 100% gesetzt (maximaler Fluorgehalt), um die Abspaltrate besser veranschaulichen zu können.

Es wurden für jede Inkubationszeit Messungen an zwei Stellen durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Für den Fehler wurden 10% des Messwertes angenommen (siehe Kap. 5.1.). In Abbildung 17 ist der Vergleich einer R-NH- $\beta$ Ala-100-PEGMA und R-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche dargestellt. Die Abspaltung von einer R-NH- $\beta$ Ala-10:90 PEGMA-co-MMA Oberfläche mit Ammoniak ist deutlich langsamer, als bei einer R-NH- $\beta$ Ala-100% PEGMA Oberfläche. In den ersten 15 Tagen nimmt der Fluorgehalt gering ab. Bei einer Inkubation eines 10:90-PEGMA-co-MMA Peptidarray von 24 h mit Ammoniak muss beachtet werden, dass extrem geringe Mengen an Peptid

abgespalten werden. Jedoch ist zu beachten, dass aufgrund des kleinen Fluorgehaltes der R-NH- $\beta$ Ala-10:90 PEGMA-co-MMA Oberfläche sich größere Messfehler ergeben, als die Kalibration erwarten ließe.

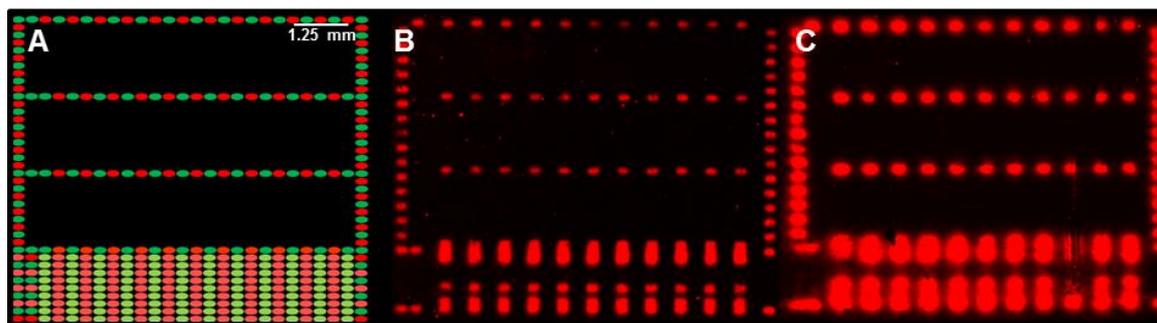


**Abbildung 17:** Vergleich der Abnahme des Fluorgehaltes bei einer Abspaltung eines Peptides von einer Polymeroberfläche. Die Messungen für die 100% PEGMA Oberflächen stammen von der Dissertation von Jakob Striffler.<sup>[100]</sup>

Die verwendeten 100% PEGMA-Arrays mussten durch 10:90-PEGMA-co-MMA Arrays ersetzt werden, da die Firma PEPperPRINT, die die Arrays gratis zur Verfügung stellte, sich auf die Herstellung von 10:90-PEGMA-co-MMA Arrays spezialisierte.

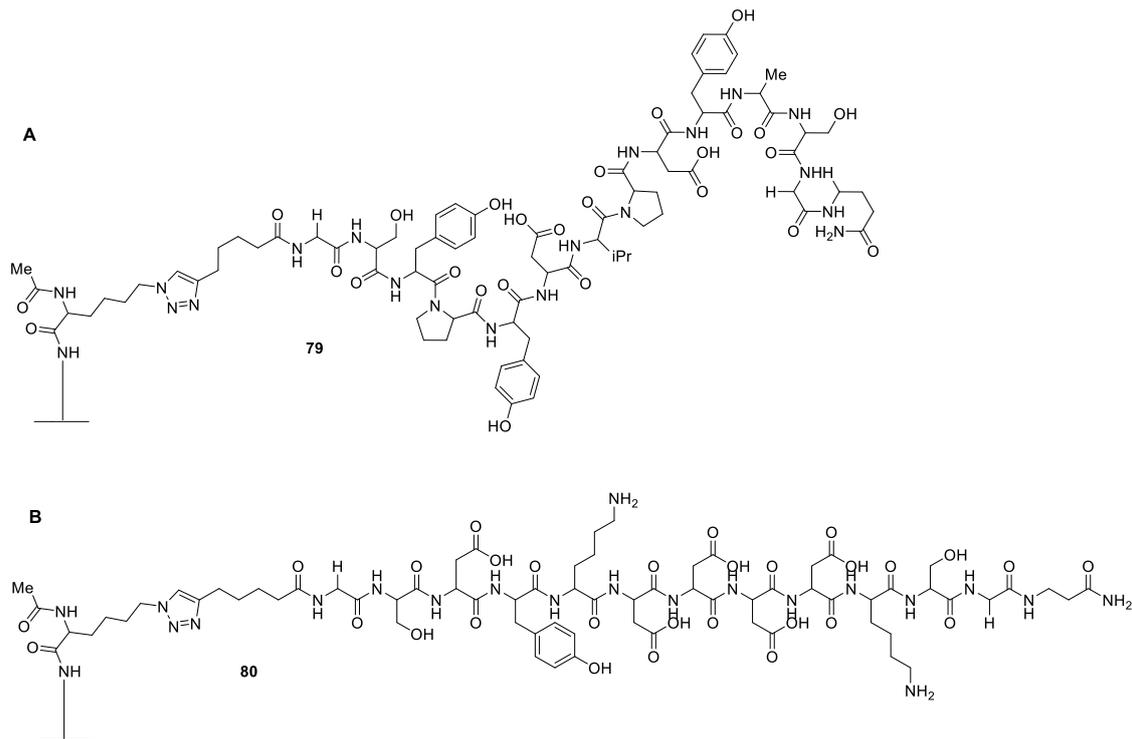
### 3.1.3.2.4.2 Peptidarray-Replika

Das Standardlayout von PEPperPRINT wurde genutzt, das den FLAG-TAG und den HA-TAG besitzt. Als Spacer wurden zusätzlich Glycine und Serine, (GS)<sub>2-5</sub>-Peptid-SG-OH, verwendet, die dem Peptid mehr Flexibilität geben (Array-Layout: 2, Abbildung 18A). Der Array besitzt zusätzlich HA-Mutationen, die entweder mit dem Anti-HA-Antikörper interagieren oder nicht. Für die Peptidtransfer-Experimente wurden jedoch nur die FLAG- und HA-Epitope für die Auswertung hinzugezogen und die HA-Mutationen ignoriert.



**Abbildung 18:** Layout und Fluoreszenzscans (700 nm) (A) Array-Layout 2. Rot: HA-Peptide, grün: FLAG-Peptide, hellrot: HA-Mutationen und hellgrün: FLAG-Mutationen. (B) Immunfärbung eines Transfers (Transferzeit: 6 h) von einem Heptinsäure funktionalisiertem Peptidarray auf einem  $\text{NH}_2\text{-Lys}(\text{N}_3)\text{-10:90-PEGMA-co-MMA}$  Oberfläche mit Anti-HA-DyLight 680. (C) Immunfärbung eines Transfers (Transferzeit: 22 h) von einem Heptinsäure funktionalisiertem Array auf eine  $\text{NH}_2\text{-Lys}(\text{N}_3)\text{-}\beta\text{Ala--10:90 PEGMA-co-MMA}$  Oberfläche mit Anti-HA-DyLight 680. Die Bilder wurden in Helligkeit und Kontrast optimiert.

Für einen Transfer wurde eine  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{Ala-10:90-PEGMA-MMA}$  Oberfläche mit Fmoc-Lys( $\text{N}_3$ )-OH (**110**), HBTU (**14**), DIPEA in DMF umgesetzt. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 20% Piperidin in DMF (v/v) zur spektrometrischen Überprüfung der erfolgreichen Anknüpfung entfernt. Ein entschütztes 10:90-PEGMA-MMA Array wurde mit Heptinsäure, DIC (**6**) und HOBt (**8**) funktionalisiert. Anschließend wurde die Oberfläche acetyliert. Der Array wurde für 24 h mit Ammoniak inkubiert, um die Peptide abzuspalten. Der Array wurde 30 s mit DMF gewaschen und der Transfer mit der manuellen Transfermaschine wurde für 6 h in einer Lösung von  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , Natriumascorbat in DMSO und  $\text{H}_2\text{O}$  durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Immunfärbung mit Anti-HA-DyLight 680. Jedoch wurden keine Peptide detektiert. Aus diesem Grund wurde daraus geschlossen, dass durch den Waschvorgang alle abgespaltenen Peptide weggewaschen wurden. Ein Peptidarray-Transfer von 6 h und 22 h wurde ohne einen Waschvorgang wiederholt und ein positiver Transfer detektiert (Abbildung 18B). Die synthetisierten Peptide der Spots sind in Abbildung 19 dargestellt. Aus diesem Grund können 10:90-PEGMA-MMA Arrays nicht nach der Abspaltung gewaschen werden, sodass es zu einer Drift der Peptide durch das Zusammendrücken kommen kann. Bei einem 22 h Transfer ist zudem eine laterale Diffusion der Peptide detektierbar (Abbildung 18C); sodass kürzere Reaktionszeiten gewählt werden müssen, um gereinigte Arrays mit höheren Peptidspotdichten/ $\text{cm}^2$  zu generieren.



**Abbildung 19:** Synthetisierter (A)  $\beta$ A-GSAYDPVDYPYSG-Heptin-Ac-Lys-Spot **79** und (B)- $\beta$ A-GSKDDDDKYDGS-Heptin-Ac-Lys-Spot **80** via Transfer eines Peptidarrays (Array-Layout: 2) auf eine azidierte R-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-MMA Oberfläche.

### 3.1.3.2.5 Überprüfung des erfolgreichen Übertrages

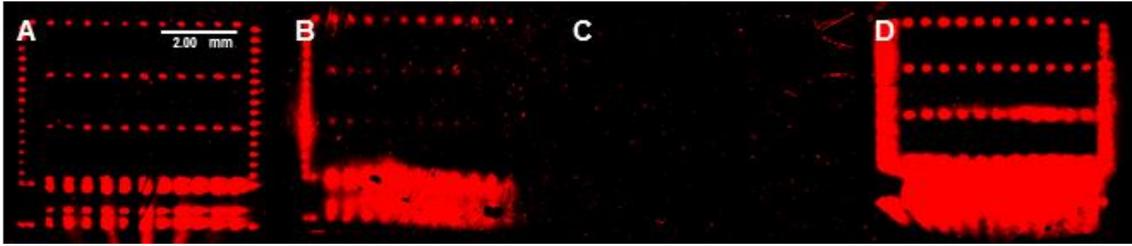
In dieser Versuchsreihe, sollte überprüft werden, ob die detektierten Peptide durch eine kovalente Bindung auf der Oberfläche immobilisiert sind oder ob es sich lediglich um eine unspezifische Einlagerung handelt. Dazu wurde ein Peptidtransfer ohne Zugabe von Kupfersulfat und Natriumascorbat durchgeführt. Eine Anknüpfung im Rahmen des Übertrags sollte im Falle der Triazol-Bildung nur stattfinden, wenn der Kupfer(I)-Katalysator vorhanden ist.

Dazu wurde ein Transferexperiment mit einem alkylierten Array und einer azidierten Oberfläche in DMSO und H<sub>2</sub>O für 6 h, 16 h und 22 h durchgeführt. Nach einer Immunanfärbung konnte im Falle von 6 h und 16 h keine Anknüpfung der Peptide im Rahmen des Übertrags festgestellt werden. Bei der Durchführung innerhalb von 22 h, konnte eine sehr geringe Intensität detektiert werden. Möglicherweise diffundieren die Peptide in die tieferen Schichten des Polymers und lassen sich nicht mehr mittels

Waschschritte entfernen. Bei der Durchführung des Transfers innerhalb von 16 h kann jedoch von einer spezifischen Anknüpfung ausgegangen werden. Die Peptide lassen sich vollständig durch Waschschritte entfernen.

### 3.1.3.2.6 Optimierung der Click-Chemie

In einem neuen Experiment sollten alternative Transfermedien für eine CuAAC verwendet werden, um die Transferausbeuten zu optimieren. Zudem konnte unter der Verwendung von  $\text{CuSO}_4$  und Natriumascorbat teilweise eine Disproportionierung oder eine Oxidation der Cu(I)-Ionen nach einem Transfer festgestellt werden. Dazu wurden parallel vier Transferbedingungen getestet und miteinander verglichen. Vier Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Arrays wurden mit Heptinsäure, HBTU (**14**) und DIPEA in DMF umgesetzt. Anschließend wurden die Schutzgruppen der Seitenketten vor dem Übertrag durch Zugabe von TFA, DCM, TIBS und  $\text{H}_2\text{O}$  entschützt. Dann wurden die funktionalisierten Arrays für 24 h mit Ammoniak, um die Peptide abzuspalten, inkubiert. Die Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90 PEGMA-PMMA Oberflächen wurde mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt und anschließend mit Fmoc-Lys( $\text{N}_3$ )-OH (**110**), DIC (**6**), HOBt (**8**) für 2 h umgesetzt. Ein Transfer auf die azidierten Oberflächen wurde für 6 h durchgeführt. Der erste Transfer wurde wie in den vorherigen Versuchen mit einer Lösung aus  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , Natriumascorbat in DMSO und  $\text{H}_2\text{O}$  durchgeführt. Nach der Immunfärbung konnte ein Transfer festgestellt werden (Abbildung 20A). Im zweiten Experiment wurde einer Lösung von  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , Natriumascorbat, Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin) (TBTA) in DMSO und  $\text{H}_2\text{O}$  verwendet. Das TBTA sollte zusätzlich die Kupfer(I)-Ionen vor Oxidation und Disproportionierung schützen (Abbildung 20 B).<sup>[106]</sup> Die Peptide wurden im Vergleich zum ersten Experiment schlechter transferiert. Möglicherweise ist TBTA als Ligand für die Kupfer(I)-Ionen zu sperrig, um in das Polymer zu diffundieren. Der dritte Transfer wurde in einer Lösung von  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , Natriumascorbat, 2,6-Lutidin in DMSO und  $\text{H}_2\text{O}$  durchgeführt. Es wurde angenommen, das 2,6-Lutidin hilft die Deprotonierung des Alkins zu beschleunigen (Abbildung 20 C).<sup>[104]</sup> Nach der Immunanfärbung konnte jedoch kein Übertrag beobachtet werden. Die Oberfläche wurde trüb, so dass anzunehmen ist, dass die Base 2,6-Lutidin den Polymerfilm zerstörte.



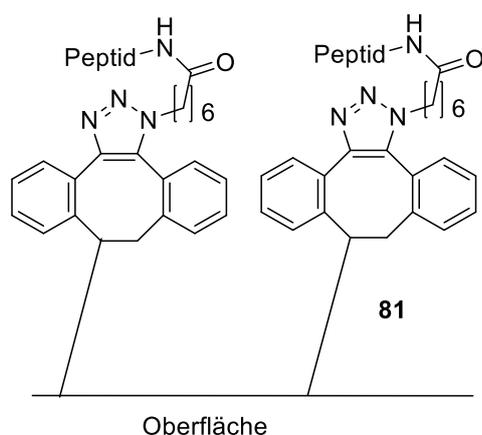
**Abbildung 20:** Fluoreszenzscans von Immunfärbungen nach einem Peptidarraytransfer (Transferzeit: 6 h) von einem Hepinsäure funktionalisiertem Array auf eine Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-βAla-10:90-PEGMA-PMMA Oberfläche mit Anti-HA-DyLight 680. (A) CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat, H<sub>2</sub>O, DMSO. (B) CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat, TBTA, H<sub>2</sub>O, DMSO (C) CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat, 2,6-Lutidin, H<sub>2</sub>O, DMSO (D) CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat, H<sub>2</sub>O, DMSO, 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluorborat. Die Oberflächen wurden parallel gescannt. Die Bilder wurden in Helligkeit und Kontrast optimiert.

Im letzten Transferversuch wurde einer Lösung von CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat, 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluorborat in DMSO und H<sub>2</sub>O verwendet. Die ionische Flüssigkeit sollte hierbei die Cu(I)-Spezies stabilisieren (Abbildung 20D).<sup>[107]</sup> Nach der Immunanfärbung konnte eine deutlich stärkere Fluoreszenzintensität im Vergleich zum ersten Transfer festgestellt werden. Es wurde jedoch eine starke laterale Diffusion festgestellt. Zudem kann ein starker Peptid-Drift detektiert werden, der wahrscheinlich wieder durch das Anpressen in der Transfermaschine entstanden ist. Aus diesem Grund müsste die Reaktionszeit unter der Verwendung einer ionischen Flüssigkeit herabgesenkt werden, um eine geringere laterale Diffusion zu erhalten. Der Versuch wurde mit einer Transferzeit von 2 h wiederholt. Erneut wurde eine starke laterale Diffusion detektiert.

Zusammenfassend ermöglicht die Zugabe einer ionischen Flüssigkeit zum CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O/Natriumascorbat die höchsten Syntheseausbeuten. Auf Grund der starken Diffusion wurde jedoch vorerst ohne die ionische Flüssigkeit weitergearbeitet, um getrennte Peptidspot zu generieren.

### 3.1.3.2.7 Kupferfreie Click-Chemie

Gereinigte Peptidarrays finden nicht nur in Bindungsstudien ihre Anwendung, sondern auch in Zellstudien. Jedoch sind Kupfer-Ionen für Zellen toxisch, sodass eine kupferfreie Click-Chemie vorzuziehen ist.<sup>[96]</sup> Möglicherweise lagern sich Kupferionen während des Transfers in geringen Mengen in die Oberfläche. Aus diesem Grund sollte in einem weiteren Experiment kupferfreie Click-Chemie<sup>[95]</sup> (SPAAC, Kap. 1.11) verwendet werden. Ein 10:90-PEGMA-PMMA Array wurde mit Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH, DIC (**110**) (**6**), HOBt (**8**) umgesetzt. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entfernt und das entstehende freie Amin mit ESA, DIPEA in DMF acetyliert. Anschließend wurden die Schutzgruppen der Seitenketten vor dem Übertrag durch Zugabe von TFA, DCM, TIBS und H<sub>2</sub>O entfernt. Dann wurden die funktionalisierten Arrays für 24 h mit Ammoniak inkubiert. Die Fmoc-NH-βAla-10:90-PEGMA-PMMA Oberflächen wurde mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt und anschließend mit Dibenzocyclooctinsäure, HBTU (**14**), DIPEA in DMF funktionalisiert (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Veranschaulichung des Produktes nach Peptidarray-Transfer *via* SPAAC unter Ausbildung eines Triazols.

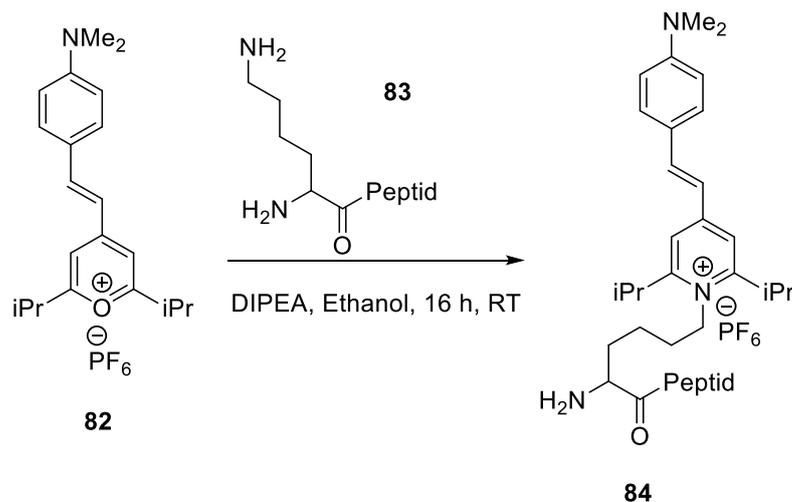
Ein Transfer des azidierten Peptidarrays auf die alkylierte Oberflächen wurde für 6 h in PBS-T durchgeführt. Es konnte lediglich ein sehr schlechter Peptidtransfer *via* Fluoreszenz nach einer Anti-HA-DyLight 680-Inkubation beobachtet werden. In weiteren Experimenten konnten keine zuverlässigen homogenen Transfers detektiert werden. Letztendlich ist die erfolgreiche Durchführung von Arrayreplikaten mit dieser Methode nicht gelungen.

### 3.1.4. Peptidarray-Replika mit fluoreszierenden Molekülen

Die Verwendung von Fluorophoren zur Detektion von chemischen Synthesen ist eine gängige Methode. Ein großes Problem hierbei ist jedoch die starke unspezifische Einlagerung in die Syntheseoberfläche, wodurch ein starker Hintergrund entsteht. Schwache Signale können dann kaum vom Hintergrundsignal unterschieden werden. In vorherigen Arbeiten und in dieser Arbeit konnte bei der Verwendung von 10:90-PEGMA-co-MMA Arrays eine starke Interaktion von zahlreichen Fluorophoren (z.B. TAMRA-NHS, *DyLight* 680-NHS) festgestellt werden. Diese Interaktion wird zusätzlich stark von der Qualität des Polymerfilmes beeinflusst.

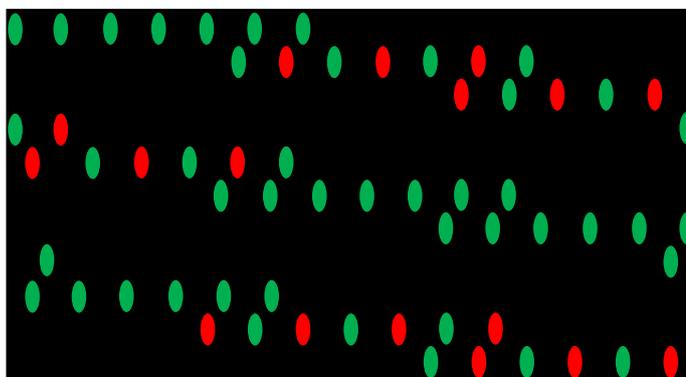
Aus diesem Grund ist der Einbau von fluoreszierenden Molekülen in eine wachsende Polymerkette oder in die Seitenketten der Peptide mit hohen Syntheseausbeuten nicht möglich. Fluorophore müssen hochverdünnt ( $\sim \text{ng} - \mu\text{g/mL}$ ) eingesetzt werden, wodurch keine gute Kupplungsausbeute möglich ist. Gute Kupplungsausbeuten werden erst durch konzentrierter Lösungen ( $\text{mg/mL}$ ) möglich. Aus diesem Grund wurde in vorherigen Arbeiten von Christopher Schirwitz versucht ein Array, der in der Seitenkette mit einem Fluorophor modifiziert wurde, auf eine Goldoberfläche zu transferieren (siehe Kap.1.4.2.). Durch den Transfer sollte der unspezifisch eingelagerte Fluorophor nicht transferiert werden. Ein starker Fluoreszenz-Hintergrund sollte dadurch verschwinden.

Dazu wurde ein Styrylpyrylium-Fluorophor **82** ausgewählt, das spezifisch an das  $\epsilon$ -Amin des Lysins kuppeln kann (Schema 16). Ein Array mit FLAG-TAG und HA-TAG wurde verwendet. Die FLAG-Sequenz besitzt zwei Lysine, an die das Fluorophor binden kann, der HA-TAG besitzt kein Lysin. Bei einem erfolgreichen Transfer können somit nur die FLAG-Sequenzen detektiert werden. Der Array, trug zusätzlich am *N*-Terminus ein Cystein. Der funktionalisierte Array wurde auf eine goldbeschichtete Membran transferiert. In diesem Experiment ist der Übertrag der HA- und FLAG-Peptide gelungen, jedoch konnte der Fluorophor nicht detektiert werden. Möglicherweise wurde die Fluoreszenz durch die Goldoberfläche gequench oder der Fluorophor wurde durch die harschen Transferbedingungen zerstört.



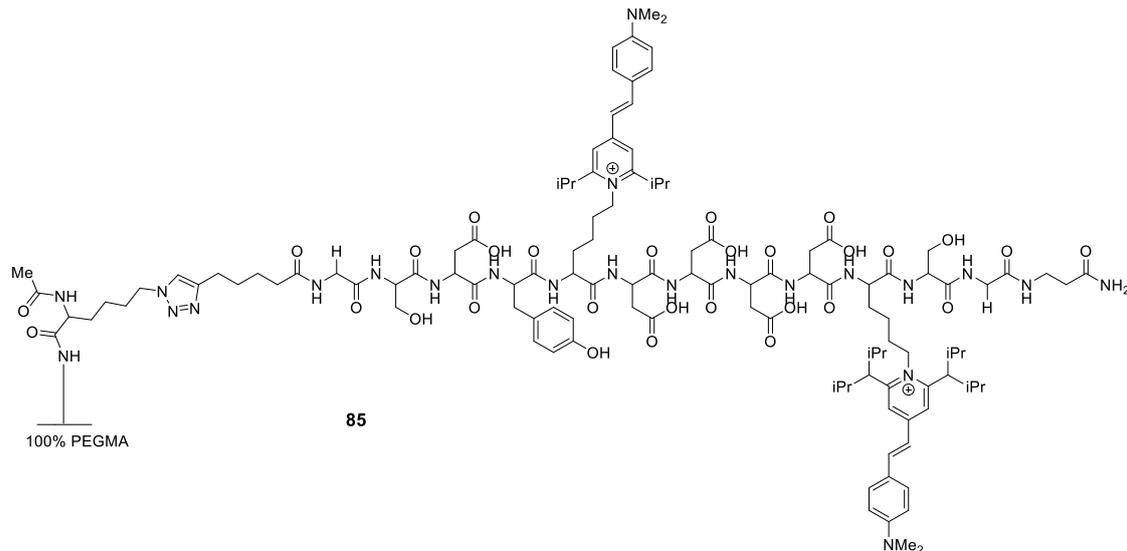
**Schema 16:** Spezifische Anknüpfung eines Styrylpyrylium-Fluorophors **82** an das  $\epsilon$ -Amin des Lysins eines Peptides **83**.

Aus diesem Grund wurde der Versuch mit der neuen Transfermethode *via* Click-Chemie versucht. Dazu wurde ein neues Array-Layout entworfen. Dieses Layout enthält den HA-TAG und den FLAG-TAG. Auf Grund des Syntheseverfahrens befinden sich zudem acetylierte Glycin-Spots in den Zwischenräumen der Peptide (Abbildung 22). Für das Experiment wurde ein 10:90-PEGMA-co-MMA Array mit Heptinsäure, HBTU (**14**) und DIPEA in DMF umgesetzt. Anschließend wurden die Schutzgruppen der Seitenketten durch Zugabe von TFA, DCM, TIBS und H<sub>2</sub>O entschützt. Dann wurde der Array mit dem Fluorophor und DIPEA in Ethanol umgesetzt. Die Anknüpfung des Fluorophors konnte *via* Fluoreszenz in einem Scanner detektiert werden. Ein starker Hintergrund konnte, wie erwartet, festgestellt werden (Abbildung 24).



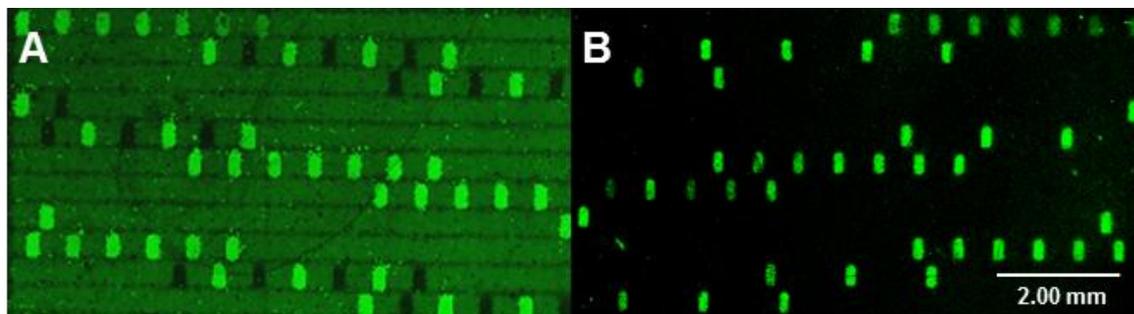
**Abbildung 22:** Layout des Array 3. FLAG-Epitop: grün, HA-Epitop rot, im Zwischenraum schwarz: acetylierte Glycin-Spots (nicht abgebildet).

Dann wurden die funktionalisierten Arrays für 24 h mit Ammoniak, um die Peptide abzuspalten, inkubiert. Die Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-PMMA Oberflächen wurde mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt und anschließend mit Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**), DIC (**6**), HOBt (**8**) für 2 h umgesetzt. Ein Transfer auf die azidierten Oberflächen wurde für 6 h durchgeführt. Ein erfolgreicher Transfer konnte festgestellt werden (Abbildung 24B). Der synthetisierte Peptidspot via Transfer ist in Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23:** Veranschaulichung des gebildeten Produktes nach einem Peptidarray Transfer *via* Click-Chemie.

Der starke Hintergrund (Abbildung 24A) ist verschwunden (Abbildung 24B). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Fluorophore mit den Peptidspots stark interagieren, sodass durch einen Peptidarray-Transfer, weiterhin in einem Spot unspezifisch eingelagerte Fluorophore vorhanden sind, die mit dem Peptid transferiert worden sind.



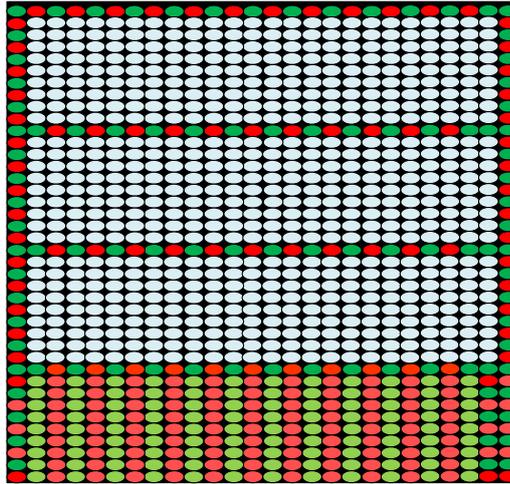
**Abbildung 24:** Fluoreszenzscan. (A) 10:90 PEGMA-PMMA-Array inkubiert mit dem Fluorophor. (B) R-NH- $\beta$ Ala-10:90 PEGMA-PMMA-Oberfläche mit dem transferierten Peptidarray. Die Bilder wurden in Kontrast und Helligkeit optimiert.

Zusammenfassend ist der Transfer von fluoreszierenden Molekülen eine gute Möglichkeit, um den Hintergrund zu minimieren und somit das unspezifisch eingelagerte Fluorophor außerhalb der Peptidspots zu entfernen.

### **3.1.5. Peptidarray-Replika von hunderten Peptiden**

Für den Aufbau von hochdichten Arrays von unterschiedlichen Protein-ähnlichen Strukturen muss ein Peptidtransfer möglichst vieler verschiedener Peptide gewährleistet sein. Aus diesem Grund wurde ein Peptidarray mit 550 unterschiedlichen Peptiden verwendet (FLAG- und HA-Epitope und weitere Peptidsequenzen (teilweise Doppelspots)). Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entfernt und der Array mit Fmoc-Lys-N<sub>3</sub>-OH (**110**) mittels HBTU (**14**), DIPEA in DMF funktionalisiert. Nach einer abschließenden Acetylierung und erneuten Fmoc-Entschützung wurde das freie Amin mit TAMRA-NHS in PBS-T umgesetzt. Der Fluorophor wurde hochverdünnt eingesetzt, um eine unspezifische Einlagerung zu minimieren. Der Fluorophor sollte hierbei eine Detektion mittels Fluoreszenzscanner aller transferierten Peptidsequenzen ermöglichen. Anschließend wurden die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten abgespalten und die Anknüpfung des Fluorophors mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners überprüft (Abbildung 25). Die Peptide zeigten unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten. Diese Unterschiede kommen dadurch zustande:

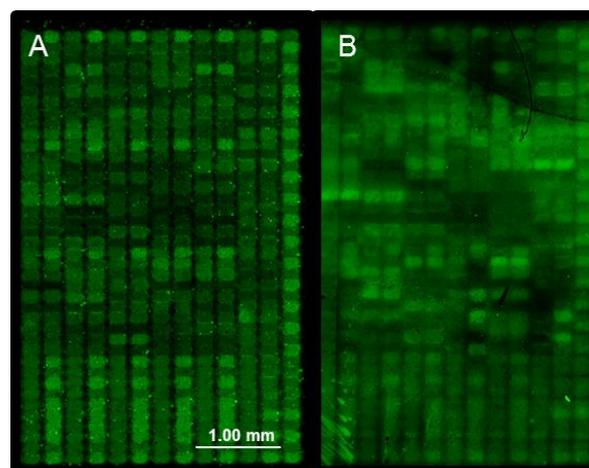
- 1) Jedes Peptid liegt in einer anderen Ausbeute, die mit der Intensität korreliert, in einem Spot vor.
- 2) Die Anknüpfung des TAMRA-NHS kann auf Grund sterisch anspruchsvoller Reste gehindert sein.
- 3) Das Fluorophor lagert sich unspezifisch in die Oberfläche oder in die Peptidspots ein.
- 4) Die Peptidsequenz wurde nicht vollständig synthetisiert und deshalb frühzeitig acetyliert, sodass es keine Fluoreszenz zu detektieren gibt.



**Abbildung 25:** Peptidarray mit Peptidspots (ovale Kreise). Layout: Array 2: rot: HA-Epitop; hellrot: HA-Mutationen; grün: FLAG-Epitop; hellgrün: FLAG-Mutation; weiß: ca. 550 unterschiedliche Peptide.

Die unterschiedlichen Intensitäten, die von vielen Faktoren abhängig sind, und deshalb schwer gedeutet werden können, spielen jedoch für das Experiment keine Rolle. Die Fluoreszenz soll lediglich dazu dienen einen positiven Transfer zu detektieren.

Für das Experiment wurden dann die Peptide mittels  $\text{NH}_3$ -Inkubation abgespalten. Der Peptidarray wurde auf eine alkinylierte R-NH- $\beta$ Ala-10:90 PEGMA-co-MMA Oberfläche, die mit Heptinsäure funktionalisiert wurde, transferiert und *via* Click-Chemie gekuppelt. Die Peptide konnten detektiert werden (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Ausschnitt des Fluoreszenzscans (532 nm) (A) *In situ* erzeugter Peptidarray, der am N-Terminus mit TAMRA markiert wurde (B) TAMRA markiertes Peptidarray-Replika. Die Bilder wurden in Kontrast und Helligkeit angepasst.

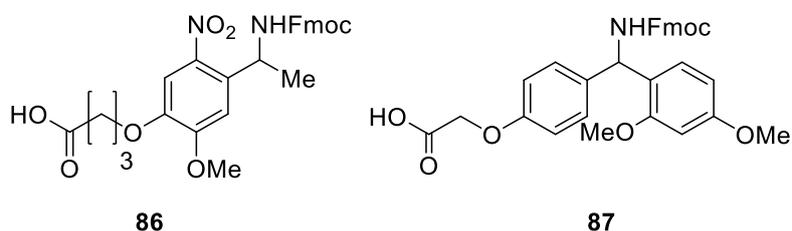
Teilweise wurden Spots ohne eine Fluoreszenz detektiert, sodass von einer zuvor vorliegenden acylierten Sequenz, die nicht transferiert wurde auszugehen ist oder, dass der Transfer des Peptides nicht gelungen ist.

### **3.1.6. Alternative ortsaufgelöste Abspaltbedingungen für Peptidarrays**

Für die ortsaufgelöste Abspaltung der Peptide wurde zuvor Ammoniak verwendet, das eine Abspaltung von ca. 1% der Peptide nach einer vierundzwanzigstündigen Ammoniak-Inkubation ermöglicht.<sup>[57]</sup> Diese Abspaltbedingung ist wahrscheinlich für die Aufreinigung von Peptidarrays geeignet, um abschließend eine Immunosignaturierung durchführen zu können. Geringe Peptidmengen sind wahrscheinlich für eine Interaktion mit den Antikörpern des Serums ausreichend. Bei der Erzeugung einer Protein-ähnlichen Struktur durch einen mehrfachen Peptidarraytransfer (Kap. 1.4.2.) muss jedoch eine möglichst quantitative Abspaltung der Peptide in möglichst kurzer Zeit erfolgen. Um eine Diffusion der Peptide weitestgehend zu vermeiden, ist eine Abspaltmethode in flüssiger Phase ausgeschlossen. Aus diesem Grund ist die Wahl des Linkers stark begrenzt. Die Linker müssen entweder mittels Bedampfung abgespalten werden oder photochemisch, um eine Diffusion zu vermeiden. In den ersten Versuchen sollten zwei Linker, die bereits in der Oberflächenchemie eingesetzt werden,<sup>[54a, 108]</sup> auf den ausgewählten Fmoc-NH- $\beta$ Ala-100% PEGMA Oberflächen getestet werden.

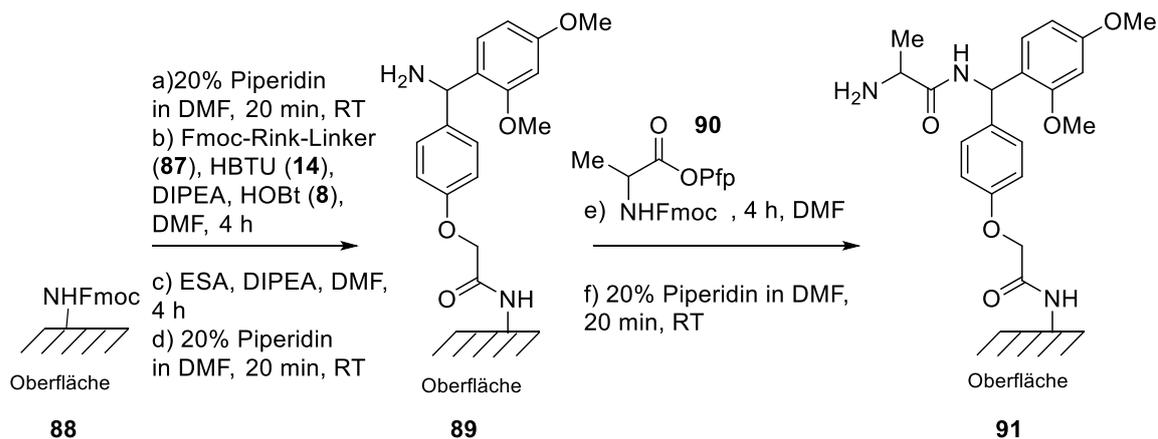
Der Rink-Amid-Linker (**87**)<sup>[109]</sup> ermöglicht eine säurelabile Abspaltung der Peptide, indem der Array mit TFA-Dampf inkubiert wird (Abbildung 27). Die Abspaltung führt jedoch gleichzeitig zur Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen.<sup>[54a]</sup> Bei einem Peptidtransfer könnten die abgespaltenen voluminösen Schutzgruppen die Übertragung behindern. Zudem kann es auf Grund des Dampfes zu einer lateralen Diffusion der Peptide auf dem Array führen. Aus diesem Grund wurde auch der Fmoc-Photo-Linker (**86**) (PL) getestet, der eine lichtinduzierte Abspaltung der Peptide ermöglicht. Die UV-Bestrahlung der Oberfläche bei 365 nm führt zu einer Abspaltung der Peptide vom Photo-Linker (**86**).<sup>[110]</sup> Diese trockene Abspaltbedingung hat den Vorteil, dass es zu fast keiner Diffusion der Peptide kommen kann. Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass die Abspaltung z.B. an

einer Cellulosemembran auf Grund der hohen Derivatisierung nur mit niedrigen Ausbeuten verläuft.<sup>[70]</sup>



**Abbildung 27:** Darstellung des Fmoc-Photo-Linkers (PL) (**86**) und des Fmoc-Rink-Amid-Linkers (**87**).

Um die Effizienz der Anknüpfung und der Abspaltung der Linker zu testen, wurde die Oberflächenderivatisierung spektroskopisch bestimmt. Die Derivatisierung wurde durch das bei der Fmoc-Entschützung entstandene Dibenzofulven-Piperidin Addukt über das Lambert-Beer'sche Gesetz bestimmt.<sup>[10]</sup> Dazu wurden Fmoc-NH- $\beta$ Ala-100%-PEGMA Oberflächen, die mit einem Fmoc-Alanin-OPfp (**90**) verestert wurden, verwendet. In vorherigen Arbeiten von Jakob Striffler und Christopher Schirwitz wurde bereits gezeigt, dass die erhaltenen Derivatisierungsgrade extrem schwanken, sodass die ermittelten Werte nur zu einer Abschätzung der Derivatisierung genutzt werden können.<sup>[100, 111]</sup> Sogar die gleiche Charge der genutzten Polymer-Oberflächen zeigten hierbei unterschiedliche Extinktionen. Die Fmoc-NH- $\beta$ Ala-100% PEGMA Oberfläche wurde mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt und die Absorption des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes (DFPA) bestimmt. Aus vorherigen Arbeiten war bereits bekannt, dass die Ausbeute der Anknüpfung von OPfp-aktivierten Aminosäuren in hohen Ausbeuten zwischen 95% und 100% an die Oberfläche erfolgt.<sup>[10]</sup> Da keine voraktivierten Linker kommerziell erhältlich sind, mussten die Carboxyl-Gruppen aktiviert werden. Aus diesem Grund wurde der Rink-Amid-Linker und der Fmoc-Photo-Linker mittels HBTU (**14**), DIPEA in DMF für 2 h an den freien *N*-Terminus der Oberfläche gekuppelt, die Oberfläche mit ESA, DIPEA in DMF acetyliert und erneut die Absorption bestimmt (Schema 17). Die Anknüpfung des Fmoc-Rink-Linkers (**87**) erfolgte mit Ausbeuten zwischen 80% und 85%. Die Anknüpfung des Fmoc-Photo-Linkers (**86**) hingegen nur mit 67% bis 74%. Aus diesem Grund wurde das Experiment mit längeren Kupplungszeiten (16 h) wiederholt. Es konnten Ausbeuten bis zu 86% (Fmoc-Photo-Linker (**86**)) und für den Fmoc-Rink-Amid-Linker (**87**) bis zu 95% erreicht werden.



**Schema 17:** Funktionalisierung einer Oberfläche mit dem Rink-Linker (**37**) und Alanin **90** als Spacer.

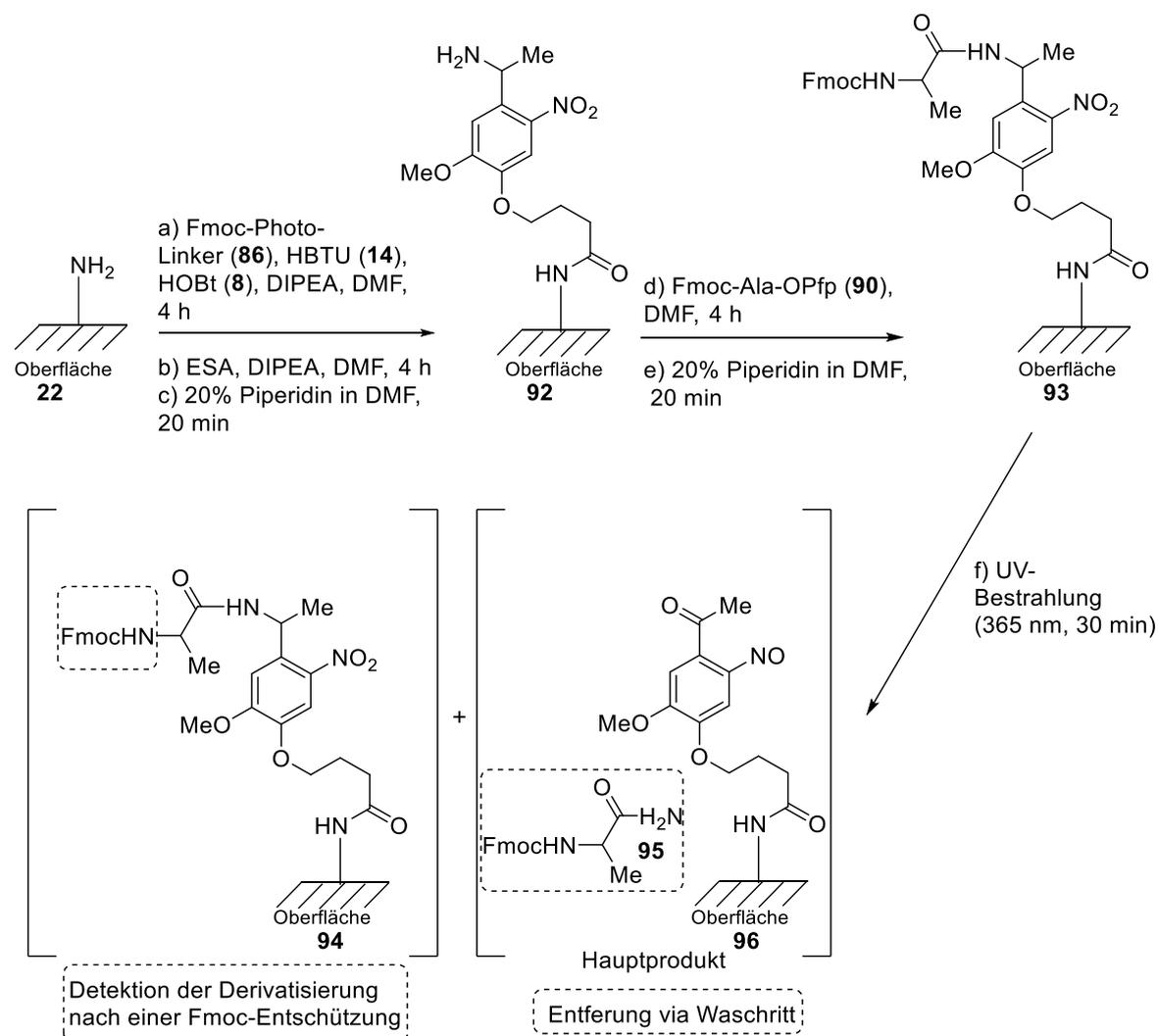
Das gleiche Experiment wurde für Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90 PEGMA-co-MMA Oberflächen durchgeführt. Jedoch wurde die Reaktionszeit von Beginn an auf 16 h erhöht. Die Anknüpfung des Fmoc-Rink-Amid-Linkers (**87**) wurde jedoch mit Pentafluorophenol (**10**), DIC (**6**) in DMF<sup>[108]</sup> durchgeführt und der Fmoc-Photo-Linker (**86**) wie zuvor mit HBTU (**14**), DIPEA in DMF gekuppelt. Die Anknüpfung des Rink-Linkers (**87**) erfolgte mit Ausbeuten von 96% bis 100%. Die Anknüpfung des Photo-Linkers (**86**) mit Ausbeuten von 86% bis 95%. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Kupplungsausbeuten der Linker.

<b>Ausbeute</b>	<b>Rink-Linker</b>	<b>Photo-Linker</b>
<b>10:90 PEGMA-co-MMA</b>	96% – 100%	86% – 95%
<b>100% PEGMA</b>	< 95%	< 86%

In einem weiteren Experiment wurde nun die Abspalteffizienz an den Fmoc-NH- $\beta$ Ala-100-PEGMA Oberflächen bestimmt. Dazu wurden zuerst der Photo-Linker (**86**) oder der Rink-Linker (**87**) an die Oberflächen gekuppelt und die Derivatisierung spektroskopisch bestimmt. Abschließend wurde Fmoc-Ala-OPfp (**90**) für 4 h (die Anknüpfung an die Linker erfolgt mit Ausbeuten zwischen 95% – 100%) gekuppelt. Die Oberflächen, die mit dem Rink-Amid-Linker (**87**) funktionalisiert wurden, wurden für 1 h mit TFA-Dampf inkubiert, um die Aminosäure abzuspalten. Eine Abspaltung der Aminosäure vom Photo-Linker (**86**) wurde durch Belichtung unter einer UV-Lampe (365nm/8.50 mW/cm<sup>2</sup>) für 90 min erzeugt. Lange Abspaltbedingungen wurden gewählt, da die Fmoc-NH- $\beta$ Ala-100% PEGMA Oberflächen eine Derivatisierung von (2.00 – 4.00 nmol pro cm<sup>2</sup>) aufweisen und zudem der PEGMA-Film ca. 80 – 120 nm dick sein kann.<sup>[100]</sup> Die Oberflächen wurden dann mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt, um die Menge an noch vorhandenem Fmoc-Alanin, das nicht abgespalten wurde, zu bestimmen (Schema 18).

Aus den ermittelten Absorptionen vor der Anknüpfung des  $\beta$ -Alanins und nach der Abspaltung wurde die Abspalt-Effizienz berechnet. Die Derivatisierung nahm unter Verwendung des Photo-Linkers um 53% – 44% und unter Verwendung des Rink-Amid-Linkers (**87**) um 80% – 70% ab. Da die gemessenen Absorptionen nach der Abspaltung sehr gering sind, können die Ergebnisse nur für eine Einschätzung der Abspaltungseffizienz angesehen werden. Zudem wird von einer Kupplungsausbeute des  $\beta$ -Alanin von 100% ausgegangen, wodurch das Ergebnis zusätzlich nicht der Realität entspricht.



**Schema 18:** Detektion der Abspalt-Effizienz am Beispiel des Fmoc-Photo-Linkers (**86**).

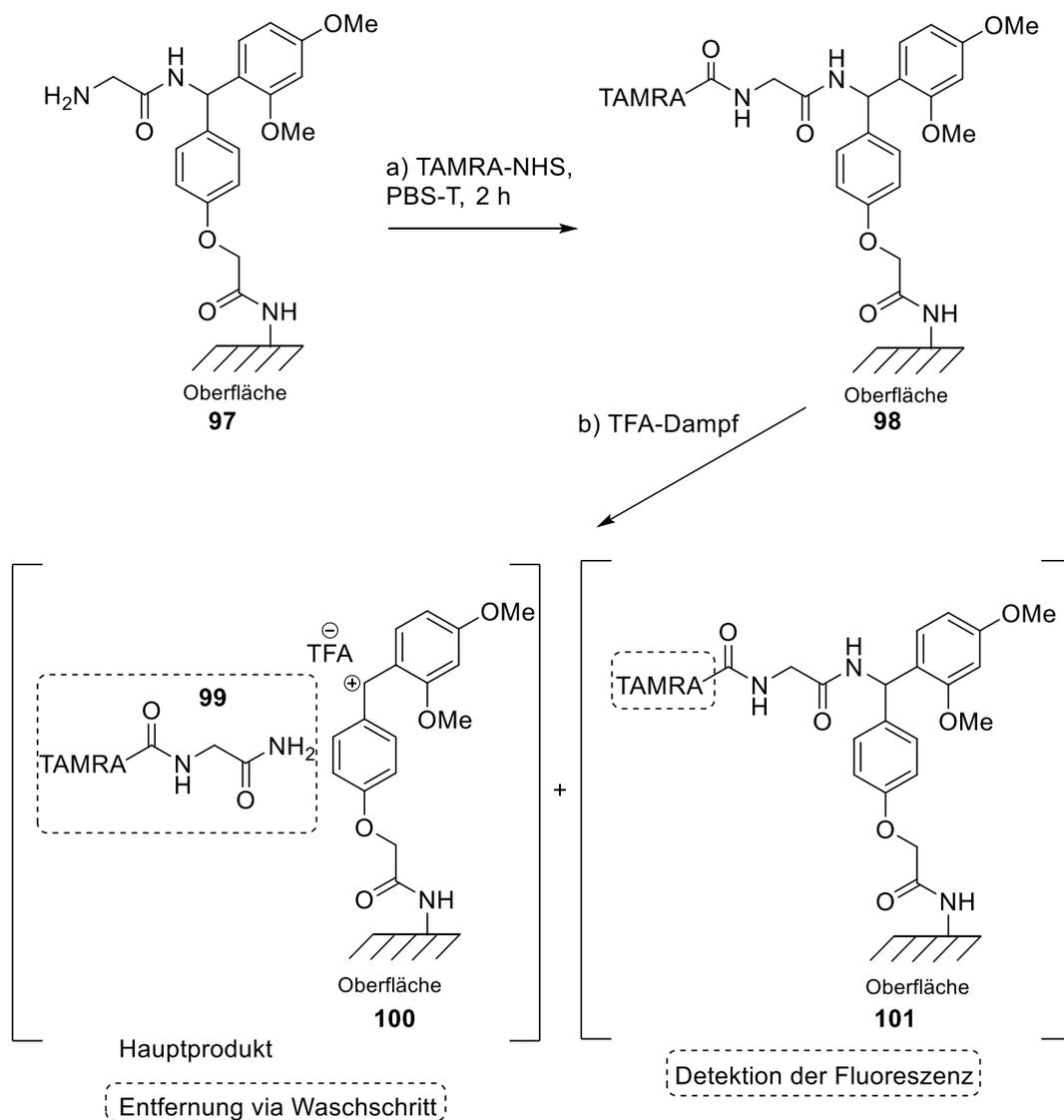
Die Abspaltung des Alanins vom Photo-Linker (**86**) erfolgte, wie erwartet, in schlechten Ausbeuten, da der Polymerfilm sehr dick ist und das UV-Licht möglicherweise nicht die tieferen Schichten des Polymers erreicht, da die Nitrosoaromaten der obersten Lagen, die bei der Abspaltung gebildet werden, dieses stark absorbieren. Die Verwendung einer UV-Lampe mit 15 W oder längere Belichtungszeiten führten zu keiner höheren Abspaltung. Im Vergleich ist eine vollständige Abspaltung vom Photo-Linker (**86**), der auf einer Cellulosemembran immobilisiert ist, mit einer Derivatisierung kleiner  $150 \text{ nmol/cm}^2$ , möglich.<sup>[108]</sup>

Die Arbeit mit dem Photo-Linker auf Fmoc-NH- $\beta$ Ala-100% PEGMA Oberflächen wurde eingestellt, da keine stärkere UV-Lampe zur Verfügung stand und keine zufriedenstellende Abspalteffizienz erhalten werden konnte.

Die Abspaltung der Peptide vom Rink-Amid-Linker (**87**) erfolgte jedoch in hohen Ausbeuten, sodass mit diesen Oberflächen weitergearbeitet wurde. Das Abspalt-Experiment wurde mit dem Rink-Amid-Linker (**87**) wiederholt, um herauszufinden, wie lange eine TFA-Inkubation notwendig ist, um eine hohe Abspaltung zu erhalten. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine Inkubation von mehr als 30 min notwendig ist um eine Ausbeute der Abspaltung von größer als 70% zu erhalten.

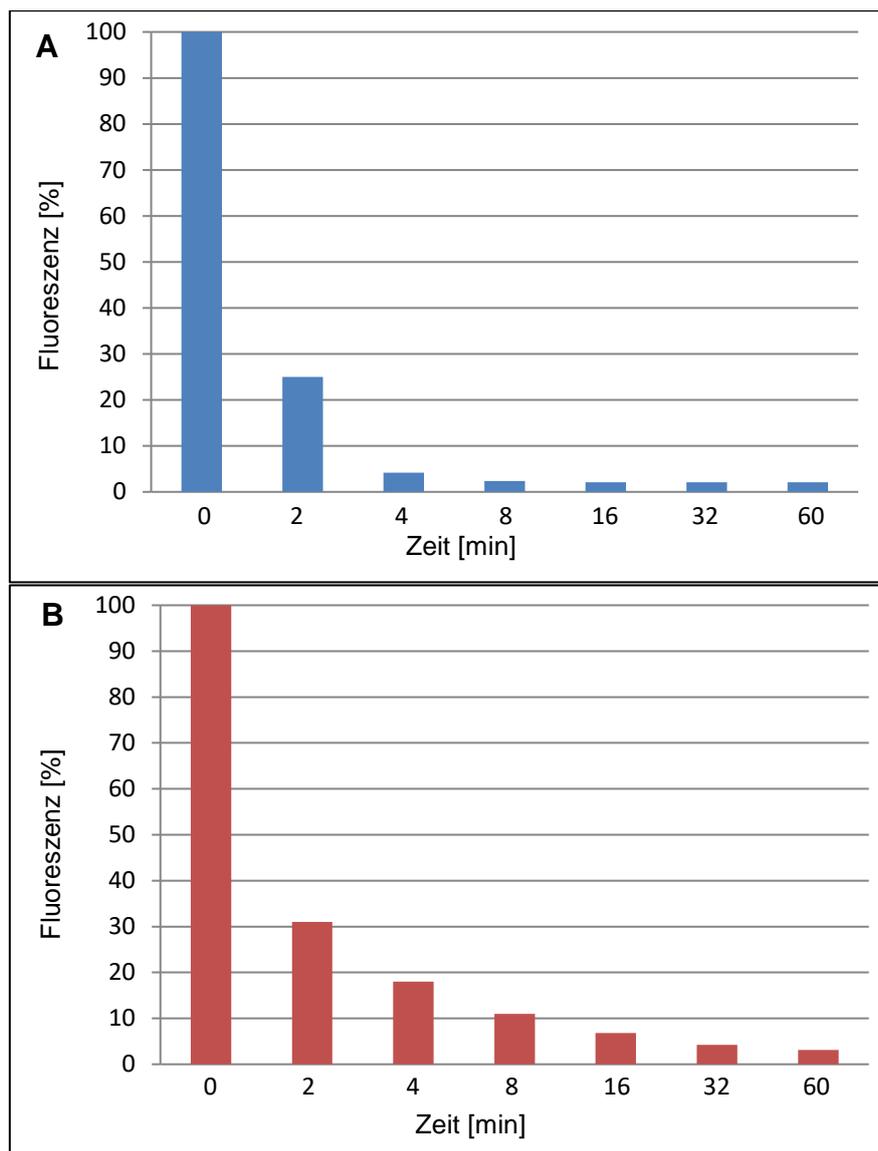
Die Abspaltung vom Photo (**86**)- und Rink-Linker (**87**) wurde in einem weiteren Experiment auf Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen getestet. Das Experiment konnte nicht analog des Experimentes der 100% Oberflächen durchgeführt werden, da die Derivatisierung der Oberfläche viel zu gering sind, wenn eine Abspaltung stattfindet. Die gemessenen Extinktionen liegen in der Nähe der Nachweisgrenze des Photometers. In vorherigen Arbeiten von Jakob Striffler konnte bereits gezeigt werden, dass die Bestimmungen bei zu kleinen Derivatisierungsgraden durch systematische Fehler schlecht reproduzierbar sind.<sup>[100, 111]</sup> Die Detektion sollte mittels Fluoreszenz erfolgen. Jedoch können die Ergebnisse auch hier nicht quantitativ angegeben werden, da zahlreiche Parameter z.B. die unspezifische Einlagerung der Fluorophore, die unterschiedliche Handhabung der Proben etc. die Ergebnisse stark beeinflussen. Das Experiment sollte hierbei nur dazu genutzt werden, um einen Abspalttendenz zu erhalten (Schema 19).

Aus diesem Grund wurde eine Oberfläche, die mit dem Rink-Amid- (**87**) oder Photo-Linker (**86**) funktionalisiert wurde, Fmoc-entschützt und mit Fmoc-Gly-OPfp (**102**) funktionalisiert und abschließend acetyliert. Das immobilisierte Fmoc-Glycin wurde abschließend mit einer UV-Lampe (365 nm, 13.0 mW/cm<sup>2</sup>) für 0 min, 2 min, 4 min, 8 min, 16 min, 32 min oder 1 h abgespalten. Dann wurde gewaschen und nach einer Fmoc-Entschützung TAMRA-NHS als Fluorophor angeknüpft und die Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzscanner detektiert (Abbildung 28).



**Schema 19:** Ermittlung der Abspalteffizienz von einem Photo-Linker (**86**) via Fluoreszenzdetektion.

Die Abspaltung vom Photo-Linker (**86**) erfolgte innerhalb 4 min mit einer Effizienz von größer 90%. Beim Rink-Linker (**87**) wurde die Oberfläche mit TFA-Dampf für 0 min, 2 min, 4 min, 8 min, 16 min, 32 min oder 1 h inkubiert. Für die Rink-Oberfläche ist für eine Abspalteffizienz von größer als 90% ca. 10 min notwendig. Jedoch können nach bereits 4 min gute Ergebnisse von größer als 80% erzielt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.



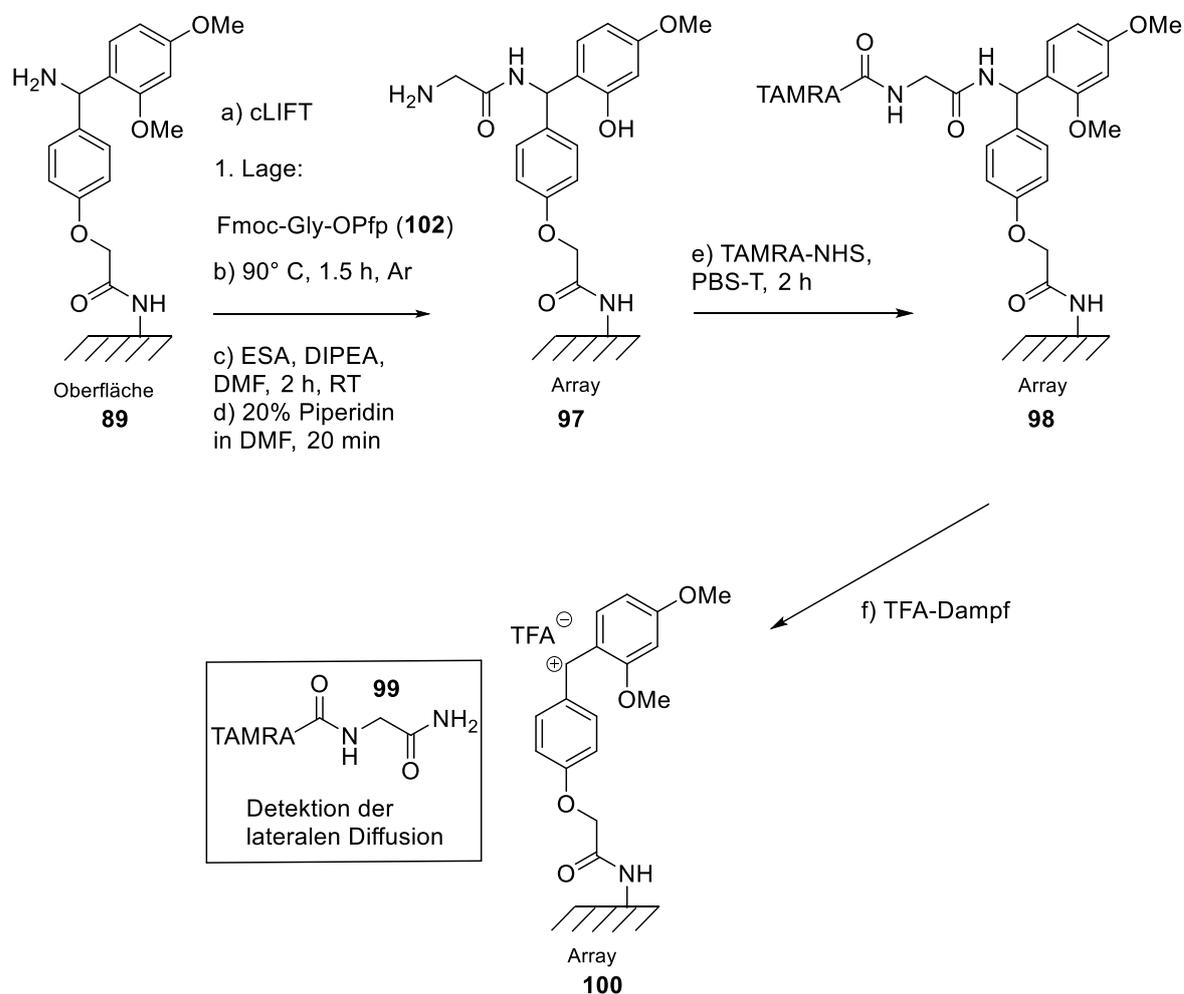
**Abbildung 28:** Darstellung der Abspalteffizienz an Hand der Fluoreszenzabnahme von TAMRA, das nach der Abspaltung an die noch freien Amine geknüpft wurde von einem (A) Photo-Linker (86) und (B) einem Rink-Amid-Linker (87).

**Tabelle 3:** Notwendige Abspaltbedingungen, um hohe Abspalteffizienzen zu erhalten.

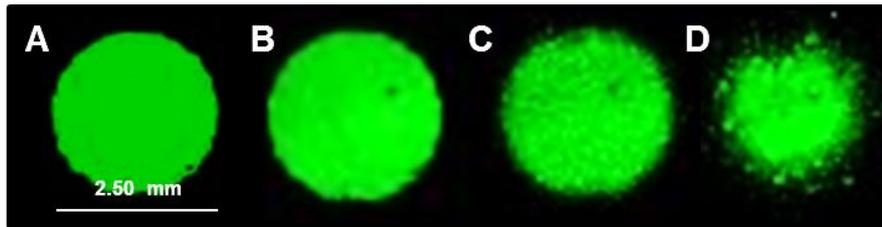
Notwendige Abspaltbedingungen	Rink-Linker (87)	Photo-Linker (86)
<b>10:90-PEGMA-co-MMA</b>	4 min < 80%	4 min < 90%
<b>100% PEGMA</b>	30 min < 80%	90 min < 60%

## 60 Hauptteil

In einem weiteren Experiment wurde nun die Diffusion eines abgespaltenen Moleküls bei der Inkubation mit TFA-Dampf detektiert. Im Falle einer Fmoc-NH- $\beta$ Ala-100% PEGMA Oberfläche müsste die Oberfläche 30 min inkubiert werden, hingegen bei der Verwendung einer Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche nur 4 min. Eine Diffusion ist bei langen Inkubationszeiten wahrscheinlich. Dazu wurde ein Peptidarray mit dem in Kap. 1.4.1. beschrieben cLIFT-Verfahren generiert. Dazu wurde eine Rink- $\beta$ Ala-10:90 PEGMA-co-MMA Oberfläche mit Fmoc-Gly-OPfp (**102**) vorstrukturiert. Nach einer Acetylierung mit ESA, DIPEA in DMF und einer abschließenden Fmoc-Entschützung mit Piperidin in DMF (v/v), wurde TAMRA-NHS in PBS-T an die freien Amine gekuppelt (Schema 20).



**Schema 20:** Detektion der Diffusion des abgespaltenen Rohproduktes vom Rink-Amid-Linker (**87**) nach einer TFA-Inkubation *via* Fluoreszenz.



**Abbildung 29:** Fluoreszenzscan (532 nm) nach einer TFA-Inkubation zur Abspaltung von einem Rink-Amid-Linker (**87**). (A) 0 min TFA-Dampf. (B) 2 min TFA-Dampf. (C) 7 min TFA-Dampf und (D) 17 min TFA-Dampf. Die Bilder wurden in Kontrast und Helligkeit angepasst.

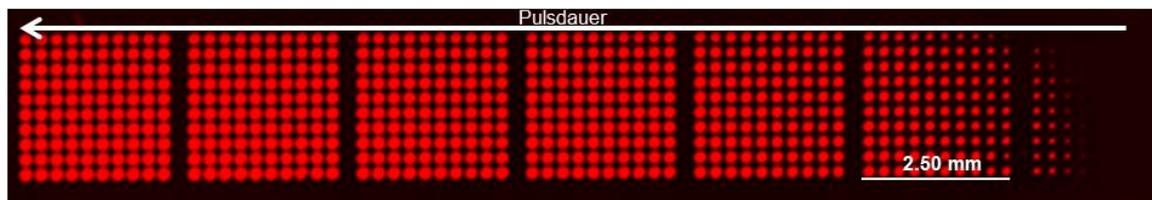
Das Fluoreszenzbild der Oberfläche wurde aufgenommen (Abbildung 29A). Abschließend wurde die Oberfläche 2 min mit TFA-Dampf inkubiert und dann sofort das restliche TFA von der Oberfläche im Hochvakuum entfernt. Die Oberfläche wurde erneut gescannt (Abbildung 29B). Der Peptidspot ist leicht verschwommen, sodass von einer geringen Diffusion auszugehen ist. Der Versuch wurde für weitere 5 min (Abbildung 29C) und 10 min wiederholt (Abbildung 29D). Nach 17 min wurde eine starke Diffusion beobachtet. Aus diesem Grund sollte die Oberfläche nur kurz mit TFA-Dampf inkubiert werden.

Zusammenfassend ist eine Abspaltung von einem Molekül vom Photo-Linker (**86**) von einer R-NH- $\beta$ Ala-100% PEGMA-Oberfläche mit einer 15.0 W Lampe unvollständig, hingegen reicht bei einer 10:90 PEGMA-co-MMA Oberfläche eine kurze Belichtungszeit ca. 4 min aus, um eine Abspaltung größer als 90% abzuschließen. Die Abspaltung von einem Molekül vom Rink-Amid-Linker (**87**) auf einer R-NH- $\beta$ Ala-10:90 PEGMA-co-MMA Oberfläche gelingt innerhalb von 10 min. Jedoch muss die Reaktionszeit verkürzt werden, damit es nicht zu einer Diffusion der abgespaltenen Peptide kommen kann. Eine Inkubation von 4 min sollte nicht überschritten werden. Bei einer R-NH- $\beta$ Ala-100-PEGMA Oberfläche muss mindestens 30 min mit TFA Dampf inkubiert werden um eine ausreichende Abspaltung kleiner 80% zu erreichen. Somit ist die Methode für diese Oberfläche nicht geeignet, da die Peptide lateral diffundieren würden und eine orts aufgelöste Abspaltung dadurch nicht erhalten werden kann. In weiteren Experimenten wurde deshalb im Fall des Fmoc-Photo-Linkers (**86**), 30 min belichtet und bei der Verwendung des Rink-Amid-Linkers (**86**) max. 4 min mit TFA inkubiert.



Fmoc-Gly-OPfp (**102**) wurde auf die Akzeptor-Oberflächen transferiert und für 90 min bei 90 °C im Ofen zur Reaktion gebracht. Mittels ESA, DIPEA in DMF wurden die noch vorhandenen freien Amine acetyliert. Nach der Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Fmoc-Serumpeptid (SGSMVPEFSGSFPMRG) mit HBTU (**14**), DIPEA, HOBt (**8**) in DMF über Nacht an die freien Amine geknüpft. Anschließend wurden die Schutzgruppen mittels TFA, TIBS, H<sub>2</sub>O und DCM in 1.5 h entfernt.

Abschließend wurde die Serumfärbung durchgeführt und abschließend ein Fluoreszenzscan bei 632 nm durchgeführt, um den Sekundärantikörper Anti-IgG-DyLight 680 zu detektieren. Ein Peptidarray konnte erfolgreich generiert werden (Abbildung 30). Das Peptid, das aus Lösung aufgebracht wurde, lagerte sich nicht unspezifisch in die Oberfläche ein.



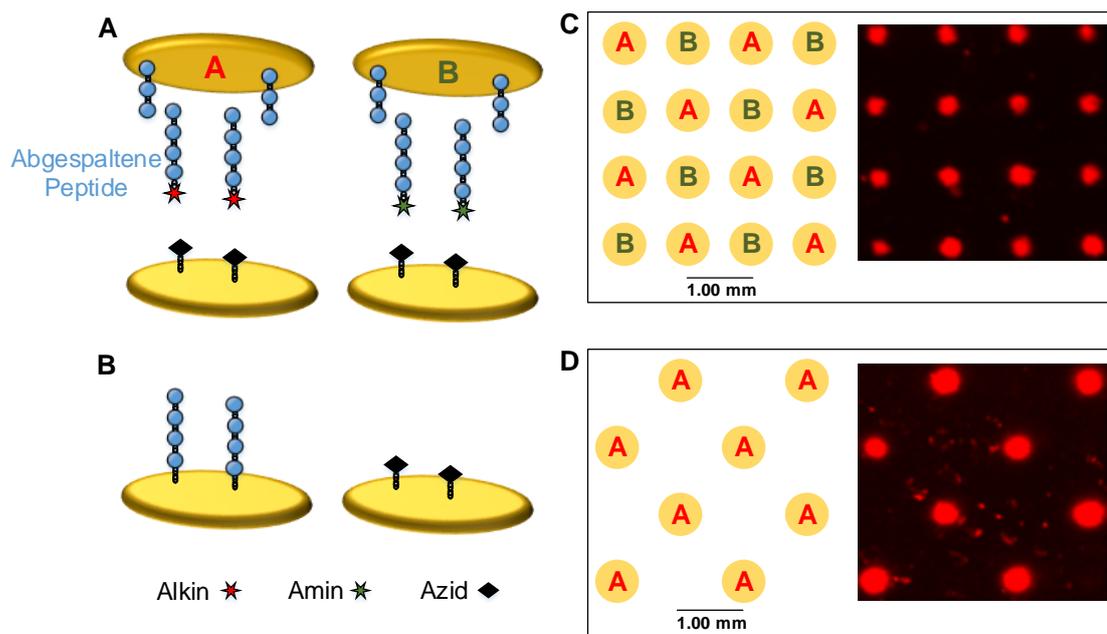
**Abbildung 30:** Fluoreszenzscan (632 nm) nach der Durchführung einer Serumfärbung eines mit der cLIFT-Methode vorstrukturierten Peptidarrays (*Pitch* 250 µm, Bestrahlungsdauer: 0.10 ms – 1.00 ms, Laser Layout: 4).

### 3.1.8. Serum-Färbungen mit transferierten Peptidarrays

In einem weiteren Experiment, sollten nun ein Serumarray mit der cLIFT-Methode auf einem Photo-Linker (**86**) erzeugt werden. Auf die Verwendung des Rink-Amid-Linkers wurde verzichtet, da wie in Kap 3.1.6. beschrieben wurde nur sehr kurze TFA-Inkubationen durchgeführt werden können, um eine Diffusion zu vermeiden. Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass ein Transfer ohne Kupfer(I)-Ionen innerhalb von 16 h zu keinem positiven Transfer führte. Um herauszufinden, ob der Transfer unter der Verwendung von den Kupfer(I)-Ionen auch spezifisch ist, wurde ein Schachbrettmuster (31B) Array generiert, wobei nur der Peptid-Spot **A** am *N*-Terminus ein Alkin tragen sollte und der Peptid-Spot **B** hingegen nur ein Glycin (Abbildung 31).

Zudem sollte das Experiment genutzt werden, um einen Serumarray zu transferieren und anschließend eine Immunfärbung mit einem menschlichen Serum durchführen zu können.

Diese Methode ermöglicht die Aufreinigung, die für Bindungsstudien eine wichtige Rolle spielt (siehe Kap. 1.4.2.), von *in situ* generierten Peptidarrays mit abschließender Immunfärbung. Dazu wurde eine Fmoc-geschützte 10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt und die freien Amine mit dem Fmoc-Photo-Linker (**86**) unter der Verwendung von HBTU (**14**), DIPEA, HOBt (**8**) in DMF funktionalisiert.



**Abbildung 31:** (A) Transfer eines Arrays mit Spot A (Peptid und Alkin) und Spot B (Peptid und Glycin) auf eine azidierte Oberfläche *via* Click Chemie. (B) Transferierter Array (Arrayreplikat), nur die alkinylierten Peptide wurden transferiert. (C) Ausschnitt des Musters des Arrays und Immunfärbung des Arrays und Detektion *via* des sekundären Antikörpers-*DyLight* 680. (D) Ausschnitt des zu erwartenden Musters des transferierten Arrays und Immunfärbung und Detektion *via* des sekundären Antikörpers-*DyLight* 680. Die Bilder wurden in Kontrast und Helligkeit angepasst. <sup>[112]</sup>

Nach einer Acetylierung mit ESA, DIPEA in DMF und anschließender Fmoc-Entschützung wurde die Oberfläche mit der cLIFT Methode und abschließender Kupplung im Ofen vorstrukturiert (Laser-Layout: 2, markierte Oberfläche). Spot A und B wurden mit Fmoc-Gly-OPfp (**102**) funktionalisiert. Das Peptid (SGSMVPEFSGSFPMRG)<sub>p</sub> wurde als Modelpeptid gewählt, da es als ein Binder eines spezifischen menschlichen Antikörpers gefunden wurde.<sup>[5c]</sup> Es wurde mit HBTU (**14**), DIPEA, HOBt (**8**) in DMF an die freien Amine gekuppelt. Nach der Acetylierung und der Fmoc-Entschützung wurde der Spot A mit der cLIFT-Methode und abschließender

Kupplung im Ofen mit Fmoc-Propargylglycin und der Spot **B** mit Fmoc-Gly-OPfp (**102**) funktionalisiert. Die Peptide des Arrays wurden *via* UV-Bestrahlung abgespalten. Der Array wurde auf eine Ac-Lys-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche transferiert und *via* Click-Chemie gekuppelt. Abschließend wurden die Schutzgruppen der Seitenketten mit TFA, TIBS, H<sub>2</sub>O in DCM entfernt. Der transferierte Array wurde mit einem menschlichen Serum inkubiert und mittels eines sekundären Antikörpers-*DyLight* 680 wurde der Transfer *via* Fluoreszenz detektiert. <sup>[112]</sup>

Das azidierte Serumpeptid in Spot **A** konnte erfolgreich transferiert und gekuppelt werden, hingegen wurde das Peptid in Spot **B** nicht detektiert und somit nicht gekuppelt. Die Inkubation des transferierten Arrays mit einem menschlichen Serum führte zu einer erfolgreichen Wechselwirkung des spezifischen Antikörpers im Serum und des immobilisierten Peptids. Während des Transfers kam es zu einer geringen lateralen Diffusion der Spots.

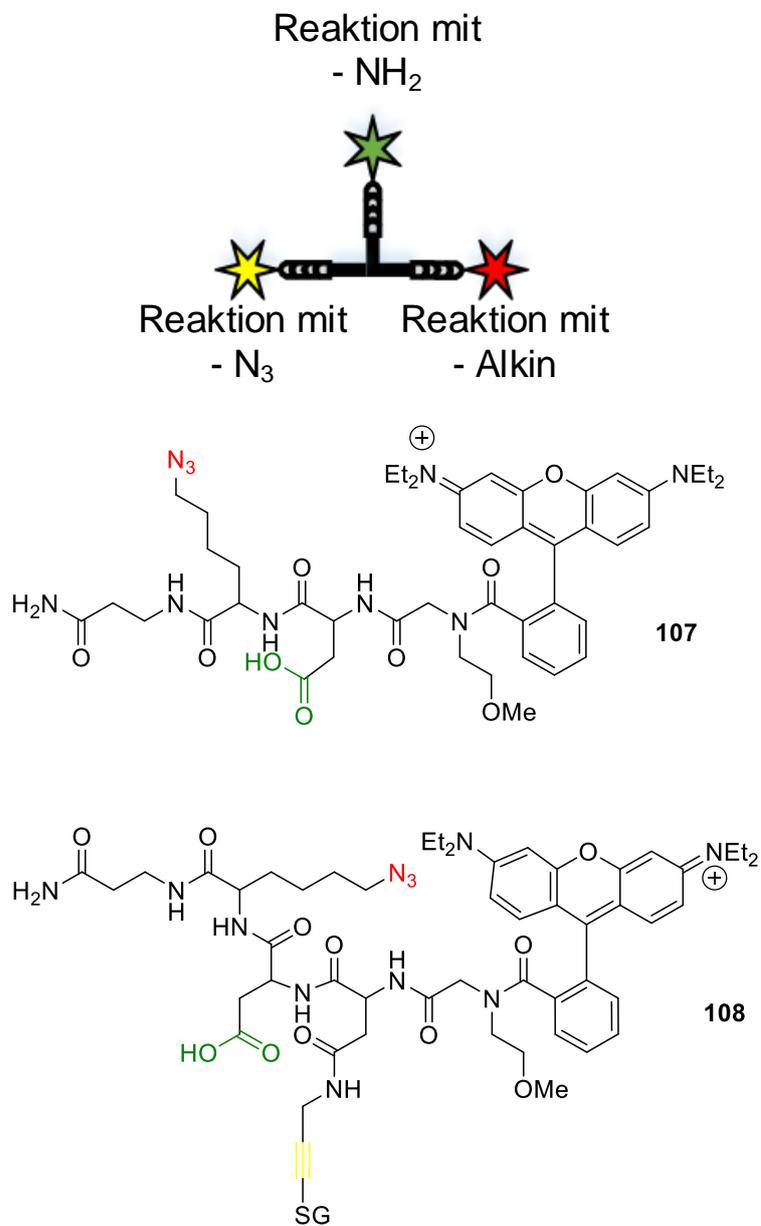
Zusammenfassend, wurde mit der Click-Chemie eine gute Methode gefunden, um Peptidarrays spezifisch und zuverlässig zu transferieren und zu kuppeln. Während des Transfers kommt es zu einer geringen lateralen Diffusion.

### 3.1.9. Synthese von multifunktionalen Linkern

Für die Synthese von Protein-ähnlichen Strukturen sollte nun, nachdem geeignete funktionelle Gruppen für mögliche multifunktionale Linker gefunden worden sind, zuerst ein bifunktionaler Linker synthetisiert werden. Dieser bifunktionale Linker kann später zu einem trifunktionalen Linker erweitert werden. An den Linker sollte ein Fluorophor angebracht werden, der das erfolgreiche Kuppeln des Linkers an einen Peptid-Array bestätigen sollte.

Jedoch ist zu beachten, dass sich Fluorophore auf Peptidarrays, die auf einem Polymer aufgebaut werden, unspezifisch einlagern können (siehe Kap. 3.1.4.). Aus diesem Grund wurde der Linker zusätzlich ohne Fluorophor synthetisiert. Für die Anknüpfung des Linkers, sollte der *N*-Terminus eines Peptidarrays ausgenutzt werden. Aus diesem Grund wurde als funktionelle Gruppe eine COOH-Gruppe ausgewählt. Als zweite funktionelle Gruppe wurde ein Azid gewählt, um den Peptidarray, der den Linker trägt *via*

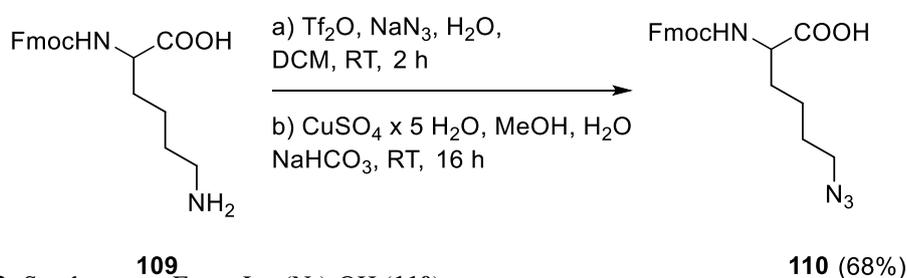
Click-Chemie auf einen alkylierten Array zu transferieren. Der Linker kann durch eine dritte funktionelle Gruppe, ein geschütztes Alkin, erweitert werden (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Skizze des Trifunktionalen Linkers und Abbildung der zu synthetisierenden bi- und trifunktionalen Linker **107** und **108** mit einem Fluorophor.

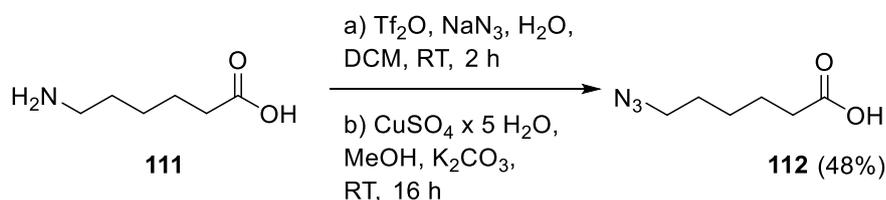
### 3.1.9.1. Synthese der benötigten Azide und Alkine

Bevor die Linker synthetisiert werden konnten, mussten dafür zuerst die Edukte synthetisiert werden. Das Azid (Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**)) wurde synthetisiert und zusätzlich kommerziell erworben. Dazu wurde die Diazotransferreagenz durch eine Reaktion von NaN<sub>3</sub> und Triflylanhydrid in DCM hergestellt. Anschließend wurde das Fmoc-Lys-OH (**109**) mit dem Diazotransferreagenz, CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) in Methanol und Wasser nach einer literaturbekannten Reaktion umgesetzt.<sup>[113]</sup> Das Azid konnte nach einer säulenchromatographischen Aufarbeitung in 68% Ausbeute erhalten werden (Schema 22).



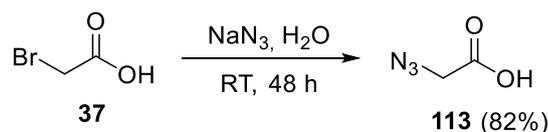
**Schema 22:** Synthese von Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**).

Zudem wurden zusätzlich Azidoessigsäure (**113**) und Azidohexansäure (**112**) synthetisiert. Das Azid (Azidohexansäure (**112**)) wurde durch die Reaktion von Aminohexansäure (**111**) mit Triflylazid, CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Kaliumcarbonat (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) in Methanol erhalten.<sup>[113a]</sup> Das Produkt konnte in 48% Ausbeute erhalten werden und wurde ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt weiter verwendet (Schema 23).



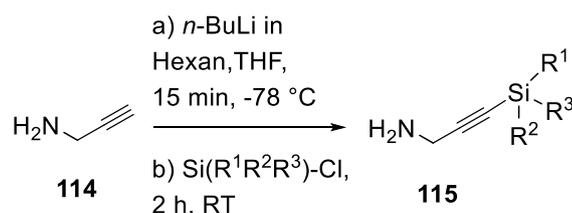
**Schema 23:** Synthese von Azidohexansäure (**112**).

Das Azid (Azidoessigsäure (**113**)) musste durch Reaktion von BrAcOH (**37**) und Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) zugänglich gemacht werden.<sup>[114]</sup> Das Produkt konnte in 82% Ausbeute erhalten werden und wurde ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt weiterverwendet (Schema 24).



**Schema 24:** Synthese von Azidoessigsäure (113).

Des Weiteren mussten geschützte Alkine synthetisiert werden (Schema 24). Als mögliche Schutzgruppen wurde Triisopropylsilan (TIPS) und *tert*-Butyl-diphenylsilan (TBDPS) ausgewählt, die im Vergleich zu Trimethylsilan (TMS) oder Triethylsilan (TES) nicht unter basischen Bedingungen<sup>[115]</sup> abgespalten werden können. Eine Abspaltung erfolgt mittels Fluorid-Ionen. Beispielsweise kann Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) eingesetzt werden.<sup>[116]</sup> Das Alkin (TIPS-Propargylamin (205)) wurde synthetisiert, wobei Propargylamin (114), *n*-Butyllithium (*n*-BuLi) und abschließend Triisopropylsilylchlorid (TIPCl) nach einer literaturbekannten Reaktion umgesetzt wurden.<sup>[117]</sup> Das Produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und konnte in 48% Ausbeute erhalten werden.



**Schema 25:** Synthese von Silyl-geschützten Alkinen 115

Das Alkin (TBDPS-Propargylamin (206)) wurde analog des TIPS-Propargylamin (205) synthetisiert. Anstelle von TIPCl wurde *tert*-Butyl-diphenylsilylchlorid eingesetzt.<sup>[117-118]</sup> Das Produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und konnte in 18% Ausbeute erhalten werden.

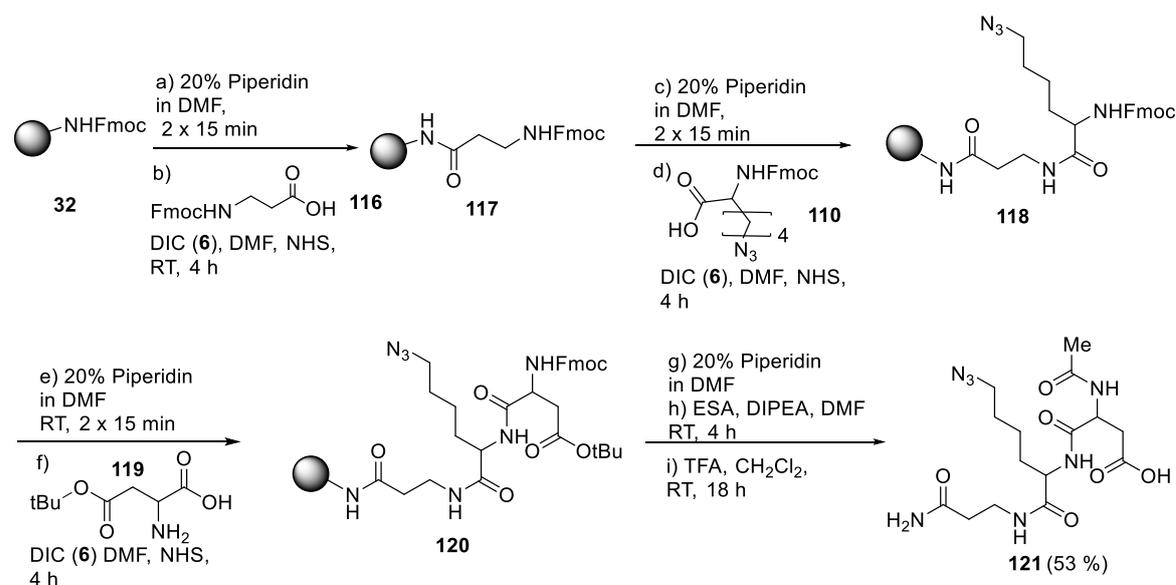
### 3.1.9.2. Bi- und trifunktionale Linker

Für die Synthese der Linker wurde die feste Phase ausgewählt, da keine aufwendigen Reinigungsschritte nach den einzelnen Schritten durchgeführt werden müssen. Der Nachteil der festen Phase ist jedoch die geringe Produktmenge im Verhältnis zu den Materialkosten. Bis ein geeigneter trifunktionaler Linker gefunden worden ist, sind geringe Mengen an Produkt ausreichend. Die Synthese könnte später in der Flüssigphase

durchgeführt werden, um ein Upscaling der Menge zu erreichen. Das Rink-Amid-Harz (**32**) wurde ausgewählt, da bei einer Abspaltung ein unreaktives Amid generiert wird.

### Syntheseroute 1

Der bifunktionale Linker ohne Fluorophor wurde synthetisiert, in dem zuerst die Schutzgruppe des Rink-Amid-Harzes (**32**) durch Zugabe von einer frischen Lösung von 20% Piperidin in DMF (v/v) entfernt wurde (Schema 26). Das resultierende freie Amin wurde mit Fmoc- $\beta$ -Alanin-OH (**116**), DIC (**6**) und NHS in DMF acyliert. Der fast vollständige Umsatz (farbloses Harz, leicht blaue Lösung) wurde durch den Kaisertest<sup>[27]</sup> bestätigt. Bei einer nicht vollständigen Umsetzung wurde mit ESA, DIPEA in DMF acetyliert. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Die Azidierung wurde durch Zugabe von Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**), DIC (**6**) und NHS in DMF vollzogen. Der fast vollständige Umsatz wurde durch den Kaisertest bestätigt. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe entfernt und eine weitere Amidbindung durch Zugabe von Fmoc-Asp(tBu)-OH (**119**), DIC (**6**) und NHS in DMF ausgebildet. Ein Kaisertest wurde nicht durchgeführt, da er für Asparaginsäure nicht eindeutig ist.<sup>[119]</sup> Abschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe entfernt und das freie Amin mit ESA und DIPEA in DMF acetyliert.

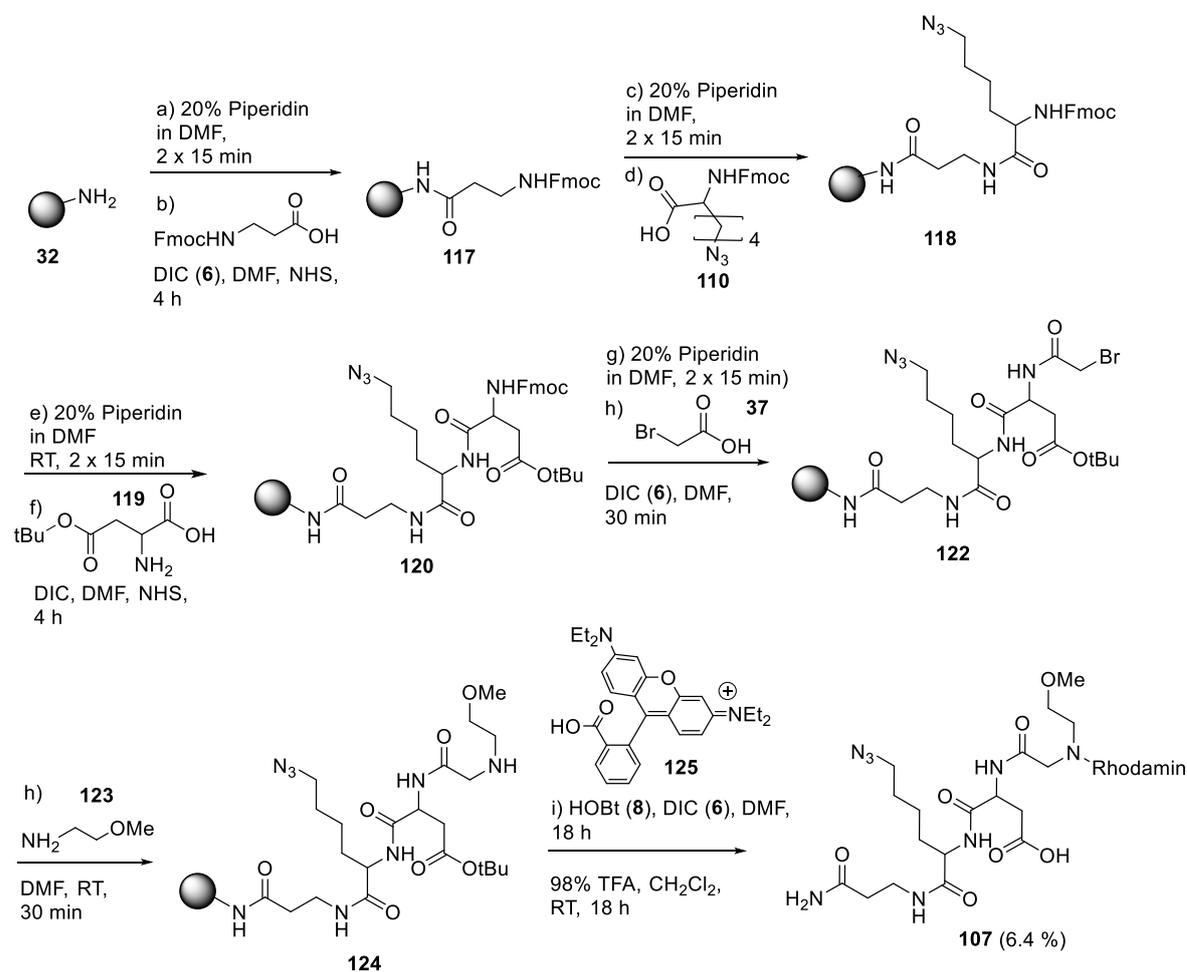


**Schema 26:** Syntheseroute des bifunktionalen Linkers **121**

Das Rohprodukt und die *tert*-Butyl-Schutzgruppe wurde mit 98% TFA in DCM vom Harz abgespalten und somit die zweite funktionelle Gruppe des Linkers erzeugt. Das Rohprodukt wurde per HPLC aufgereinigt. Das Produkt **121** wurde in 53% Ausbeute über acht Stufen erhalten.

### Syntheseroute 2

Der bifunktionale Linker mit Fluorophor wurde wie in *Syntheseroute 1* beschrieben synthetisiert, jedoch wurde das freie Amin der Asparaginsäure nicht acetyliert (Schema 27).



**Schema 27:** Syntheseroute des bifunktionalen Linkers mit Fluorophor **107**.

Das Amin wurde mit Bromessigsäure (**37**), DIC (**6**) in DMF umgesetzt. Anschließend wurde in einer nucleophilen Substitution Methoxyethylamin (MEA) (**123**) in DMF

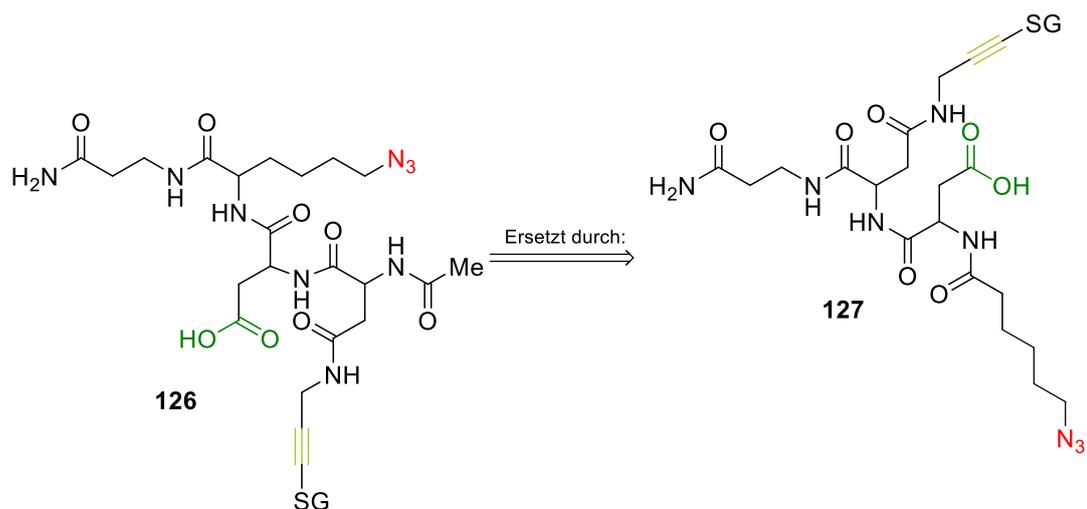
angebunden. Das sekundäre Amin wurde anschließend mit Rhodamin B (**125**), HOBT (**8**), DIC (**6**) in DMF über Nacht umgesetzt.

Eine direkte Umsetzung von Rhodamin B (**125**) mit dem primären Amin der angeknüpften Asparaginsäure würde nicht durchgeführt, da dann die Gefahr der Bildung einer Spiroverbindung des Rhodamin B<sup>[120]</sup> (**125**) besteht, die keine Fluoreszenz besitzt. Nach einer Testabspaltung vom Harz wurde der bifunktionale Linker (BiL2) (**107**) massenspektrometrisch nachgewiesen (Schema 27). Das Rohprodukt und die *tert*-Butyl-Schutzgruppe wurde mit 98% TFA in Dichlormethan vom Harz abgespalten und somit die zweite funktionelle Gruppe des Linkers erzeugt. Das Rohprodukt wurde per HPLC aufgereinigt. Das Produkt **107** konnte mit einer Ausbeute von 6.4% erhalten werden. Zusätzlich konnten stark verunreinigte Fraktionen des bifunktionalen Linkers erhalten werden, die von einem Nebenprodukt, das nicht zugeordnet werden konnte nicht abtrennbar war.

### *Syntheseroute 3*

Die bifunktionalen Linker wurden für die Durchführung eines Peptidarray-Transfer getestet. Es stellte sich heraus, dass der bifunktionale Linker mit dem Fluorophor sich unspezifisch in die Oberfläche einlagerte. Aus diesem Grund wurden für weitere Linker auf ein Fluorophor verzichtet (Kap.3.1.10.). Mit dem bifunktionalen Linker konnte erfolgreich ein Peptidarray-Transfer durchgeführt werden (Kap. 3.1.10.). Zusätzlich konnte der bifunktionale Linker eingesetzt werden, um einen Peptidarray, der mit dem Linker funktionalisiert wurde, auf einen zweiten Peptidarray zu transferieren (Kap. 3.1.11.).

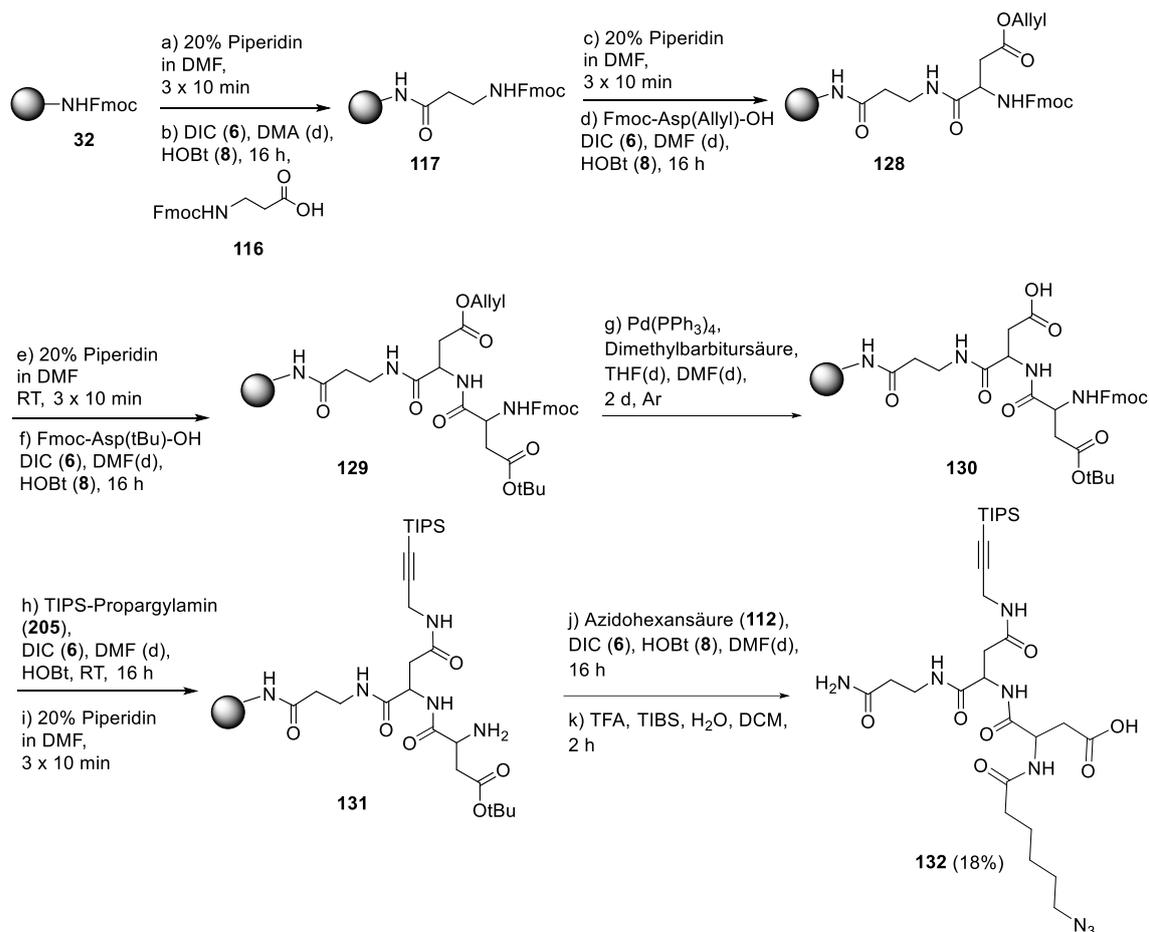
Auf Grund der positiven Ergebnisse wurde ein trifunktionaler Linker an der festen Phase synthetisiert. Jedoch wurde die vorgesehene Struktur des trifunktionalen Linkers verändert, damit eine Allyl-geschützte Asparaginsäure (Fmoc-Asp(Allyl)-OH) eingebaut werden konnte, um eine freie Carboxygruppe durch eine metallkatalytischen Entschützung mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>)<sup>[121]</sup>, ohne Nebenreaktionen zu generieren (Abbildung 33).



**Abbildung 33:** allgemeine Struktur des trifunktionalen Linkers **127**.

In der *Syntheseroute 3* wurde das Fmoc-Rink-Amid-Harz (**32**) mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt und das freie Amin mit Fmoc- $\beta$ -Ala-OH (**116**), DIC (**6**), HOBt (**8**) in DMF acyliert (Schema 28). Die Reaktionszeit wurde von 4 h auf 16 h erhöht, um bessere Kupplungsausbeuten zu erhalten. Die erfolgreiche Anknüpfung wurde mittels Kaisertest detektiert.

Die Fmoc-Schutzgruppe wurde entfernt und das Harz mit Fmoc-Asp(Allyl)-OH, DIC (**6**), HOBt (**8**) in DMF umgesetzt. Wasserfreies HOBt (**8**) wurde anstelle von NHS verwendet, um einen reaktiveren Aktivester zu generieren. Nach einer erneuten Fmoc-Entschützung wurde das Amin mit Fmoc-Asp(tBu)-OH, DIC (**6**), HOBt (**8**) in DMF acyliert. Die Allyl-Schutzgruppe wurde mit Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>; 1,3-Dimethylbarbitursäure in THF und DMF entfernt. Die erfolgreiche Abspaltung der Allylschutzgruppe wurde durch eine Testabspaltung vom Harz massenspektrometrisch geprüft. Eine Entschütungszeit von 24 h erwies sich als nicht quantitativ. Für eine quantitative Abspaltung musste die Reaktion zwei Tage durchgeführt werden. Die freie Carboxygruppe wurde mit (TIPS)-Propargylamin (**205**) unter der Verwendung von DIC (**6**), HOBt (**8**) in DMF acyliert.



**Schema 28:** Syntheseroute 3 des trifunktionalen Linkers **132**.<sup>[112]</sup>

Das Produkt wurde massenspektrometrisch detektiert. Dann wurde die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Abschließend wurde 6-Azidohexansäure (**112**) mittels DIC (**6**), HOBt (**8**) in DMF angeknüpft. Das Rohprodukt wurde mit TFA, TIBS, H<sub>2</sub>O in DCM abgespalten. Eine Abspaltung von 2 h war ausreichend, um das Rohprodukt vom Harz abzuspalten und die Schutzgruppe der Carboxygruppe vollständig zu entfernen. Nach einer Aufarbeitung mittels HPLC wurde der trifunktionaler Linker **132** mit einer Ausbeute von 18% über elf Stufen erhalten (Schema 28).<sup>[112]</sup>

#### Syntheseroute 4

Ein weiter trifunktionaler Linker wurde entworfen und synthetisiert. Hierbei wurde die Tert-butyldiphenylsilan (TBDPS)-Schutzgruppe verwendet. Zudem wurden die funktionellen Gruppen so angeordnet, dass eine bessere Bewegungsfreiheit der Peptidketten stattfinden kann.

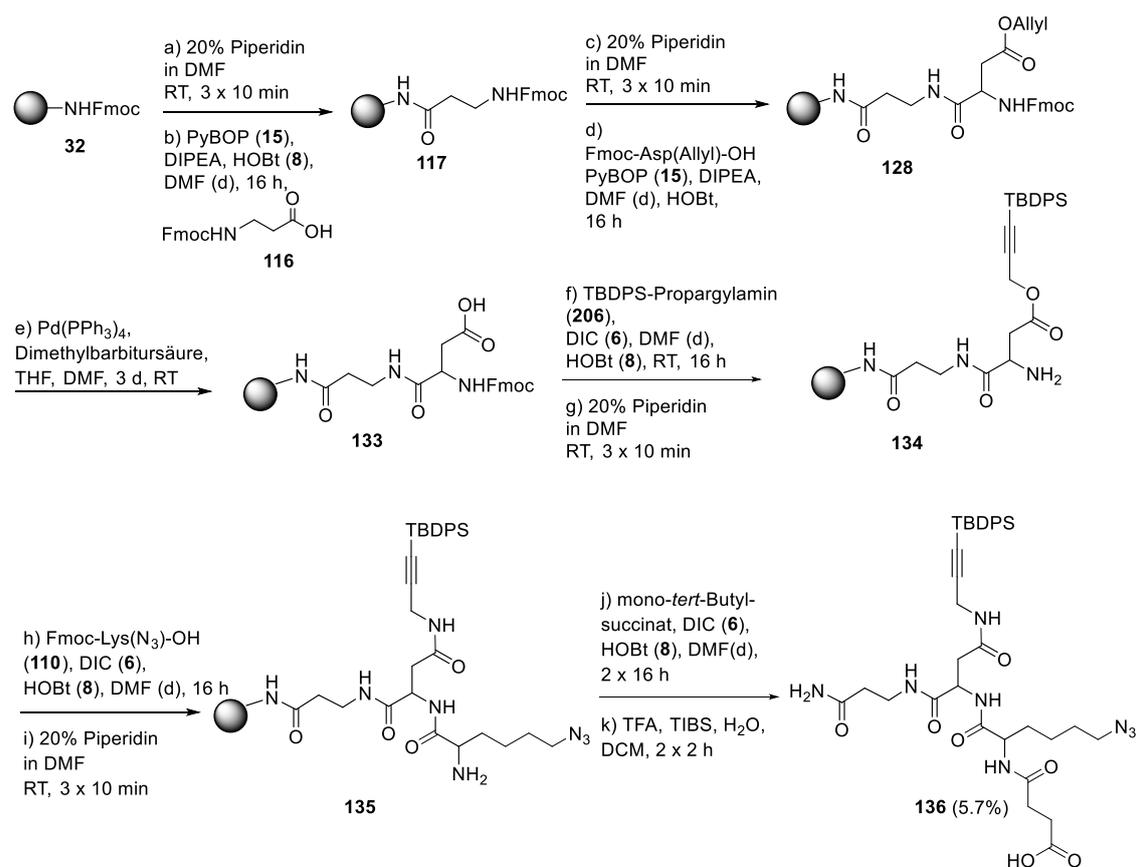
In der *Syntheseroute 4* wurde das Fmoc-Rink-Amid-Harz (**32**) mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt und das freie Amin mit Fmoc- $\beta$ -Ala-OH (**116**), PyBOP (**15**), HOBt (**8**), DIPEA in DMF acyliert (Schema 29). Die erfolgreiche Anknüpfung wurde mittels Kaisertest detektiert. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde entfernt und das Harz mit Fmoc-Asp(Allyl)-OH, PyBOP (**15**), HOBt (**8**), DIPEA in DMF umgesetzt. Die Allyl-Schutzgruppe wurde mit Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>; 1,3-Dimethylbarbitursäure in THF und DMF entfernt. Die freie Carboxylgruppe wurde mit *tert*-Butyldiphenylsilyl (TBDPS)-Propargylamin (**206**) unter der Verwendung von DIC (**6**), HOBt (**8**) in DMF acyliert und die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Anschließend wurde Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**) mittels DIC (**6**), HOBt (**8**) in DMF angeknüpft. Die erfolgreiche Anknüpfung wurde mit dem Kaisertest überprüft. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde entfernt und das Amin mit mono-*tert*-Butyl-succinat unter der Verwendung von DIC (**6**), HOBt (**8**) in DMF acyliert. Das Produkt wurde massenspektrometrisch nachgewiesen. Die Reaktion erfolgte nicht quantitativ, sodass das Harz erneut mit mono-*tert*-Butyl-succinat, DIC, HOBt (**8**) in DMF umgesetzt wurde. Das Rohprodukt wurde mit TFA, TIBS, H<sub>2</sub>O in DCM abgespalten. Aufgrund der unvollständigen Abspaltung der *t*Bu-Schutzgruppe wurde das Rohprodukt für weitere 2 h mit TFA in DCM versetzt.

Das Produkt wurde massenspektrometrisch nachgewiesen. Zusätzlich konnte das veresterte Produkt detektiert werden. Nach einer Aufarbeitung mittels HPLC wurde der trifunktionale Linker **136** mit einer Ausbeute von 5.7% über elf Stufen erhalten. Zusätzlich wurde das veresterte Produkt isoliert, das nach der Abspaltung im sauren Milieu entstanden sein muss, da das Harz zur vollständigen Entfernung des Rohproduktes mit Methanol gewaschen wurde.<sup>[121]</sup>

Eine Veresterung durch einen kurzen Waschschritt mit Methanol und sofortiger Entfernung des Lösungsmittels wurde zuvor nicht detektiert. Hierbei handelte es sich um das Hauptprodukt. Der gewünschte trifunktionale Linker **132** wurde nur als Nebenprodukt erhalten. Jedoch kann das veresterte Produkt in einem weiteren Reaktionsschritt durch eine Verseifung zum gewünschten trifunktionalen Linker **132** umgesetzt werden.

Auf Grund der schlechten Ausbeuten der trifunktionalen Linker, wurde die Beladung des Rink-Amid-Harzes (**32**) *via* DFPA überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die Fmoc-Entschützung innerhalb 30 min nicht quantitativ verläuft. Eine Entschützung von mind. weiteren 15 min ist notwendig. Am besten sollte das Rink-Amid-Harz (**32**)

mind.  $4 \times 15$  min entschützt werden. Zudem wurde eine deutlich schlechtere Entschützung detektiert, wenn die Entschützung-Lösung älter als eine Woche war. Des Weiteren stellte sich heraus, dass die Beladung des Harzes nicht der Beladung, die der Hersteller angab, entsprach. Weitere Untersuchungen von Fmoc-Rink-Amid-Harzen (**32**) von unterschiedlichen Herstellern ergaben die gleichen Ergebnisse. Möglicherweise ist durch die längere Lagerung ein Teil der Fmoc-Schutzgruppe (z.B. durch vorhandene basische Verunreinigungen) abgespalten worden.



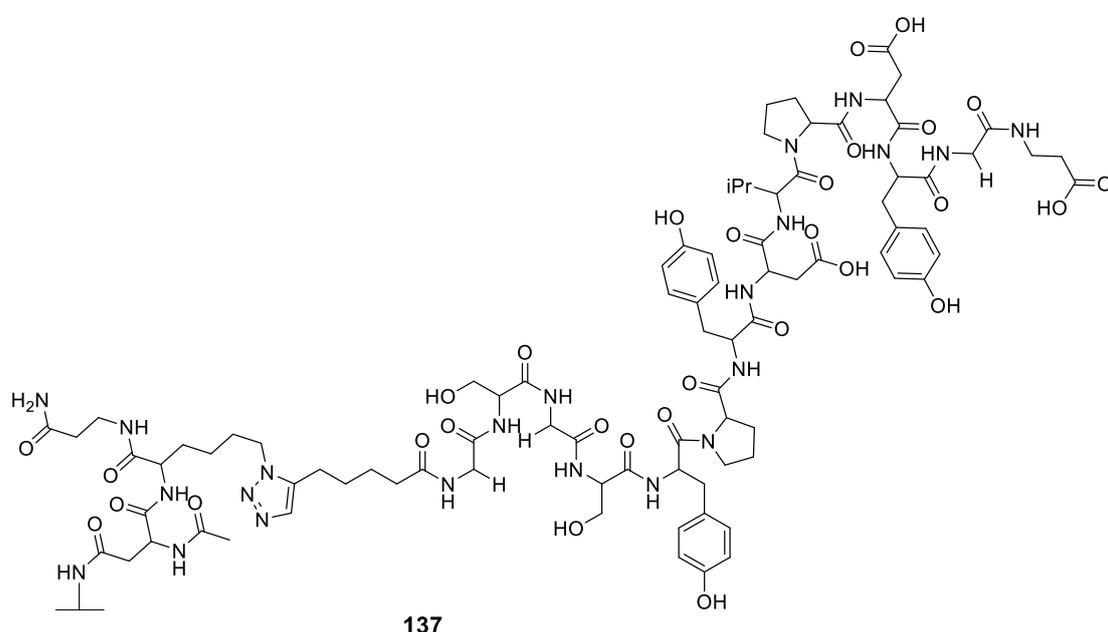
**Schema 29:** Syntheseroute 4 des trifunktionalen Linkers **136**.

### 3.1.10. Peptidarray-Transfer *via* bifunktionalem Linker

Nachdem die beiden bifunktionalen Linker synthetisiert worden waren, sollten nun die ersten Arrayreplikate *via* Transfer erzeugt werden. Dazu wurde der bifunktionale Linker, der ein Fluorophor trägt, an einen 10:90-PEGMA-co-MMA Peptidarray (Array-Layout: 3) unter Verwendung von DIC (**6**), HOBT (**8**) in DMF gekuppelt. Die Anknüpfung wurde mittels Fluoreszenz detektiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass sich der bifunktionale

Linker extrem unspezifisch in die Oberfläche einlagerte, sodass die Peptidspots aufgrund des starken Fluoreszenz-Hintergrundsignals kaum wahrgenommen werden konnten. Möglicherweise ist die Anknüpfung auf Grund von sterischen Effekten erschwert. Aus diesem Grund wurde für weitere Linker auf Fluorophore verzichtet.

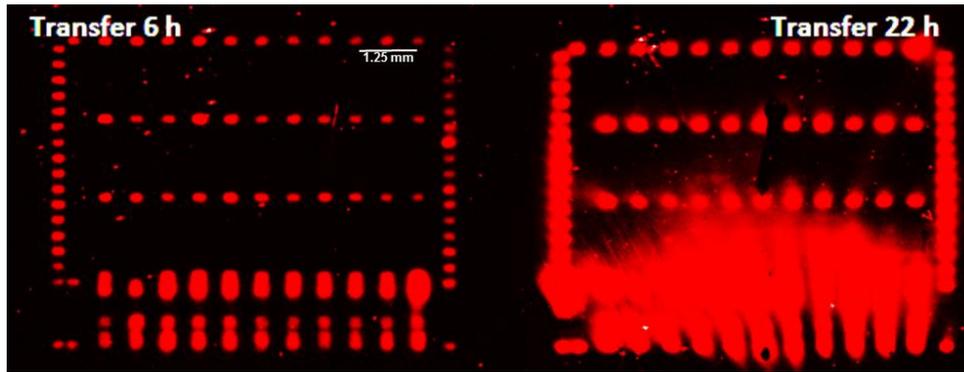
Anschließend wurde der bifunktionale Linker ohne Fluorophor getestet. Dazu wurde ein entschützter 10:90-PEGMA-co-MMA Peptidarray (Array-Layout: 2) mit Heptinsäure, DIC (6), HOBt (8) in DMF umgesetzt. Der Akzeptor wurde vorbereitet, indem eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt wurde.



**Abbildung 34:** Synthetisierter  $\beta$ A-GSAYDPVDYPYGS-Heptin-BiF1-Spot **137** via einem Transfer.

Anschließend wurde der bifunktionale Linker durch die Verwendung von DIC (6), HOBt (8) angeknüpft. Die säurelabilen Schutzgruppen wurden mit TFA, TIBS, H<sub>2</sub>O in DCM entfernt. Der alkylierte Peptidarray wurde für 24 h mit gasförmigem Ammoniak inkubiert und die abgespaltenen Peptide mit der manuellen Transfermaschine auf die Akzeptor-Oberfläche in 6 h und 22 h transferiert und *via* Click-Chemie an den immobilisierten bifunktionalen Linker gekuppelt (Abbildung 34).

Der erfolgreiche Transfer wurde nach einer Anti-HA-DyLight 680-Inkubation bestätigt (Abbildung 35).



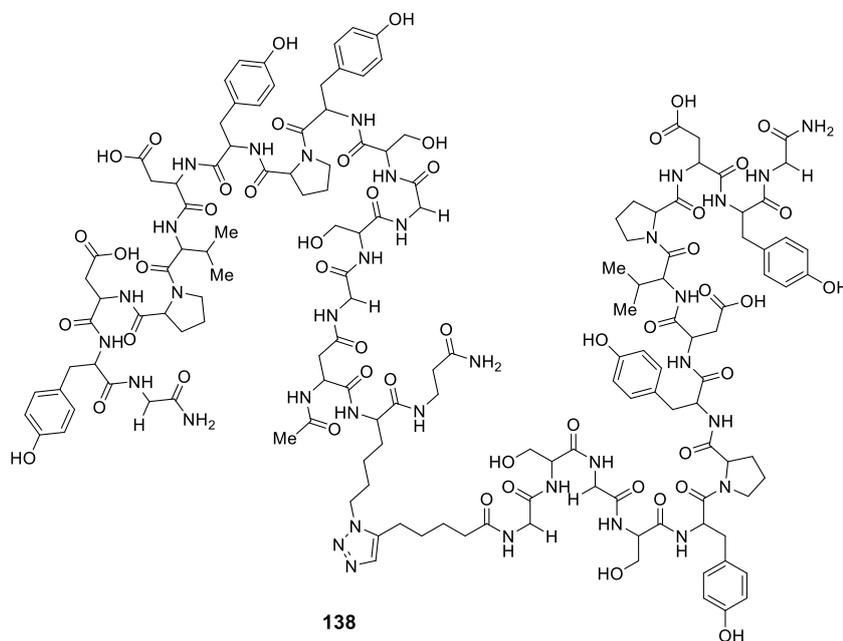
**Abbildung 35:** Fluoreszenzscan (700 nm) eines Peptidtransfers auf eine R-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche, die mit einem bifunktionalen Linker (= R) funktionalisiert wurde. (links: Anti-HA-DyLight 680 Färbung (6 h) rechts: Anti-HA-DyLight 680 Färbung (22 h)).

Nach 6 h ist eine geringe laterale Diffusion der Peptide zu beobachten. Trotz der Verwendung der manuellen Transfermaschine, konnte keine Drift der Peptide detektiert werden. Hingegen nach 22 h ist eine starke laterale Diffusion der Peptide zu beobachten. Zudem kam es beim Anpressen des Peptidarrays auf die Akzeptor-Oberfläche zu einer Peptid-Drift. Durch die Verwendung der halbautomatischen Stempelmaschine kann dieses Problem verhindert werden.

### 3.1.11. Erzeugung von Dipeptiden mittels Transfermethode

In dieser Versuchsreihe sollten Dipeptide über einen Transfer von abgespalteten Peptiden eines Arrays auf einen zweiten Peptidarray erfolgen. Für ein vereinfachtes Experiment wurde der Transfer flächig durchgeführt. Eine abschließende massenspektrometrische Untersuchung sollte den Beweis einer Kupplung liefern, da die Peptide auch nur über Wechselwirkungen miteinander interagieren könnten. Dazu wurden zwei Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt. Die Akzeptor- und Donor-Oberfläche wurde mit einem Fmoc-Rink-Amid-Linker (**87**) unter der Verwendung von Pentafluorphenol (**13**), DIC (**6**), DIPEA in DMF funktionalisiert und abschließend mit ESA, DIPEA und DMF acetyliert und dann die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Als Spacer wurde Fmoc-Gly-OPfp (**102**) in DMF an die Rink-Linker-Oberflächen gekuppelt. Beide Oberflächen wurden dann nach einer Acetylierung und Fmoc-Entschützung mit einem HA-Peptid ((GSGSYPYDVPDYA)<sub>p</sub>) umgesetzt und die Oberfläche acetyliert und entschützt. Die

Donor-Oberfläche wurde mit dem bifunktionalen Linker **121** (BiF1), und die Akzeptor-Oberfläche mit Heptinsäure dem unter der Verwendung von DIC (**6**), HOBt (**8**) in DMF funktionalisiert.



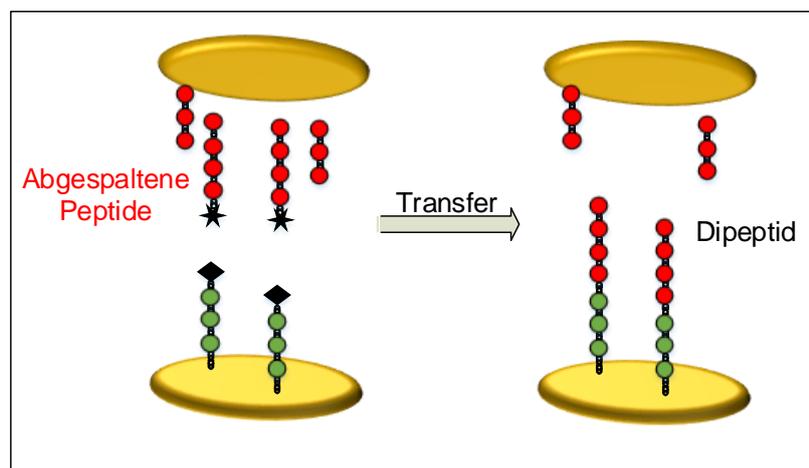
**Abbildung 36:** Synthetisiertes Dipeptid **138** unter der Verwendung des bifunktionalen Linkers **121**.

Die Peptide und die säurelabilen Schutzgruppen der Akzeptor-Oberfläche wurden durch Inkubation der Oberfläche mit TFA-Dampf abgespalten. Dann wurde der Transfer mit der manuellen Transfermaschine durchgeführt und die Peptide via Click-Chemie gekuppelt. Abschließend wurde das Rohprodukt mit TFA von der Oberfläche abgespalten. Das Produkt **138** konnte massenspektrometrisch detektiert werden (Abbildung 36).

### 3.1.12. Erzeugung von Dipeptiden im Arrayformat mittels Transfermethode

Nachdem die Optimierung des Peptidarray-Transfers abgeschlossen war und ein Dipeptid erfolgreich synthetisiert werden konnte, wurde als nächster Schritt der Transfer von abgespaltenen Peptiden eines Arrays auf einen zweiten Peptidarray versucht (Abbildung 37), um Dipeptide zu erhalten. Bei der Generierung von Dipeptiden sind Interaktionen der Peptide untereinander nicht ausgeschlossen, sodass zur Kupplung mit einer zusätzlichen unspezifischen Einlagerung der Peptide zu rechnen ist. Aus diesem Grund muss eine geeignete Methode gefunden werden, die es ermöglicht, diese unspezifische Einlagerung möglichst gering zu halten.

Für die Generierung von Dipeptid-Arrays wurden drei verschiedene Peptidarrays getestet. Je nach Syntheseprozess verändern die Polymeroberflächen ihre Eigenschaften, sodass mit einer unterschiedlichen unspezifischen Einlagerung der Peptide zu rechnen war. Zu Beginn wurden *in situ* generierte Peptidarrays (Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen) der Firma PEPperPRINT genutzt. Zur Abspaltung der Peptide wurde gasförmiges Ammoniak genutzt. Hohe Abspaltraten, sind jedoch nur nach einer extrem langen Ammoniak-Inkubation zu erreichen (> 40 Tage).

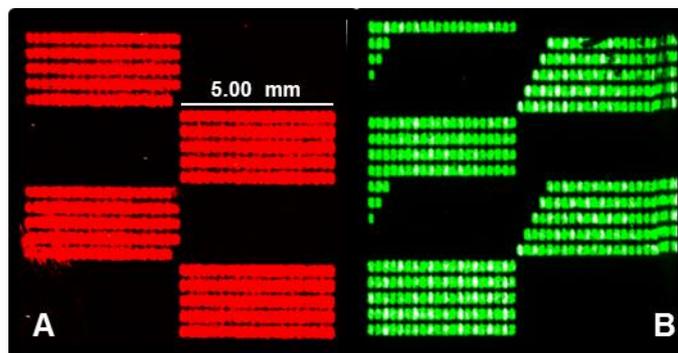


**Abbildung 37:** Veranschaulichung des Transfers zur Erzeugung von Dipeptiden.

Des Weiteren wurden Peptidarrays getestet, die über die cLIFT-Methode hergestellt wurden und Peptidarrays die mit der SPOT Methode hergestellt wurden. Für die Erzeugung von Dipeptide-Arrays müssen der Donor-Array und der Akzeptor-Array so ausgerichtet werden, dass sich die Peptidspots möglichst exakt treffen. Die Verwendung der manuellen

Stempelmaschine ist deshalb nicht geeignet. Die halbautomatische Stempelmaschine wurde aus diesem Grund verwendet. Auf Grund eines fehlenden Positionierungssystems, musste eine Methode entwickelt werden, sodass sich die Peptidspots treffen. Dazu wurde eine rechtwinklige Ecke der Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche, auf dem sich der Array befindet, ausgenutzt. Die Ecke wurde in die Ecke der Halterung der Transfermaschine, die für die Oberfläche angefertigt wurde, geschoben. Der Donor-Array wurde dann mit Hilfe einer weiteren Halterung möglichst exakt über dem Akzeptor ausgerichtet und mit Hilfe eines Computerbefehls auf den Akzeptor gepresst.

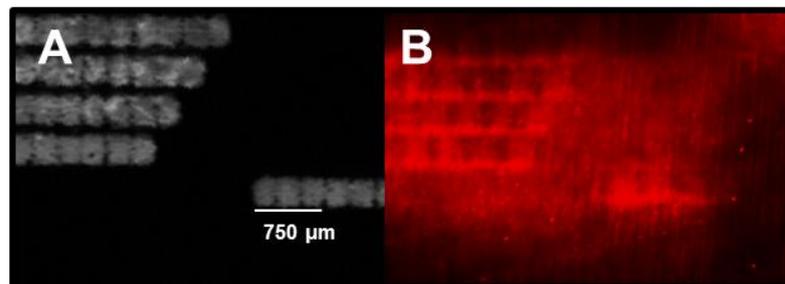
Der erste Versuch wurde mit einem 10:90-PEGMA-co-MMA Peptidarray (Array-Layout: 4), der das HA-Epitop trägt, und einem 10:90-PEGMA-co-MMA Peptidarray (Array-Layout: 5), der das FLAG-Epitop trägt, durchgeführt. Das Layout wurde so entworfen, dass die Peptidspots dicht aneinander sind, sodass ein exaktes Treffen nicht notwendig ist. Das FLAG Layout wurde spiegelverkehrt zum HA-Layout entworfen. Zusätzlich wurden einige Spots entfernt, so dass ein unspezifischer Transfer der HA-Peptide detektierbar ist (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Fluoreszenzscan der *in situ* generierten Arrays von PEPperPRINT. (A) Anti-HA-DyLight 680 Färbung; (B) Anti-FLAG-DyLight 800 Färbung.

Dazu wurde ein entschützter 10:90-PEGMA-co-MMA Peptidarray (Array-Layout: 4) mit Heptinsäure, DIC (6), HOBt (8) in DMF umgesetzt. Der Akzeptor wurde vorbereitet, indem ein entschützter 10:90-PEGMA-co-MMA Peptidarray (Array-Layout: 5) mit Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (110), DIC (6), HOBt (8) in DMF umgesetzt wurde. Der alkylierte Peptidarray wurde für 24 h mit Ammoniak inkubiert, die säurelabilen Schutzgruppen mit TFA, TIBS, H<sub>2</sub>O in DCM entfernt. Die Schutzgruppen wurden entfernt, da diese möglicherweise den Transfer aus sterischen Gründen beeinträchtigen könnten. Jedoch kann es auf Grund des entschützten HA-Peptides zu einer verstärkten unspezifischen

Einlagerung kommen, da die Peptide besser miteinander interagieren können. Die abgespaltenen Peptide wurden dann mit der halbautomatischen Transfermaschine auf die Akzeptor-Oberfläche in 6 h transferiert und *via* Click-Chemie an die FLAG-Peptide gekuppelt. Der Transfer sollte mittels Anti-HA-*DyLight* 680-Färbung detektiert werden. Es stellte sich jedoch heraus, wie es zu befürchten war, dass sich die HA-Peptide unspezifisch in die Oberfläche einlagerten. Zusätzlich konnte eine erhöhte Fluoreszenz in den Zwischenräumen der FLAG-Spots detektiert werden (Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Fluoreszenzscan von (A) einem FLAG-Array nach einer Anti-FLAG *DyLight* 800 Inkubation (Graustufenbild, Auflösung: 21 µm) (B) einem FLAG-Array nach einer Anti-HA *DyLight* 680 Inkubation, nachdem das HA-Peptid transferiert und gekuppelt wurde (Auflösung: 21 µm). Die Bilder wurden in Helligkeit und Kontrast angepasst.

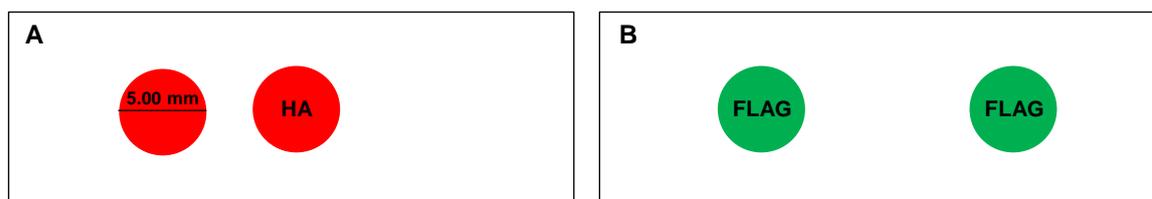
Möglicherweise lagert sich das Peptid dort aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit bevorzugt ein. Ein positiver Transfer und Kupplung der Peptide auf den FLAG-Spots ist nicht eindeutig zu detektieren.

Eine negative Alkylierung und Azidierung kann ausgeschlossen werden, da eine abschließende Anknüpfung von Fluorophoren die funktionellen Gruppen bestätigte. Auch in weiteren Experimenten ist es nicht gelungen einen eindeutigen positiven Transfer zu erhalten. Starke unspezifische Einlagerungen erschwerten die Auswertung. Aus diesem Grund wurden PEPperPRINT Arrays nicht weiter genutzt, um Dipeptid-Arrays zu generieren.

Als zweite Methode wurde das Spotten von Peptiden ausprobiert, um geeignete Arrays herzustellen und ein Dipeptid zu generieren. Es stellte sich jedoch heraus, dass nach dem Spotten der Peptide starke unspezifische Einlagerung der Peptide in die Synthesoberfläche stattfand. Höhere Peptidmengen könnten im Falle einer unspezifischen Einlagerung in die Akzeptor-Oberfläche zu einem starken Hintergrund führen. Aus diesem Grund wurde auf die Dipeptid-Synthese mit gespotteten Arrays verzichtet.

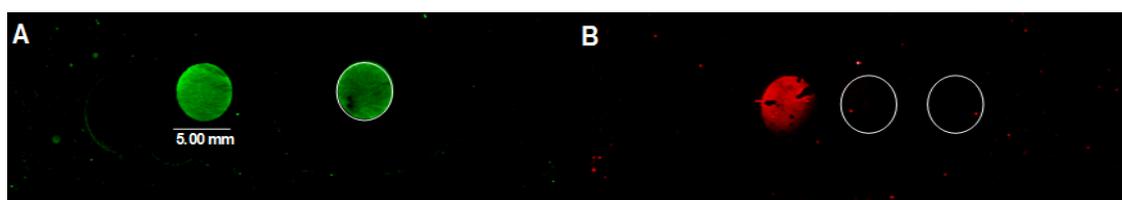
Anschließend wurde die Generierung von Dipeptid-Arrays mit Hilfe von c-LIFT generierten Peptidarrays getestet. Die Synthese von vorstrukturierten Peptidarrays *via* cLIFT-Methode wurde bereits in Kap. 3.1.7 erfolgreich durchgeführt.

Für den Transfer abgespaltener Peptide eines Peptidarrays wurden ein azidierter FLAG-Array und ein alkylierter HA-Array erzeugt. Dazu wurden zwei Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt und mit Fmoc-Ala-OPfp (**90**) mit der cLIFT Methode vorstrukturiert, und abschließend für 24 h mit ESA, DIPEA und DMF acetyliert und dann die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Das Layout (Abbildung 40) wurde so gewählt, dass ein HA-Spot einen FLAG-Spot beim Transfer berühren kann und somit ein Dipeptid erzeugt werden kann. Zudem wurde ein HA-Spot synthetisiert, der nur die acetylierte Akzeptor-Polymeroberfläche berührt, um unspezifische Einlagerungen feststellen zu können.



**Abbildung 40:** Layout der Arrays (A) HA-Peptid-Array (Position 1, 2) (B) FLAG-Peptid-Array (Position 1 und 3).

Die Akzeptor-Oberfläche, die freie Amine trug, wurde mit dem Succinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC)-Linker funktionalisiert und anschließend wurde das Maleimid mit einem FLAG-Peptid, das ein Thiol am C-Terminus trug, umgesetzt. Dann wurden die noch freien Maleimide mit Mercaptoethanol geblockt und anschließend die Hydroxy-Gruppen acetyliert. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde abgespalten und Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**) mittels PyBOP (**39**), DIPEA und HOBt (**8**) in DMF angeknüpft. Abschließend wurden die säurenlabilen Schutzgruppen und die Fmoc-Schutzgruppe entfernt.



**Abbildung 41:** Fluoreszenzscan eines (A) FLAG-Arrays nach einer Anti-FLAG-DyLight 800 Inkubation (Spot 1 und 3 wurde mit FLAG funktionalisiert, grüne Fluoreszenz) und (B) des FLAG-Arrays nach dem HA-Peptid Transfer (Spot 1 und Spot 3 FLAG (nicht abgebildet), Spot 1 transferiertes HA: (rote Fluoreszenz)).

Die Donor-Oberfläche wurden mit einem Fmoc-Photo-Linker (**86**) unter der Verwendung von PyBOP (**15**), DIPEA und HOBt (**8**) in DMF funktionalisiert. Nach erneuter Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das HA-Peptid mittels HBTU (**14**), DIPEA, HOBt (**8**) in DMF angeknüpft. Nach einer Acetylierung und Fmoc-Entschützung wurde die Heptinsäure mittels PyBOP (**15**), DIPEA und HOBt (**8**) in DMF angeknüpft und die säurenlabilen Schutzgruppen wurden entfernt. Anschließend wurden die Peptide mittels UV-Bestrahlung (15 W, 365 nm) in 30 min abgespalten. Der Transfer der alkinylierten HA-Peptide erfolgte mit der manuellen Transfermaschine innerhalb von 6 h auf den azidierten FLAG Array. Die Detektion des Dipeptids erfolgte mittels Anti-HA-DyLight 680. Der FLAG-Array wurde *via* Anti-FLAG-DyLight 800 sichtbar gemacht (Abbildung 41).

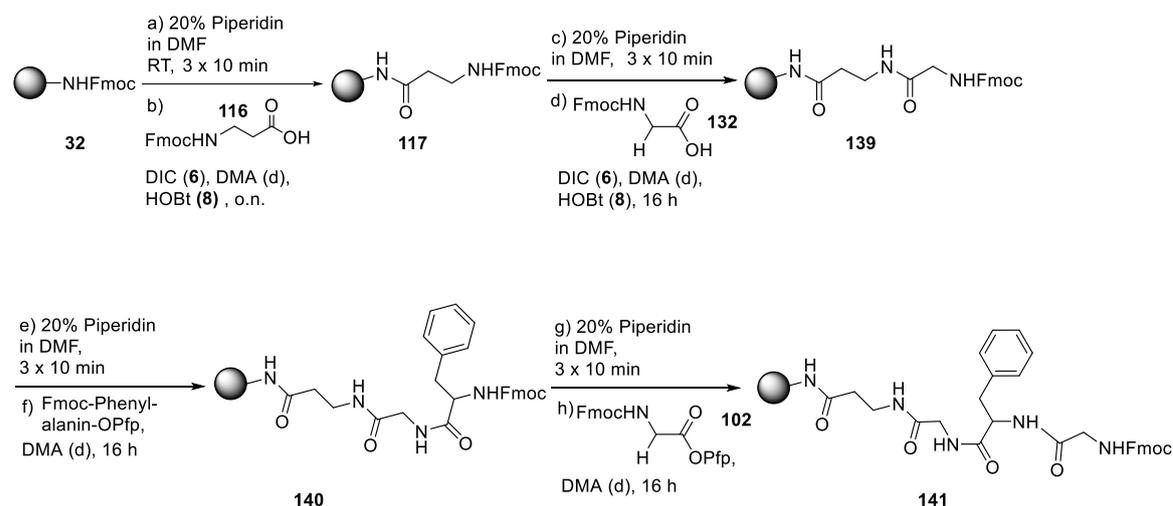
Das HA-Peptid konnte transferiert werden und lagerte sich nicht unspezifisch in den Polymerfilm ein. Beim Transfer wurde der FLAG-Array nicht richtig getroffen, sodass nur ein Teil des FLAG-Spots mit dem HA-Peptid funktionalisiert wurde.

Als positiv-Kontrolle wurde der Versuch wiederholt und der Transfer ohne Katalysator durchgeführt. Innerhalb von 6 h konnte kein erfolgreicher Transfer detektiert werden.

Zusammenfassend ist die Generierung von Arrays *via* Vorstrukturierung mit cLIFT und Kupplung des Peptides eine gute Möglichkeit, um Dipeptid-Arrays zu generieren und wurde deshalb für die weiteren Experimente genutzt.

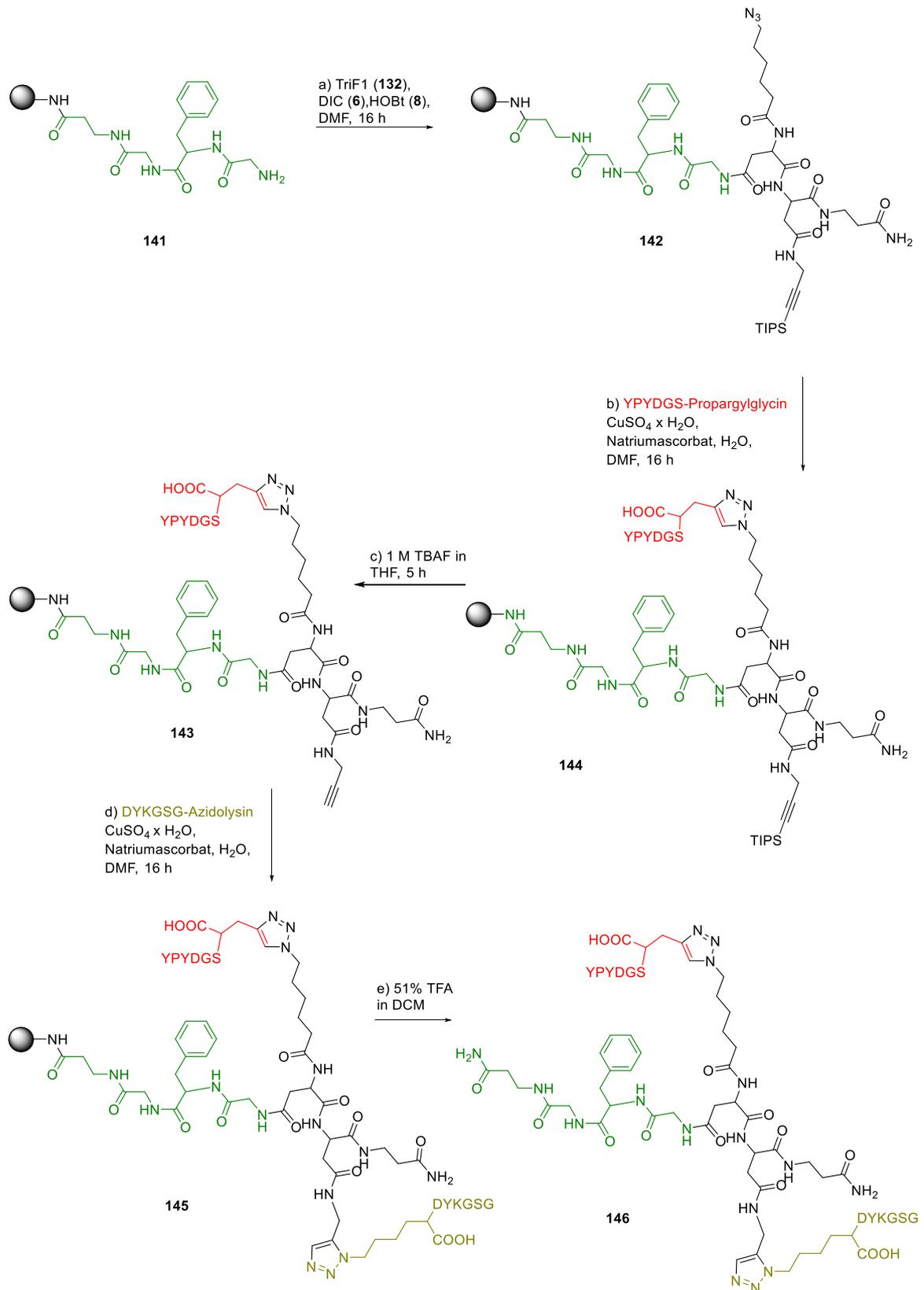
### 3.1.13. Synthese von Protein-ähnlichen Strukturen an Beads

Nachdem der Peptidtransfer optimiert wurde und die ersten Dipeptide generiert wurden, wurden nun, unter der Verwendung der trifunktionalen Linkern, die ersten Protein-ähnlichen Strukturen an der festen Phase aufgebaut. Dazu wurde die Synthese an der festen Phase (Harz) gewählt, um herauszufinden, ob Protein-ähnliche Strukturen mit drei unterschiedlichen Peptiden an einem Linker synthetisierbar sind. Zudem konnte ein einfacher massenspektrometrischer Nachweis durchgeführt werden. Dazu wurde ein Tetramer am Rink-Amid-Harz (**32**) aufgebaut. Dazu wurde das Harz mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt und hintereinander  $\beta$ -Alanin ( $\beta$ Ala), Glycin (Gly), Phenylalanin (Phe) und Glycin (Gly) an das Harz gekuppelt (Schema 30).



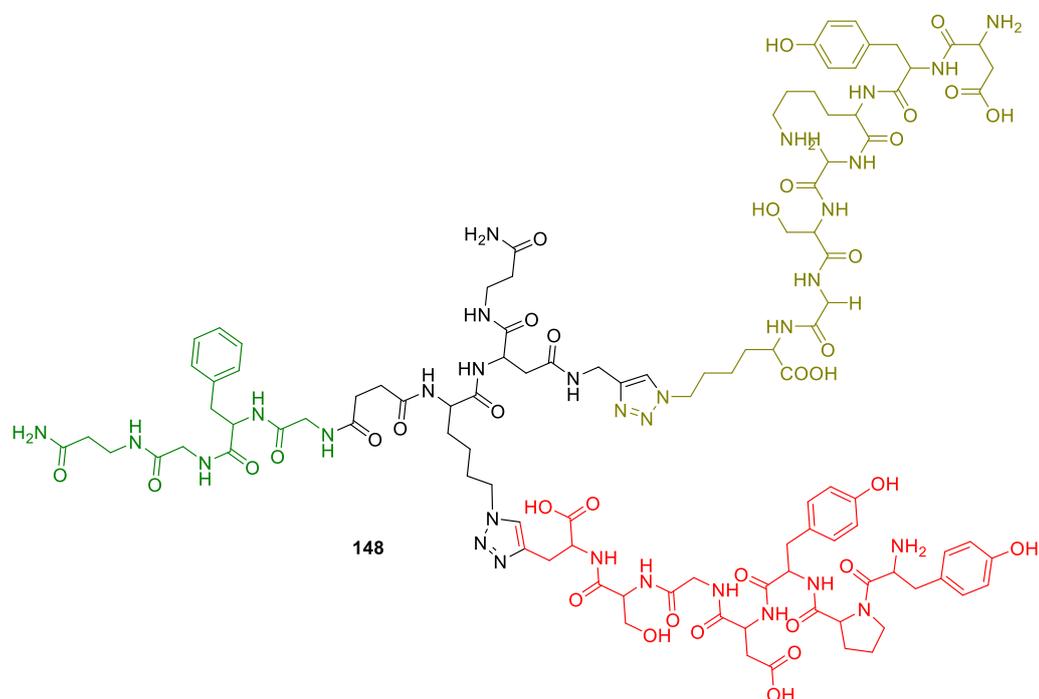
**Schema 30:** Synthese des 4-mer Peptides **141** ( $\text{NH}_2$ - $\beta$ Ala-Gly-Phe-Gly-polymergebunden).

Die Syntheseroute zur Erzeugung von Protein-ähnlichen Strukturen ist in Schema 31 dargestellt.



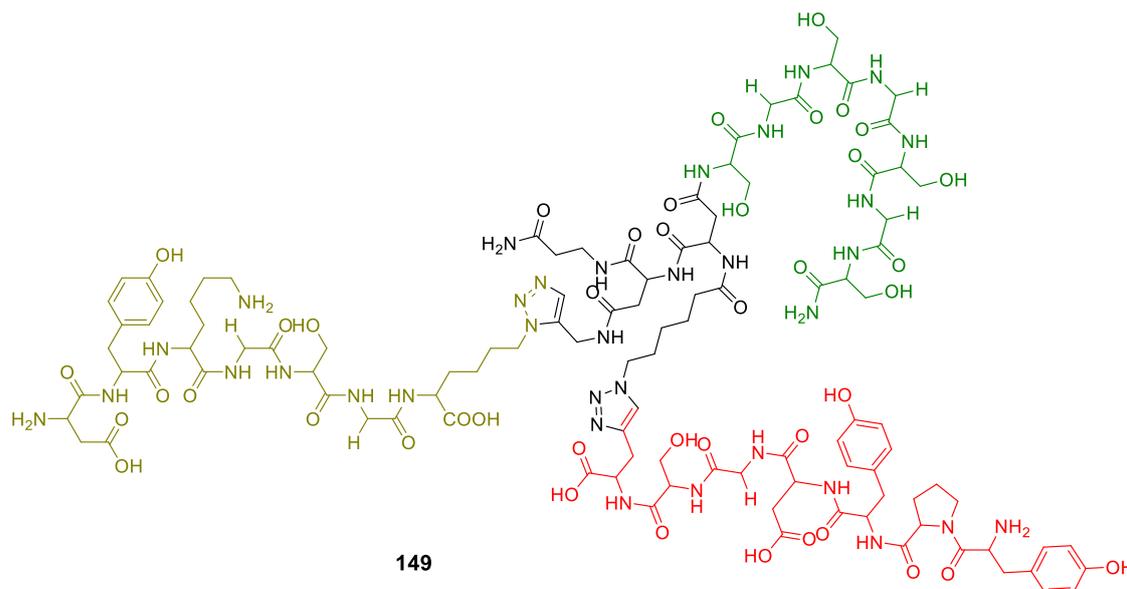
**Schema 31:** Syntheseroute einer Protein-ähnlichen Struktur am Rink-Amid-Harz (**32**) unter Verwendung des trifunktionalen Linkers **132** (TriF1).<sup>[112]</sup>

Abschließend wurde der trifunktionale Linker **132** (TriL1) oder **136** (TriL2) unter der Verwendung von DIC (**6**), HOBt (**8**) in DMF an das Tetramer gekuppelt. Dann wurde das zweite Peptid Fmoc-YPYDGS-propargylglycin *via* Click-Chemie an das Azid des trifunktionalen Linkers gekuppelt und dann die Silylschutzgruppe des Alkins des Linkers mit TBAF entfernt. Das dritte Peptid Fmoc-DYKGS-G-Lys(N<sub>3</sub>)-OH wurde erneut *via* Click-Chemie angeknüpft und die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Die Protein-ähnlichen Strukturen, die mit den trifunktionalen Linkern TriL1 **132** und TriL2 **107** erzeugt wurden, wurden nach einer Abspaltung vom Harz mit TFA, TIBS, H<sub>2</sub>O in DMF massenspektrometrisch nachgewiesen (Abbildung 42 und 43).<sup>[112]</sup>



**Abbildung 42:** Protein-ähnlichen Struktur **148** ( $\beta$ AGFG- (grün), DYKGS-G-Lys (N<sub>3</sub>) (rot), YPYDGS-Propargylglycine (gelb)), die am Rink-Amid-Harz (**32**) unter Verwendung des trifunktionalen Linkers **136** (TriF2) (schwarz) synthetisiert wurde.

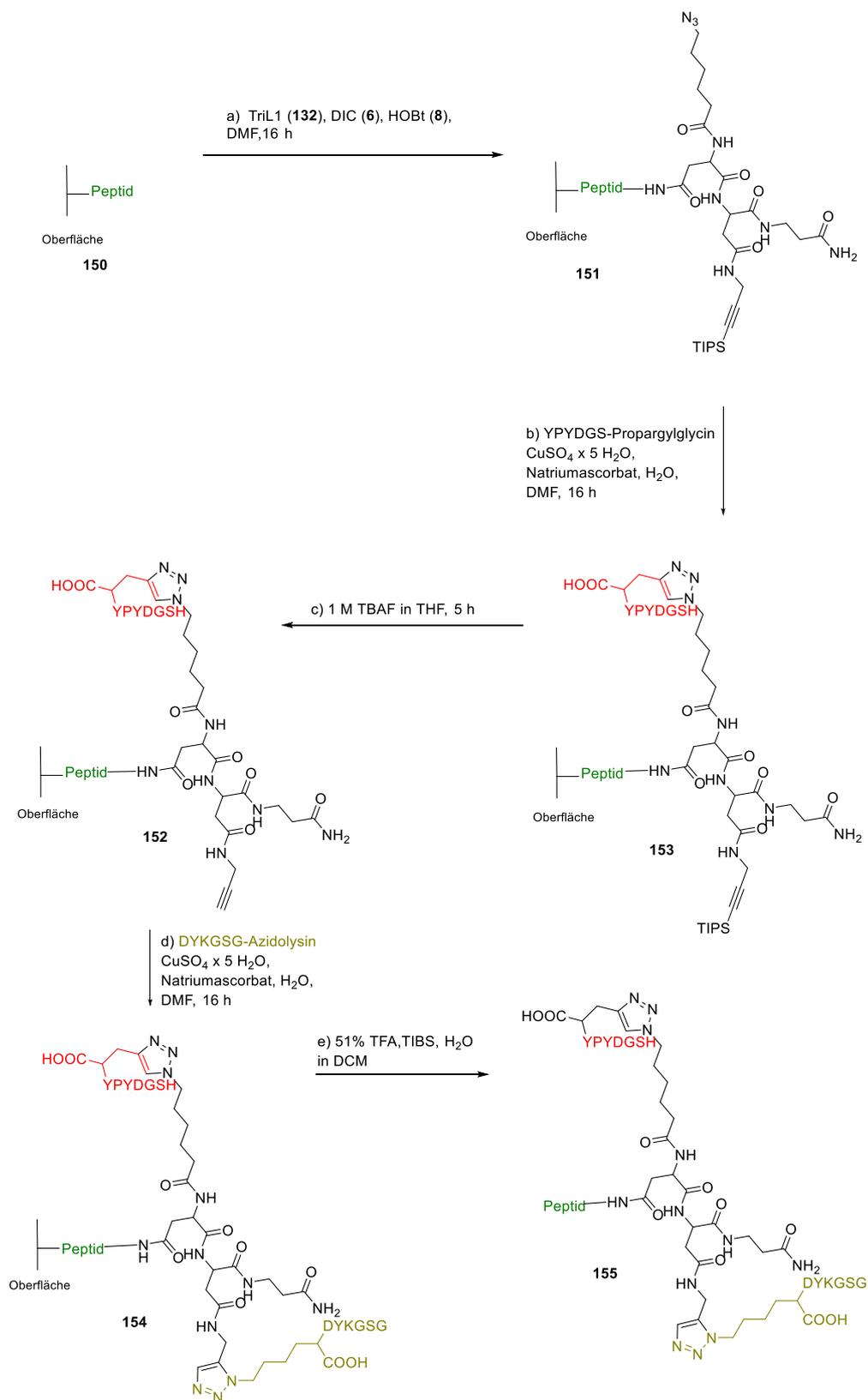
Zudem wurde ein weiteres Experiment unter der Verwendung des TriL1 **132** zur Erzeugung einer größeren Protein-ähnlichen Struktur durchgeführt (Abbildung 42). Die Protein-ähnliche Struktur **149** konnte massenspektrometrisch verifiziert werden.



**Abbildung 43:** Protein-ähnliche Struktur (SGSGSGS (grün), DYKGS-G-Lys (N<sub>3</sub>) (rot), YPYDGS-Propargylglycin (gelb)), die am Rink-Amid-Harz (**32**) unter Verwendung des trifunktionalen Linkers **132** (TriL1) (schwarz) synthetisiert wurde. <sup>[112]</sup>

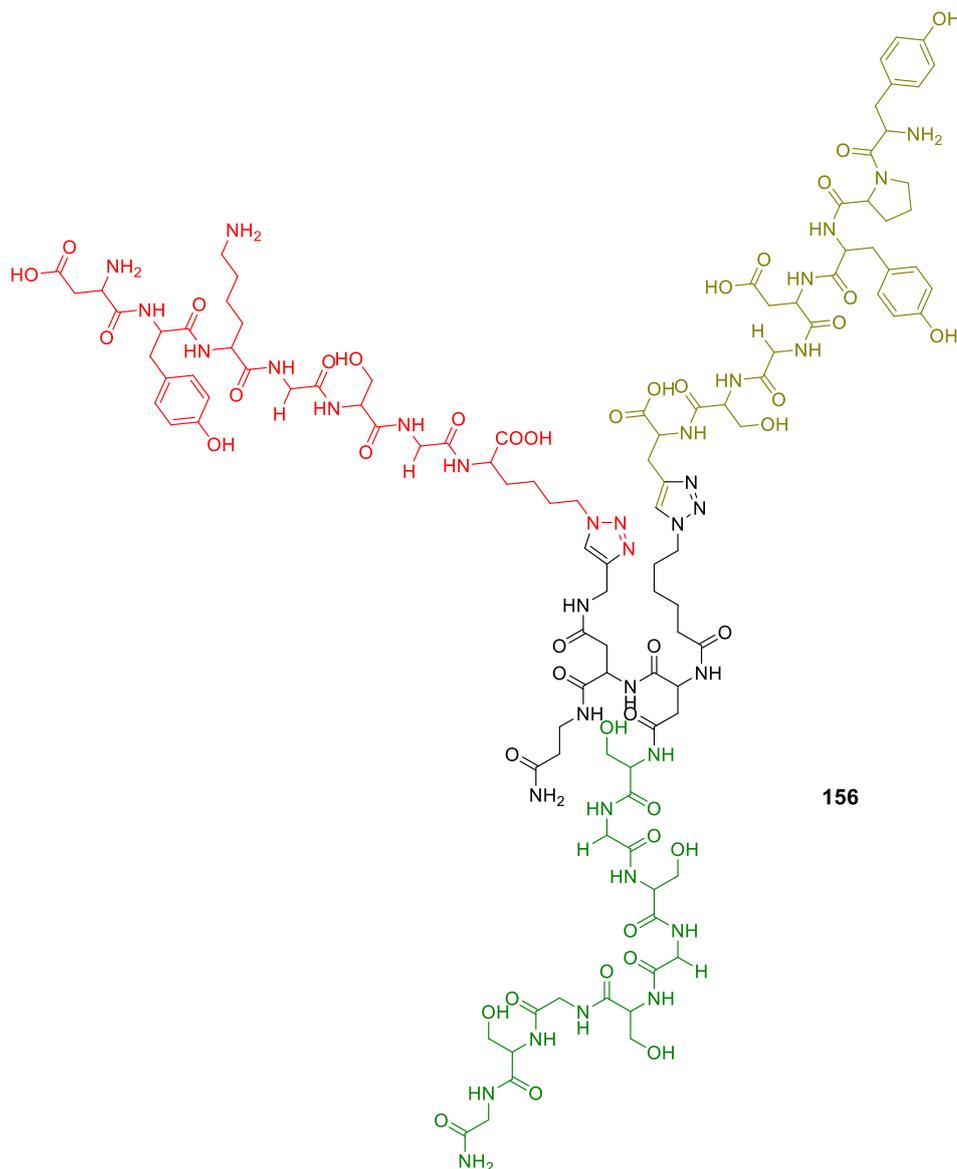
### 3.1.14. Synthese von Protein-ähnlichen Strukturen an der Oberfläche

Nach dem die Erzeugung der Protein-ähnlichen Strukturen an den Beads erfolgreich durchgeführt werden konnte, sollten Protein-ähnliche Strukturen dem TriL1 **132** an Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen verwirklicht werden. Dazu wurde der Versuch analog des Versuchs am Harz durchgeführt, jedoch wurden die Reaktionsbedingungen an die Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen angepasst. Die Syntheseroute der neuen Protein-ähnlichen Struktur **155** ist in Schema 32 veranschaulicht. <sup>[112]</sup>



**Schema 32:** Syntheseroute von Protein-ähnlichen Strukturen an einer Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche unter der Verwendung des trifunktionalen Linkers **132** (TriF1).<sup>[112]</sup>

Für eine massenspektrometrische Untersuchung wurde eine vorsynthetisierte Gly-Rink- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche, an die das Peptid 1 (Fmoc-(SGSGSGS)<sub>P</sub>-OH) angeknüpft wurde, verwendet. Zudem wurden die Peptide 2 und 3: Fmoc-YPYDGS-PropargylG-OH und Fmoc-DYKGS-G-Lys(N<sub>3</sub>)-OH, die *via* Click-Chemie angeknüpft wurden, eingesetzt. Die Silylentschützung wurde 15 min durchgeführt werden, um eine Zerstörung der Oberfläche zu vermeiden. Das Produkt **146** konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Abbildung 44).<sup>[112]</sup>

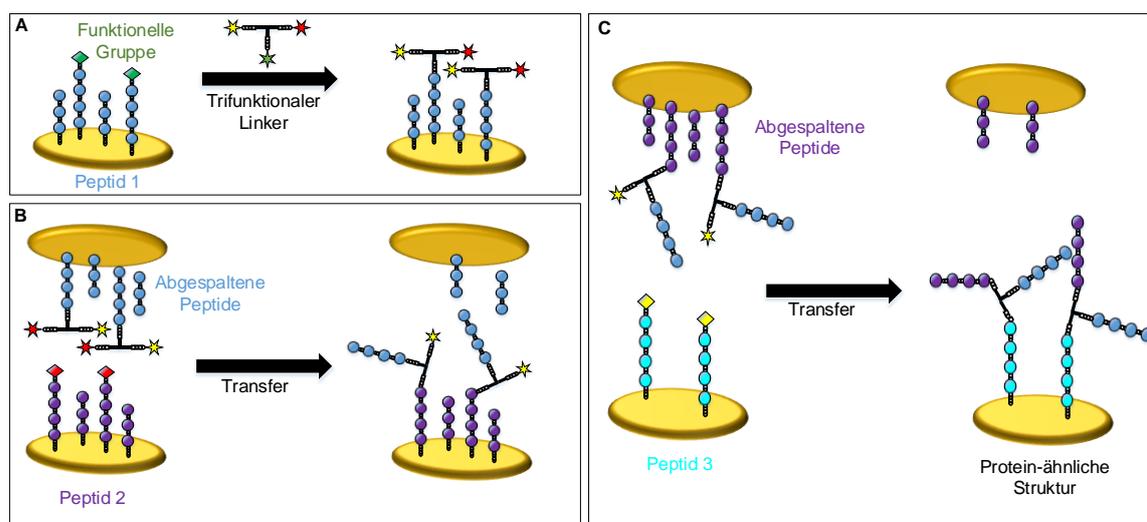


**Abbildung 44:** Protein-ähnliche Struktur **156** (SGSGSGS (grün), DYKGS-G-Lys(N<sub>3</sub>) (rot), YPYDGS-Propargylglycin (gelb)), die am Rink-Amid-Harz (**32**) unter Verwendung des trifunktionalen Linkers **132** (TriF1) (schwarz) synthetisiert wurde.<sup>[112]</sup>

### 3.1.15. Synthese von aufgereinigten Protein-ähnlichen Strukturen durch einen mehrfachen Transfer

Nachdem Protein-ähnliche Strukturen erfolgreich auf einer Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche aufgebaut wurden, sollten nun, mit dem in Kapitel 3.1.1. beschriebenen Konzept, gereinigte Protein-ähnliche Strukturen mittels einem mehrfachen Transfer von abgespaltenen Peptiden von *in situ* generierten Arrays erzeugt werden.

Zu Beginn wurde der Transfer unter der Verwendung von flächig funktionalisierten Oberflächen durchgeführt, um eine ausreichende Menge des gewünschten Produkts für eine massenspektrometrische Analyse zu erhalten. Zudem wurde die Synthese dadurch deutlich vereinfacht, da die Oberflächen in der Transfermaschine nicht ausgerichtet werden müssen, um die Peptidspots zu treffen. In Abbildung 45 ist die Vorgehensweise des Versuches dargestellt.

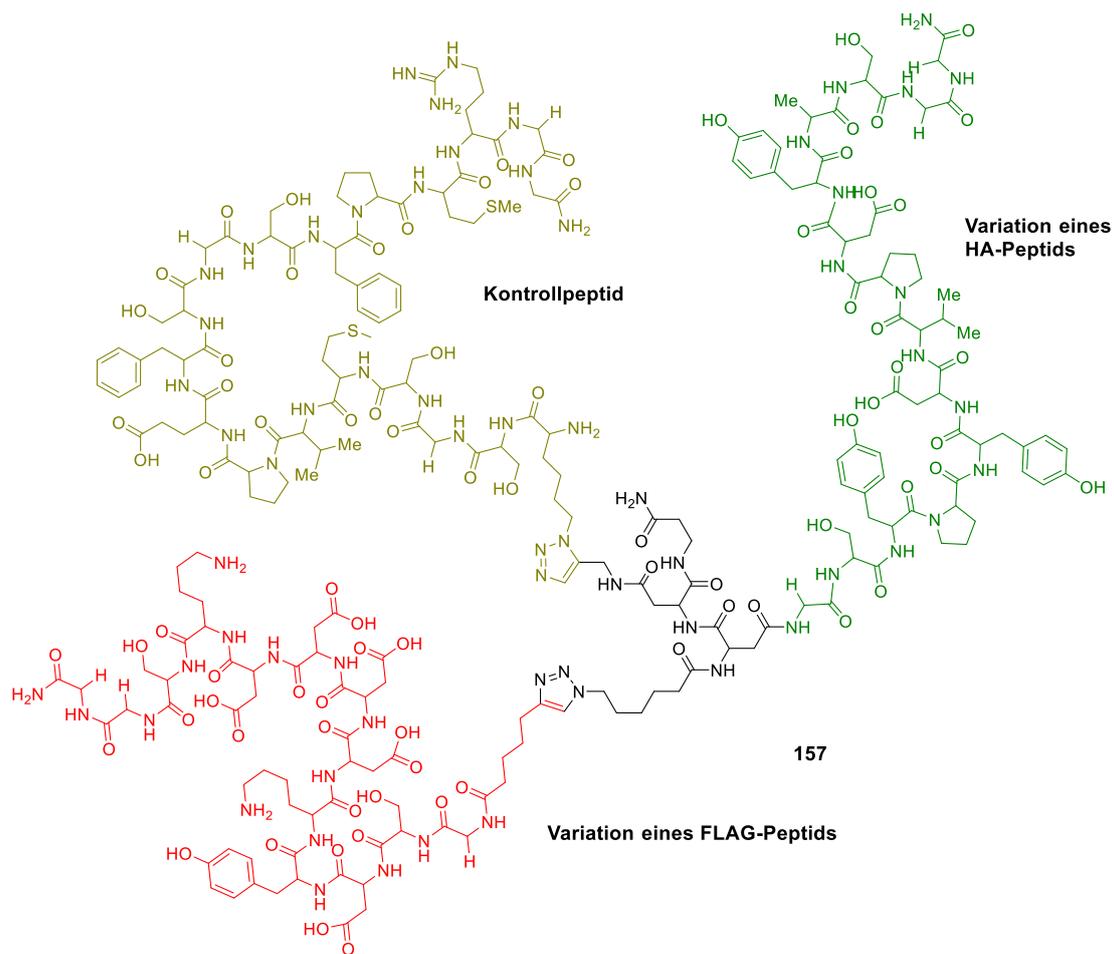


**Abbildung 45:** Synthese von Protein-ähnlichen Strukturen mittels eines mehrfachen Transfers mit einer Transfermaschine.<sup>[112]</sup>

Zuerst wurde eine Gly-Rink- $\beta$ -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit dem Peptid HA-Variante (GSYPDVDPDYAGS)<sub>p</sub>) unter der Verwendung von HBTU (**14**), DIPEA, HOBt (**8**) in DMF funktionalisiert und nach einer Acetylierung und Fmoc-Entschützung wurden die Oberfläche mit dem trifunktionalen Linker **132** (TriF1), DIC (**6**) und HOBt (**8**) in DMF umgesetzt (Abbildung 45A). Die Peptide wurden dann mit TFA-Dampf von der Oberfläche abgespalten und der Transfer mit einer manuellen Transfermaschine<sup>[57, 103]</sup>

(Kap. 1.3.13.) auf eine zweite Oberfläche, die eine Variante eines alkylierten FLAG-Peptid (Heptinsäure-GSDYKDDDDKAGS)<sub>p</sub>-) trug, durchgeführt und die abgespaltenen Peptide dabei *via* CuAAC unter der Verwendung von CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat, DMSO und H<sub>2</sub>O gekuppelt (Abbildung 45B). Ca. 1.00 cm<sup>2</sup> der Fmoc-NH-βAla-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde abgeschnitten und der erfolgreiche Transfer und die Bildung des Dipeptids wurden *via* Immunfärbung mit Anti-HA-DyLight 680 gezeigt. Als Positiv-Kontrolle wurde der Transfer ohne Kupfersulfat durchgeführt. Nach einer Immunfärbung konnte kein HA-Peptid nachgewiesen werden, sodass von einer Bildung des Dipeptides ausgegangen werden kann. Zudem bestätigt dieses Experiment, dass sich das HA-Peptid nicht unspezifisch in die FLAG-Oberfläche einlagerte.

Anschließend wurden die noch übrig gebliebenen freien Alkine *via* CuAAC unter der Verwendung von Azidoessigsäure (**113**) geblockt. Nach dem das Alkin mit TBAF entschützt wurde, wurde der zweite Transfer auf eine zuvor funktionalisierte dritte Gly-Rink-βAla-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche, die eine ein azidiertes Kontrollpeptid ((NH<sub>2</sub>-Lys(N<sub>3</sub>)-SGSMVPEFSGSFPMRG)<sub>p</sub>), das *via* Immunfärbung mit einem menschlichen Serum nachgewiesen werden kann, besaß, unter der Verwendung der manuellen Transfermaschine durchgeführt (Abbildung 45C). Der erfolgreiche Transfer wurde mit einer Immunfärbung mit Anti-HA-DyLight 680 nachgewiesen. Das Rohprodukt wurde unter der Verwendung von TFA, TIBS, H<sub>2</sub>O in DCM vom säurelabilen Rink-Amid-Linker (**87**) abgespalten und die Protein-ähnliche Struktur **157** konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Abbildung 45).<sup>[112]</sup> Durch die Art des Transfers wurden lediglich Protein-ähnliche Strukturen aus drei unterschiedlichen Peptiden aufgebaut. Die erhaltene Protein-ähnliche Struktur wäre bei der Verwendung von *in situ* generierten Peptidoberflächen und einer bereits im Vorfeld aufgereinigten Kontrollpeptid-Oberfläche aufgereinigt, wobei alle ungewünschten Abbruchsequenzen (siehe Kap. 1.4.2) eliminiert wären.

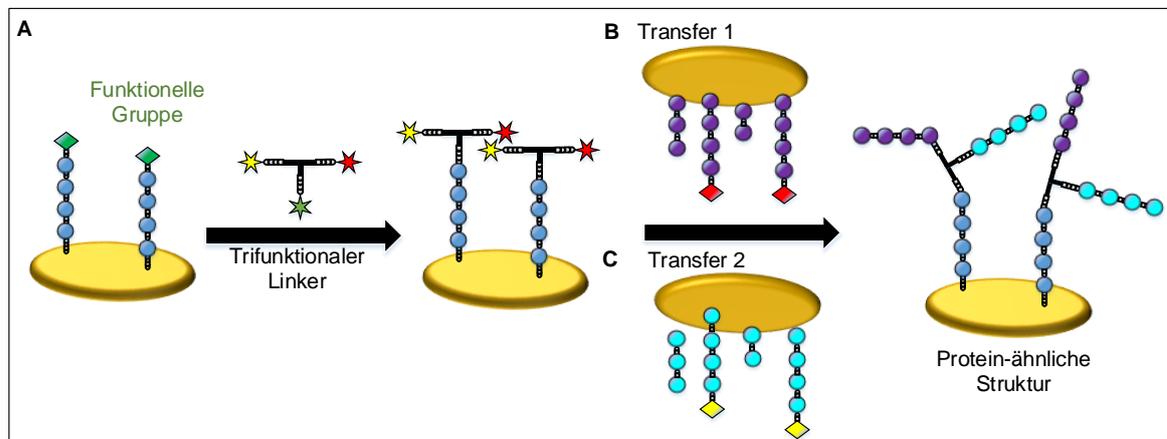


**Abbildung 46:** Protein ähnliche Struktur **157** (GSYPYDVPDYAGS; TriL1; NH<sub>2</sub>-Propargylglycin-GSDYKDDDDKAGS; NH<sub>2</sub>-Lys(N<sub>3</sub>)-SGSMVPEFSGSFPMG).<sup>[112]</sup>

### 3.1.16. Synthese von aufgereinigten Arrays mit Protein-ähnlichen Strukturen durch einen mehrfachen Transfer

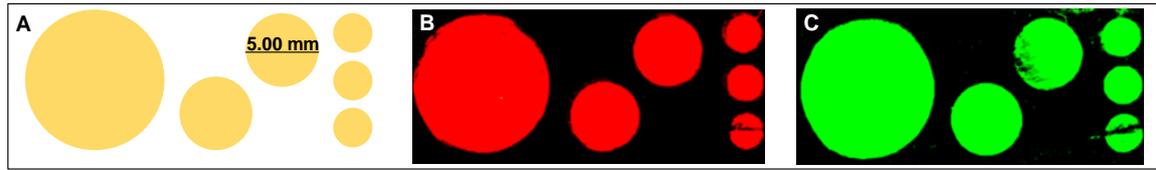
Nachdem eine Syntheseroute zur Erzeugung von aufgereinigten Protein-ähnlichen Strukturen gefunden wurde, sollten als nächstes Arrays generiert werden. Aufgrund der fehlenden Positionierungsvorrichtung in der halbautomatischen Transfermaschine, wurde ein Peptidarray-Layout entworfen, das aus unterschiedlich großen Kreisen (2.50 mm, 5.00 mm und 10.0 mm, *Pitch*: 100 µm) besteht, damit die Ausrichtung per Hand vereinfacht ist und die Peptidspots getroffen werden (Abbildung 47D). Zudem wurde das Experiment vereinfacht, in dem zuerst ein Peptidarray (Akzeptor) mit dem trifunktionalen Linker funktionalisiert werden sollte (Abbildung 47A) und dann sollte nacheinander ein

zweiter und dritter Peptidarray auf diesen Akzeptor transferiert werden (Abbildung 47B und 46C).



**Abbildung 47:** Syntheseroute zur Erzeugung von Arrays mit Protein-ähnlichen Strukturen. <sup>[112]</sup>

Für das Experiment wurden drei  $\text{NH}_2$ - $\beta$ A-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen mit der cLIFT-Methode unter Verwendung von Fmoc-Gly-OPfp (**102**) vorstrukturiert um einen Array zu erhalten. Nach einer Acetylierung und Entschützung wurde der zweite und der dritte Array mit einem Fmoc-Photo-Linker unter der Verwendung von HBTU (**14**), DIPEA, HOBt (**8**) in DMF funktionalisiert. Die Peptidarrays wurden dann wie in Abschnitt 3.13. generiert. Der erste  $\text{NH}_2$ -SGSMVPEFSGSFPMRG-Array wurde dann mit trifunktionalen Linker **132** (TriL1) umgesetzt. Anschließend wurden die Peptide des  $\text{NH}_2$ -Propargylglycin GSYPYDVDPDYAGS-PL-Arrays durch eine UV-Bestrahlung abgespalten und ein Transfer mit der halbautomatischen Stempelmaschine auf den ersten Peptidarray durchgeführt und dabei die Peptide *via* Click-Chemie gekuppelt. Abschließend wurden die abgespaltenen Peptide des  $\text{NH}_2$ -Lys( $\text{N}_3$ )-GSDYKDDDDKAGS-PL-Arrays transferiert und gekuppelt. Die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten wurden entfernt und der Transfer durch eine Anti-HA-DyLight 680 und Anti-FLAG-DyLight 800 Inkubation nachgewiesen (Abbildung 48). <sup>[112]</sup>



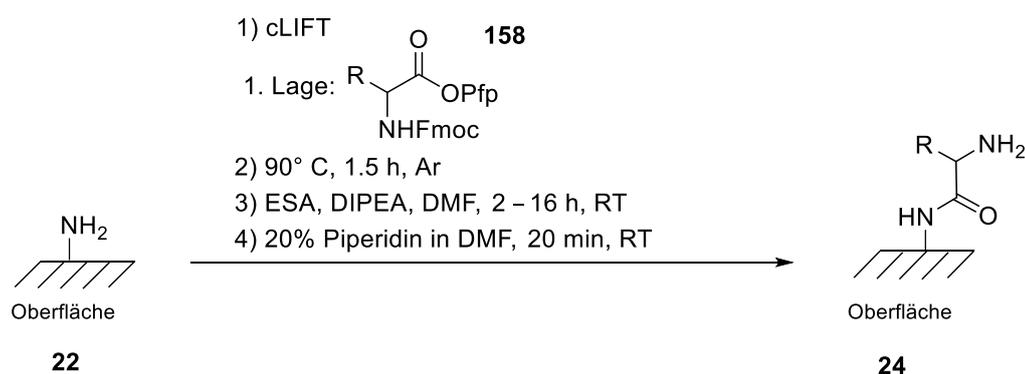
**Abbildung 48:** (A) Layout und Fluoreszenzscan des Arrays mit einer Protein-ähnlichen Struktur **212** nach einer Anti-HA-*DyLight* 680 und Anti-FLAG *DyLight* 800 Inkubation (B) 700 nm und (C) 800 nm. Die Bilder wurden in Kontrast und Helligkeit angepasst. <sup>[112]</sup>

Der trifunktionale Linker in Kombination mit dem Peptidtransfer ermöglicht es erstmals gereinigte Protein-ähnliche Strukturen aus *in situ* generierten Array zu generieren. In Kombination mit einem Positionierungssystem werden dadurch kostengünstige gereinigte Arrays mit Protein-ähnlichen Strukturen zugänglich, die für Untersuchung von diskontinuierlichen und konformationellen Bindungsstellen genutzt werden können.

## 3.2. Generierung von Peptidarrays mit der cLIFT-Methode

### 3.2.1. Vorbetrachtungen

Die Erzeugung von Peptidarrays mit der cLIFT-Methode ermöglicht es, Peptidarrays mit einer Spotdichte von bis zu 18 000 Spots/cm<sup>2</sup> zu generieren. In vorherigen Arbeiten von Felix Loeffler, Tobias Foertsch und Roman Popov konnten Varianten des HA- und des FLAG-Epitops erfolgreich generiert werden. Der Nachweis erfolgte hierbei via Immunfärbung.<sup>[11]</sup> Für die Herstellung der Peptidarrays werden die verwendeten Aktivester der Aminosäuren (Fmoc-Aminosäure-OPfp **158**), die in ein Matrix-Material eingebettet sind, das sich auf einem mit Kaptonfolie beschichteten Objektträger (Donor-Oberfläche) befindet, hintereinander auf eine Akzeptor-Oberfläche mit Hilfe eines Lasers transferiert und anschließend in einem hitzeinduzierten Schritt an die freien Amine der Akzeptor-Oberfläche gekuppelt (Schema 33, Kap. 1.4.1.).



**Schema 33:** Verlauf der Aktivierung einer Aminosäure mit der cLIFT-Methode.

Die cLIFT-Methode wurde von Tobias Foertsch bezüglich verschiedener Prozessparameter wie unter anderem der Benutzung der Aminosäuren-Donoren, der Absorptionsschicht (Kaptonfolie), der Lasereinstellungen (Laserleistung und Bestrahlungsdauer) und der übertragenen Schichtdicke untersucht und optimiert.<sup>[123]</sup> Dabei konnte gezeigt werden, dass die Laserleistung in einer Größenordnung von 5% schwankt, sodass der Spotdurchmesser um ca. 25.0 µm variieren kann und zudem unterschiedliche Materialmengen transferiert werden können, die zu unterschiedlichen Kupplungsausbeuten führen.<sup>[123]</sup> Aus diesem Grund sollten Experimente, die verglichen werden sollen, nur am selben Tag und nach einer Aufwärmphase des Lasers (ca. 30 min) durchgeführt werden. Des Weiteren kann

durch die Veränderung der Bestrahlungsdauer die transferierte Materialmenge erhöht werden und damit höhere Kupplungsausbeuten zugänglich gemacht werden, solange die maximale Ausbeute, die durch die cLIFT-Methode möglich ist, noch nicht erreicht wurde. Es konnte für Fmoc-Gly-OPfp (**102**) gezeigt werden, dass, sobald die maximale Ausbeute erreicht ist (Bestrahlungsdauer kleiner 10 ms, Laserleistung: 100%), ein weiterer Materialtransfer zu keiner Steigerung der Ausbeute führt. Für größere Syntheseausbeuten müssen deshalb weitere separate Kupplungsschritte durchgeführt werden. In Kapitel 3.2.1. konnte gezeigt werden, dass eine Wiederholung der Kupplung nicht ausreicht, um die freien Bindungsstellen der Oberfläche abzusättigen. Zudem werden bei zunehmender Kupplungsausbeute größere Spots generiert, solange die maximal erreichbare Ausbeute noch nicht erreicht ist.<sup>[123]</sup> Zu hohe Bestrahlungsdauern in Kombination mit einer starken Laserleistung führen jedoch zu einer Zerstörung der Oberfläche bzw. möglicherweise des zu transferierenden Materials und müssen jedem ausgewählten Spotabstand (*Pitch*) angepasst werden, um getrennte Spots zu generieren. Zudem sind die Größen der Spots stark von den Eigenschaften der zu transferierenden Moleküle abhängig. Im Falle der Aminosäuren konnte Tobias Foertsch beobachten, dass die maximale Ausbeute bei Verwendung der Aminosäuren (alle 20 proteinogenen, außer Arginin) nur erreicht werden kann, wenn ein *Pitch* von mindestens 250  $\mu\text{m}$  für einen Peptidarray gewählt wird. Jede Aminosäure muss bei einer ermittelten idealen Laserleistung und Bestrahlungsdauer transferiert werden. Aufgrund der großen Spots von Tryptophan und Threonin ( $> 110 \mu\text{m}$ ) wäre ein *Pitch* kleiner als 120  $\mu\text{m}$  nicht möglich. Die Aminosäure Alanin würde hingegen eine Spotgröße von 60.0  $\mu\text{m}$  ermöglichen, jedoch unter Einbuße der Ausbeute.<sup>[123]</sup>

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass beschichtete Donor-Oberflächen bis zu zwanzigmal wiederverwendet werden können und eine Lagerung von fünf Monaten ohne Probleme möglich ist. Die Donor-Oberfläche von Arginin sollte jedoch frisch generiert werden, da sich der Aktivester auf Grund eines Ringschlusses instabil ist.<sup>[123]</sup>

Zudem wurde von Barbara Ridder ein alternatives Matrixmaterial, basierend auf Poly(dimethylacrylamid), mit dem Spotdichten von bis zu 20 000 Spots/ $\text{cm}^2$  möglich sind, hergestellt. Für gute Kupplungsausbeuten bei der Kupplung einer Aminosäure erfordert die Verwendung der Matrix jedoch Temperaturen von 110  $^{\circ}\text{C}$ .<sup>[124]</sup>

Eine Bestimmung der Kupplungseffizienz und eine chemische Analyse der synthetisierten Peptide wurden bisher jedoch noch nicht durchgeführt. Bei der Synthesedurchführung

wurde sich an dem bereits beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Peptidarrays mit einem Laserdrucker orientiert (Kap. 1.4.)<sup>[10]</sup> Des Weiteren eröffnet das cLIFT-Verfahren die Möglichkeit Sonderbausteine in Peptidarrays einzubauen (Kap. 3.2.3. und 3.2.6. – 3.2.8.). Im Prinzip ist es möglich jedes Molekül, solange es unter den gegebenen Bedingungen stabil ist, auf eine Oberfläche zu transferieren.

Für die nachfolgenden Versuche wurde bei gleichbleibender Laserleistung (100% = ~ 340 mW), mit einer Variation der Bestrahlungsdauer von 0.10 ms bis zu 10.0 ms und einem Pitch von 250  $\mu\text{m}$  gearbeitet, um einen Array zu generieren. Bei dieser Laserleistung wurden im Falle der Aminosäuren hohe Kupplungsausbeuten erreicht<sup>[123]</sup>, sodass die transferierte Materialmenge eines Stoffes ausreichend sein sollte, um eine chemische Reaktion ablaufen zu lassen, sofern sie möglich ist. Es ist jedoch zu beachten, dass es bei diesen Laserleistungen zu ineinanderlaufenden Spots kommen kann.

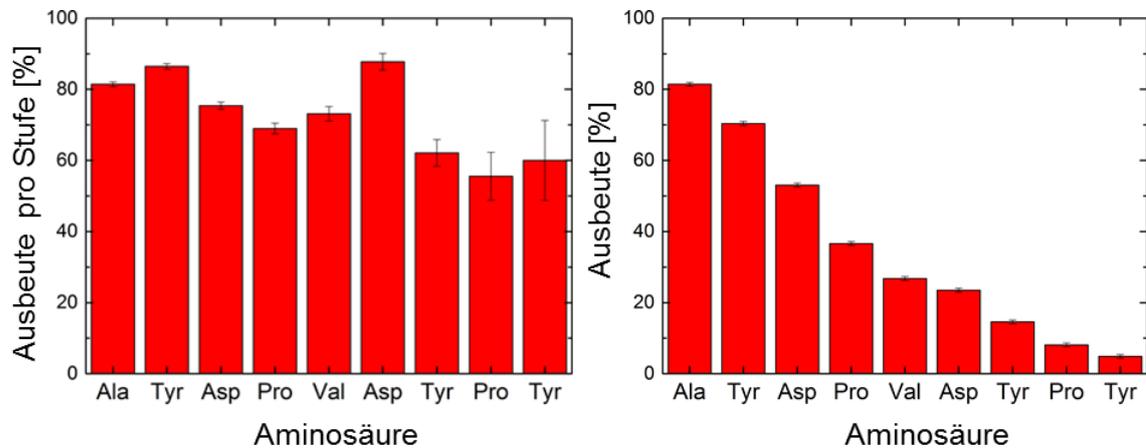
### 3.2.2. Kupplungseffizienz und repetitive Ausbeute

Für die Synthese von Peptidarrays mit der cLIFT-Methode wurden die Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen, die sich in vorherigen Studien für Peptidarrays als besonders geeignet herausstellten,<sup>[102]</sup> als Akzeptor-Oberflächen verwendet. Wie bereits in Kapitel 3.1.7. beschrieben, ist eine Bestimmung der Kupplungseffizienz aufgrund der geringen Derivatisierung und der starken Qualitätsschwankungen des Polymerfilms schwierig. Die erhaltenen Ergebnisse können lediglich als eine Abschätzung genutzt werden. Zu Beginn wurde die Kupplungseffizienz nach Transfer und Kupplung von Fmoc-Gly-OPfp (**102**) analysiert. Dazu wurde die Donor-Oberfläche mittels eines Spin Coaters mit der Polymermatrix und der Aminosäure beschichtet. Für die Generierung einer flächigen, homogenen Schicht auf dem Objektträger erwiesen sich die Einstellungen für die Drehzahl von 80 ppm und eine Dauer von 40 s als die beste Methode. Hierbei wurden Schichtdicken von bis zu 1.50  $\mu\text{m}$  erhalten.<sup>[125]</sup> Die Schichtdicken der Donor-Oberflächen haben keinen wesentlichen Einfluss auf die erhaltenen Kupplungsausbeuten.<sup>[123]</sup> Die Aminosäuren wurden dann mit einem kleinen *Pitch* (Laser-Layout: 1, *Pitch*: 100  $\mu\text{m}$ , Bestrahlungsdauer 5.00 ms) auf eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche transferiert, sodass anschließend eine flächige Kupplung an die Oberfläche erfolgen konnte. Die Derivatisierung der Oberfläche wurde vor und nach der Kupplung durch die Absorption des DFPA, das bei der

Fmoc-Entschützung gebildet wurde, photometrisch (Kap. 5.7.) bestimmt und daraus die Ausbeute berechnet. Es konnte eine Ausbeute von bis zu 62% ermittelt werden. Die Homogenität der Oberfläche wurde durch die Anknüpfung eines Fluorophors überprüft. Die Oberfläche wurde flächig funktionalisiert, sodass keine Spots detektiert werden konnten. Dabei stellte sich heraus, dass die Menge des transferierten Materials nicht ausreichend war, um alle Bindungsstellen der Oberfläche abzusättigen. Bei einer Anknüpfung der aktivierten Aminosäuren in Lösung konnten Ausbeuten bis von zu 100% erreicht werden. Aus diesem Grund wurde im nächsten Experiment die Kupplung zweimal durchgeführt. Um anschließend die repetitive Ausbeute bei der Synthese eines Peptides bestimmen zu können, wurden nun vier Oberflächen mit der gleichen Entschützungs-Lösung (20% Piperidin in DMF (v/v)) hintereinander entschützt. Die erhaltenen repetitiven Ausbeuten können jedoch aufgrund der zahlreichen Faktoren (Umgebungstemperatur, Messfehler, Pipettierfehler, Schwankungen innerhalb der Chargen der Oberflächen etc.) nur als eine Abschätzung der Ausbeute angesehen werden.

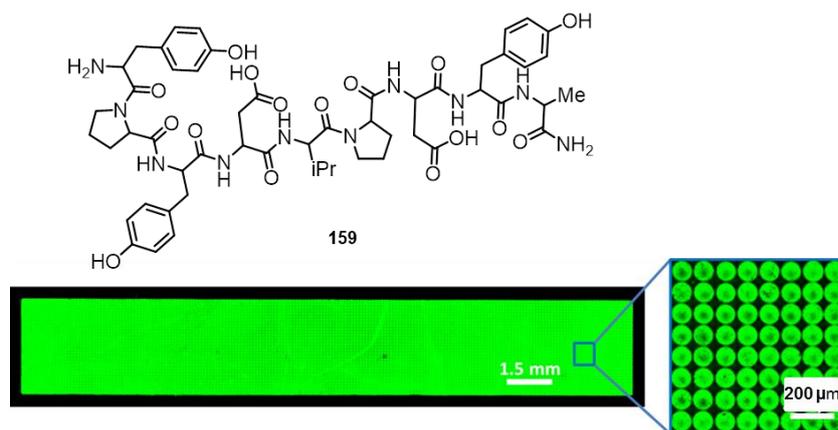
Dazu wurde in Zusammenarbeit mit Juliane Greifenstein das Peptid (YPDVPDYA) flächig auf einen Syntheseträger via cLIFT-Methode aufgebaut.<sup>[11, 124]</sup> Hierfür wurden vier Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen mit dem Rink-Amid-Linker (**87**) mittels Pentafluorophenol (**12**) und DIC (**6**) in DMF funktionalisiert. Die Oberfläche wurde anschließend für 2 h acetyliert. Dann wurde die Fmoc-Schutzgruppe mittels 20% Piperidin in DMF (v/v) abgespalten. Um das HA-Peptid aufzubauen, wurden nacheinander folgende Schritte durchgeführt (Laser-Layout: 1): 1) Transfer der Aminosäure mittels eines Lasertransfers und anschließendes Kuppeln im Ofen bei 90 °C; 2) Waschen der Oberflächen mit dem High PepPass (automatische Waschmaschine für Oberflächen); 3) Wiederholung der Schritte eins und zwei, um die Ausbeute zu erhöhen; 4) Acetylierung der Oberfläche mit ESA, DIPEA und DMF über Nacht; 5) Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 1.00 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) und 6) Bestimmung der Derivatisierung. Die Ausbeuten pro Stufe und die Gesamtausbeute wurden im Anschluss bestimmt (siehe Abbildung 49). Das Peptid konnte mit einer Ausbeute von ca. 5% erhalten werden. Zudem konnte nach der Anknüpfung des Alanins festgestellt werden, dass bei einer doppelten Kupplung die Syntheseausbeute immer noch nicht ausreichend ist, um alle Bindungsstellen auf der Oberfläche abzusättigen. Die Ausbeute kann vermutlich weiter erhöht werden, indem der Transfer und die anschließende Kupplung mehrmals wiederholt

werden. Die Ausbeuten sind jedoch ausreichend gut, sodass sich der erhöhte Zeitaufwand für die Generierung eines Peptidarrays nicht lohnt.



**Abbildung 49:** Ausbeute pro Stufe und Gesamtausbeute. Reproduziert unter CC-BY, Loeffler and Foertsch *et al.*<sup>[11]</sup>

Desweiteren wurde das HA-Peptid auf einer Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche aufgebaut, um die Homogenität der Oberfläche zu analysieren. Nach Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen wurde eine Anti-HA-Cy 3-Färbung durchgeführt (Abbildung 50).



**Abbildung 50:** Fluoreszenzscan bei 572 nm nach einer Anti-HA-Cy 3 Inkubation des synthetisierten Peptides 159. Reproduziert unter CC-BY, Loeffler and Foertsch *et al.*<sup>[11]</sup>

Das HA-Peptid konnte detektiert werden. Allerdings war keine flächige Funktionalisierung, sondern vielmehr Spots zu beobachten. In vorherigen Experimenten von Tobias Foertsch wurde bereits herausgefunden, dass die einzelnen Aminosäuren

unterschiedlich große Spots generieren<sup>[123]</sup>, sodass am Ende des Experiments große, voneinander abgetrennte Spots entstanden sein müssen. Aufgrund der veränderten Polarität der Oberfläche durch die wachsende Peptidkette, sind zudem auch Veränderungen in der Spotgröße wahrscheinlich.

### **3.2.3. Massenspektrometrische Untersuchungen**

#### **3.2.3.1. MALDI-Massenspektrometrie**

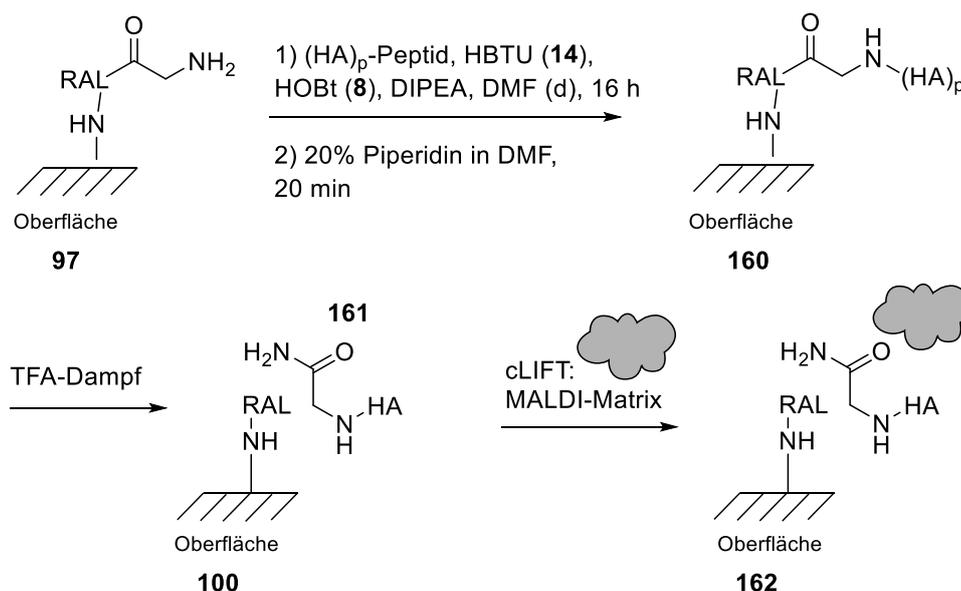
Bis jetzt wurden die mit der cLIFT-Methode synthetisierten Peptide nur *via* Immunfärbungen nachgewiesen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Antikörper möglicherweise auch mit kürzeren Abbruchsequenzen interagieren, sodass die eigentliche HA-Sequenz nicht unbedingt vorhanden sein muss. Ein massenspektrometrischer Beweis für den Aufbau der vollständigen HA-Sequenz *via* cLIFT-Methode wurde bisher nicht durchgeführt. Aufgrund der hohen Abspalteffizienz wurde der Rink-Amid-Linker (**87**) (Kap. 3.1.7.) gewählt, da hier bei einer Abspaltung gleichzeitig die Schutzgruppen der Seitenketten entfernt werden. Für das Experiment wurde das synthetisierte HA-Peptid (Kap.3.2.1.) mit TFA vom Rink-Amid-Linker (**87**) abgespalten, das Rohprodukt eingeeignet und anschließend MALDI-Spektrometrie durchgeführt. Das Peptid konnte massenspektrometrisch verifiziert werden.

#### **3.2.3.2. Ortsaufgelöste MALDI-Massenspektrometrie**

Bei der *in situ* Generierung von Peptidarrays ist es möglich, dass Peptidsequenzen nicht entstanden sind bzw. zahlreiche Abbruchsequenzen vorhanden sind. Die detektierten Interaktionen der Antikörper mit den entsprechenden Antigenen können in Bindungsstudien somit aufgrund von Abbruchsequenzen entstanden sein. Eine weitere Möglichkeit ist, dass ein wichtiger Binder nicht gefunden wurde, da die Sequenz nicht synthetisiert wurde. Aus diesem Grund ist die Analyse der Aminosäuresequenz in einem Spot von großem Interesse. Die Analyse kann mit ortsaufgelöster MALDI-Spektrometrie erfolgen (Kap. 1.10.). Hierbei muss sowohl die Abspaltung der Moleküle, als auch der MALDI-Matrix-Transfer ortsaufgelöst erfolgen.

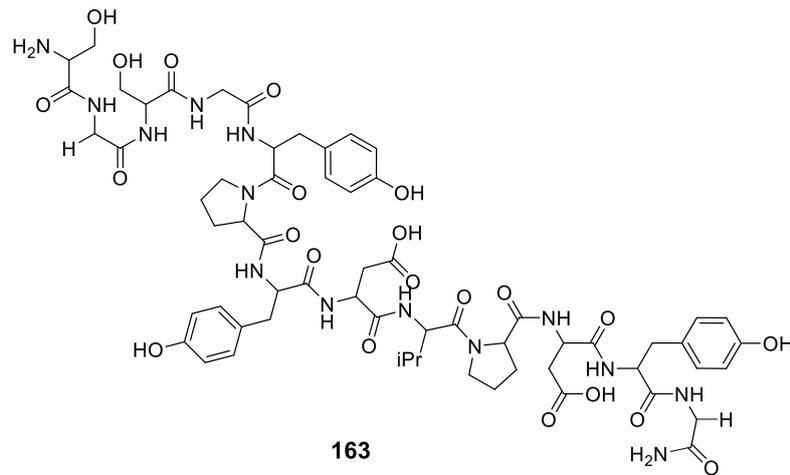
Aus Kap. 3.1.7. ist bereits bekannt, dass der Fmoc-Photo-Linker (PL) (**86**) oder auch der Fmoc-Rink-Amid-Linker (RAL) (**87**) auf den Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen genutzt werden können, um hohe Abspalteffizienzen zu erhalten. Jedoch kommt es bei der Verwendung des Rink-Amid-Linkers (RAL) (**87**) innerhalb kürzester Zeit zu einer Diffusion der Moleküle, sodass der Photo-Linker (**86**) vorzuziehen ist.

Für das Experiment wurde ein Peptidarray generiert, mit dessen Hilfe anschließend die abgespaltenen Peptide nachgewiesen werden sollten (Schema 34).



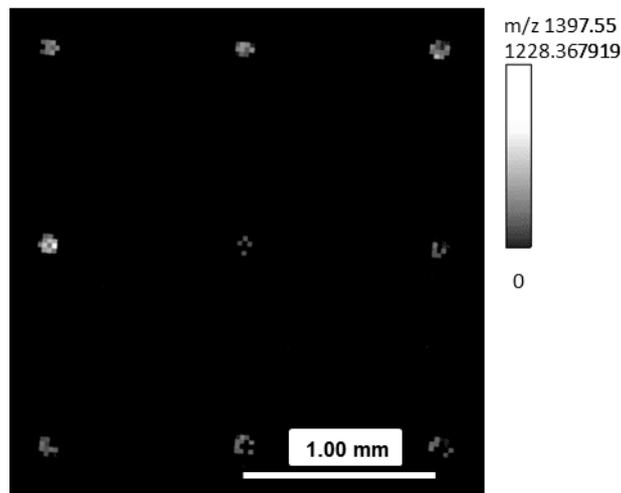
**Schema 34:** Darstellung der Syntheseroute zur Durchführung des MALDI-Experiments (RAL = Rink-Amid-Linker (**87**)).

Es wurden zwei Fmoc-NH<sub>2</sub>- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt und der Fmoc-Rink-Amid-Linker (**87**) mit Pentafluorophenol und DIC (**6**) in DMF angeknüpft. Dieser Linker wurde erneut ausgewählt, da die Schutzgruppen der säurelabilen Aminosäuren gleichzeitig abgespalten werden. Zudem spielte eine Diffusion der Peptide in diesem Experiment keine Rolle. Nach einer erneuten Fmoc-Entschätzung wurde die Oberfläche mittels cLIFT-Methode (Laser-Layout: 2), indem Fmoc-Gly-OPfp (**102**) transferiert und gekuppelt wurde, vorstrukturiert. Ein HA-Peptid wurde nach einer Fmoc-Entschätzung mit HBTU (**14**) und DIPEA über Nacht an den N-Terminus gekuppelt. Das Peptid **163** (Abbildung 51) wurde dann unter TFA-Dampf abgespalten.



**Abbildung 51:** HA (YPYDVPDYA)-Gly-Amid (**163**).

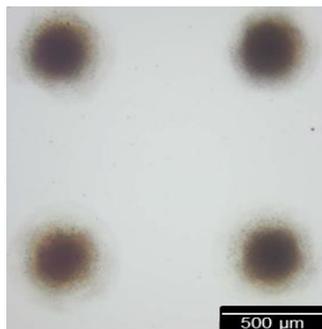
Zuerst wurde versucht die MALDI-Matrix über eine Sprühmethode (SMALDIPrep von TransMIT GmbH) aufzutragen und anschließend orts aufgelöste MALDI-Spektrometrie durchzuführen. Die abgespaltenen Peptide konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise war die MALDI-Matrix-Schicht zu dick (ca. 20.0 – 50.0  $\mu\text{m}$ ). Aus diesem Grund wurde versucht die MALDI-Matrix mittels LIFT zu transferieren. Dazu wurde ein Objektträger, der mit einer Kaptonfolie beklebt wurde, mit der Universal-MALDI-Matrix mithilfe des Spin Coaters beschichtet und die Matrix Laser-transferiert. Die Peptide konnten anschließend via orts aufgelöster MALDI-Spektrometrie verifiziert werden. In Abbildung 52 ist ein Ausschnitt eines erhaltenen MALDI-Imaging-Bilds des Peptides **163** dargestellt.



**Abbildung 52:** MALDI-Imaging-Bild ( $[M(\text{HA-G-Amid})+\text{Na}]^+$ ) eines abgespaltenen HA-Peptides von einem Peptidarray, der mit der cLIFT-Methode mittels Fmoc-Gly-OPfp (**102**) vorstrukturiert wurde. Das HA-Peptid wurde anschließend in DMF an die freien Amine des immobilisierten Glycins gekuppelt.

Die Beschichtung *via* LIFT bringt zahlreiche Vorteile mit sich: 1) Aufgrund der Vermeidung eines Lösungsmittels kommt es zu keiner Diffusion der abgespaltenen Moleküle; 2) Jeder Spot kann mit einem Mikroskop lokalisiert werden, da die Matrix sich nur auf einem Spot befindet und 3) Ein gezielter Transfer der Matrix ermöglicht die Detektion der Kontrollspots ohne den Array zu zerstören.

Die Schichtdicke der transferierten Universal-Matrix wurde von Tobias Foertsch mittels Weißlicht-Interferometer bestimmt. Mit der Universal-MALDI-Matrix wurden Schichtdicken von 10.0 bis 100 nm erhalten. Dabei wurde die Matrix mit einem Spot-Abstand (*Pitch*) von 100  $\mu\text{m}$  transferiert. Durch die Überlagerung mehrerer Ringe konnten Schichtdicken von bis zu 250 nm erreicht werden.<sup>[123]</sup> In Abbildung 53 ist die Laser-transferierte Universal-MALDI-Matrix dargestellt. Hierbei wurde ein Layout (Laser-Layout: 3, *Pitch*: 1.00 mm) verwendet, bei dem ein Spot durch vierfachen Einschuss im Abstand von 10.0  $\mu\text{m}$  generiert wurde, um die Materialmenge der MALDI-Matrix zu erhöhen.

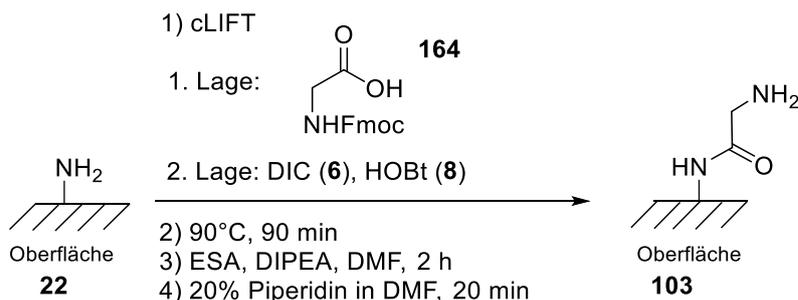


**Abbildung 53:** Mikroskopie-Aufnahme der transferierten Universal-MALDI-Matrix.

### 3.2.4. Transfer und Kupplung von nicht aktivierten Aminosäuren

Bis dato wurden mit der Standard cLIFT-Methode Aminosäuren, die OPfp-aktiviert sind, übertragen und in einem Hitze-induzierten Schritt an den freien Aminen der Oberfläche gekuppelt, um Peptidarrays zu generieren. Jedoch ist es auch möglich Aminosäuren, die nicht aktiviert sind, zu transferieren und diese dann durch ein geeignetes Kupplungsreagenz zu aktivieren und zu kuppeln. So kann während der Synthese auf voraktivierte, modifizierte Aminosäuren verzichtet werden, die als OPfp-Ester meistens nicht kommerziell erhältlich sind und somit selbst aktiviert werden müssten. Diese Aktivierung kann auch erfolgen, indem die Kupplungsreagenzien mittels LIFT auf die zuvor immobilisierte Aminosäure transferiert werden. Eine Mischung der einzelnen Lagen erfolgt hierbei im Hitze-induzierten Kupplungsschritt. Bastian Münster konnte bereits zeigen, dass die verwendete Polymermatrix die Diffusion einer aktivierten Aminosäure, die in der verwendeten Polymermatrix in einem Partikel eingebettet ist, über kleiner als 100 nm in den Synthesefilm (100% PEGMA) zulässt.<sup>[126]</sup>

Felix Loeffler und Tobias Foertsch konnten bereits zeigen, dass die Kupplung der Aminosäure Fmoc-Gly-OH (**164**) durch die Aktivierung von DIC (**6**) und die Bildung des Aktivesters mit HOBt (**8**) an die freien Amine der Oberfläche möglich ist.<sup>[11, 123]</sup> Hierbei wurde zuerst Fmoc-Gly-OH (**164**) und anschließend DIC (**6**) und HOBt (**8**), eingebettet in einer Donor-Oberfläche, transferiert (Schema 35). Diese Methode bringt den Vorteil mit sich, dass ohne Probleme Sonderbausteine (unaktivierte Aminosäuren, Carbonsäuren) in den Array eingebaut werden können. Die Methode wurde bisher jedoch nicht optimiert.



**Schema: 35:** Durchführung der cLIFT-Methode mit Fmoc-Gly-OH (**164**).

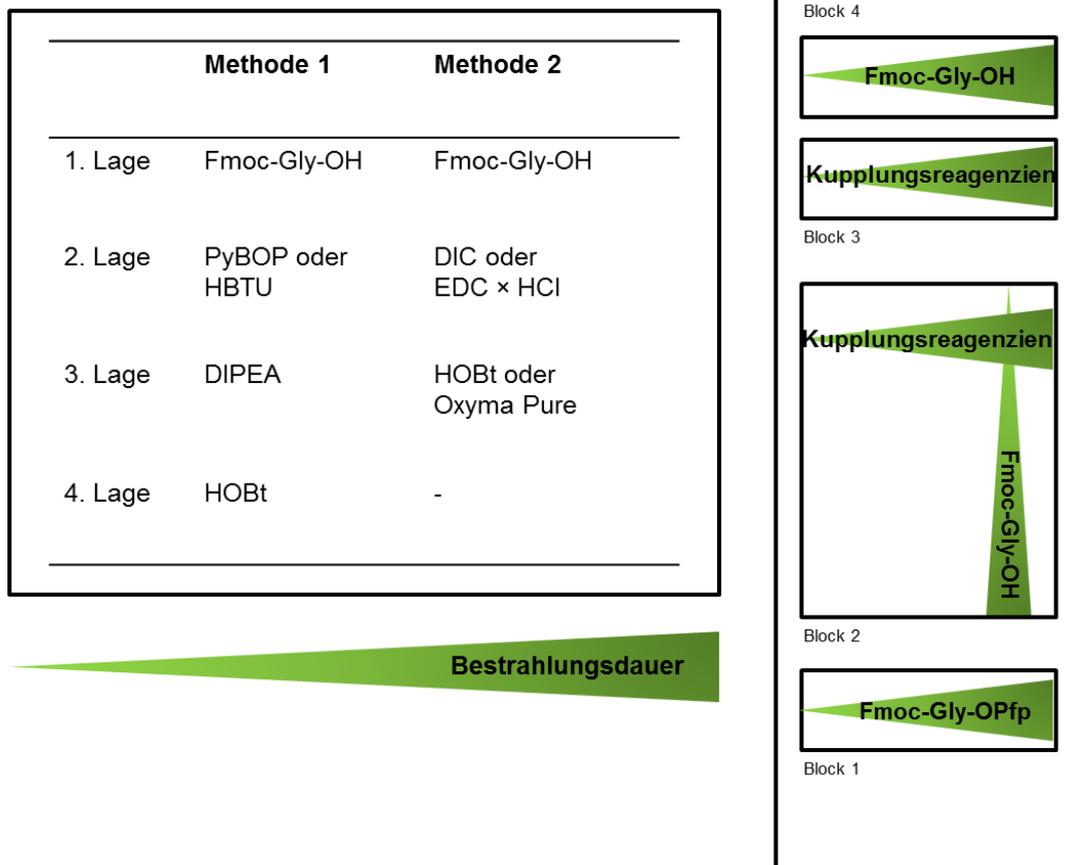
Aus diesem Grund sollten nun weitere Kupplungsreagenzien ausprobiert werden. Das verwendete DIC (**6**) bringt einige Nachteile mit sich: 1) DIC (**6**) ist eine Flüssigkeit, sodass es verdunsten kann, wodurch die Donor-Oberflächen nicht lagerfähig sind; 2) DIC (**6**) ist wasserempfindlich, sodass es sich aufgrund der Luftfeuchtigkeit und des vorhandenen Wassers in einer Polymeroberfläche leicht zersetzen kann; 3) Die gemeinsame Verwendung von DIC (**6**) und HOBt (**8**) in einer Donor-Oberfläche ist nicht geeignet, da das hygroskopische HOBt (**8**) die Zersetzung des DIC (**6**) verstärkt. Aus diesem Grund musste die Eignung von DIC (**6**) für diese Anwendung untersucht werden. Zudem wurden drei weitere Kupplungsreagenzien (PyBOP (**15**), HBTU (**14**), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC  $\times$  HCl) getestet. Auf die Verwendung von DCC (**12**) wurde verzichtet, da das entstehende Harnstoffderivat (Dicyclohexylharnstoff) sehr schwer löslich ist und somit von der Oberfläche nicht mehr zu entfernen ist. Die Einlagerung des Harnstoffs kann zu Problemen führen. Bei der Verwendung von PyBOP (**15**) und HBTU (**14**) wird zusätzlich eine Base benötigt. Hierfür wurde zuerst DIPEA ausgewählt, da die Akzeptor-Oberfläche gegenüber DIPEA stabil ist. Zusätzlich wurde HOBt (**8**) verwendet, da es die Racemisierung unterdrückt (Kap. 1.2.). Bei der Verwendung von DIC (**6**) oder EDC  $\times$  HCl wurde HOBt (**8**) oder als eine Alternative Hydroxyiminocyanessigsäureethylester (Oxyma Pure)<sup>[127]</sup> verwendet, um die Bildung von Nebenprodukten und der erwähnten Racemisierung zu umgehen (Kap. 1.2.). Der Vorteil an Oxyma Pure ist, dass es im Gegensatz zu wasserfreiem HOBt (**8**) nicht explosiv ist. Dazu wurden die unterschiedlichen Chemikalien (Aminosäuren, Aktivierungsreagenzien, sonstige Hilfsstoffe und ein Polymer als Matrixmaterial), die in DCM oder teilweise in DMF gelöst wurden, mittels Spin Coater auf eine Donor-Oberfläche, die mit einer Kaptonfolie beklebt wurde, aufgebracht. Als Positiv-Kontrolle diente der Transfer der nicht aktivierten Aminosäure (Fmoc-Gly-OH (**164**)) ohne die

Verwendung von Aktivierungsreagenzien. Zudem wurden nur in einem Block die Aktivierungsreagenzien transferiert. Zu beachten ist, dass Rückstände der Reagenzien unerwünschte Interaktionen bei der Durchführung einer Detektion via Fluoreszenz mit dem Fluorophor eingehen können und so zu falschen Rückschlüssen führen. Um die Funktionsfähigkeit der Oberfläche zu überprüfen, wurde Fmoc-Gly-OPfp (**102**) transferiert und gekuppelt. Mit diesen Voraussetzungen wurde ein Layout (Parameter des Laser-Layouts 4: 3 Reihen  $\times$  7 Blöcke mit zusätzlichem Block ( $7 \times 7$ ) und einer Variation der Bestrahlungsdauer in x- und y-Richtung) entworfen (Abbildung 54).

Durch Änderung der Bestrahlungsdauer, der Aminosäure und der Kupplungsreagenzien, kann die ideale Bestrahlungsdauer jedes Kupplungsreagenzes gefunden werden, sodass hohe Kupplungsausbeuten und voneinander getrennte Spots erhalten werden.

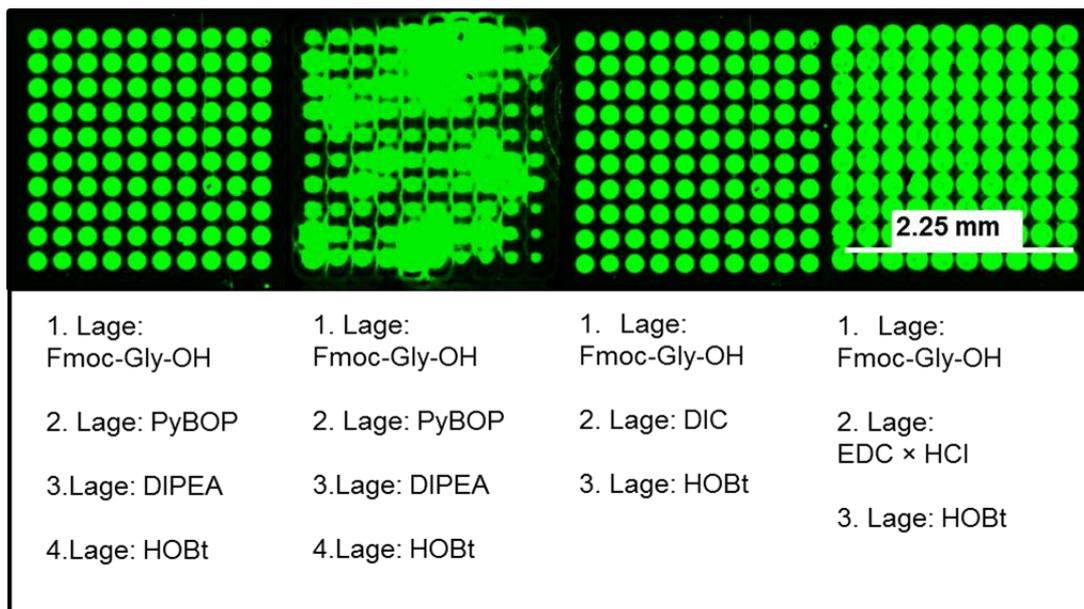
Für das Experiment wurden vier Fmoc-NH<sub>2</sub>- $\beta$ Ala-10:90 PEGMA-co-MMA Oberflächen mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt. Die auf den Donoren vorbereiteten Chemikalien wurden dann nach Layout 4 (Abbildung 54) in der angegebenen Reihenfolge auf die Akzeptor-Oberflächen transferiert. Anschließend erfolgten die Diffusion, gegebenenfalls die Aktivierung und die Kupplung der Aminosäure an die freien Amine der Oberfläche bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen. Die noch freien Amine wurden mittels ESA und DIPEA in DMF acetyliert und die Fmoc-Schutzgruppen entfernt. Zur Detektion der erfolgreichen Kupplung wurde die Oberfläche mit TAMRA-NHS in PBS-T inkubiert und die Fluoreszenzintensität mit einem Scanner detektiert. Aufgrund der beschriebenen unterschiedlichen Homogenität des Polymerfilms (siehe Kap. 3.1.7.), sollten Fluoreszenzintensitäten nur von Oberflächen einer Charge und bei einer gemeinsamen Inkubation in einer Petrischale verglichen werden. Jedoch empfiehlt es sich diese Experimente auf einer Oberfläche durchzuführen, da diese Homogenitäts-Unterschiede bereits bei der gleichen Charge beobachtet wurden.

Die Verwendung aller Kupplungsreagenzien führte zu einer positiven Kupplung des Fmoc-Gly-OH (**164**). Die Kupplungsreagenzien PyBOP (**15**) und DIC (**6**) führten zu homogenen Spots (Abbildung 55). Im Falle des DIC (**6**) wurde jedoch die Positiv-Kontrolle (nur Fmoc-Gly-OH (**164**)) an die Oberfläche gekuppelt, sodass von einer Kontamination beim Auflegen der DIC-Donor-Oberfläche auf die Akzeptor-Oberfläche ausgegangen wurde. In weiteren Experimenten bestätigte sich dieser Verdacht. Jedoch ist eine DIC-Kontamination kein Problem, solange die Aminosäure die Oberfläche nicht kontaminiert.



**Abbildung 54:** Aufbau des cLIFT-Experiments.

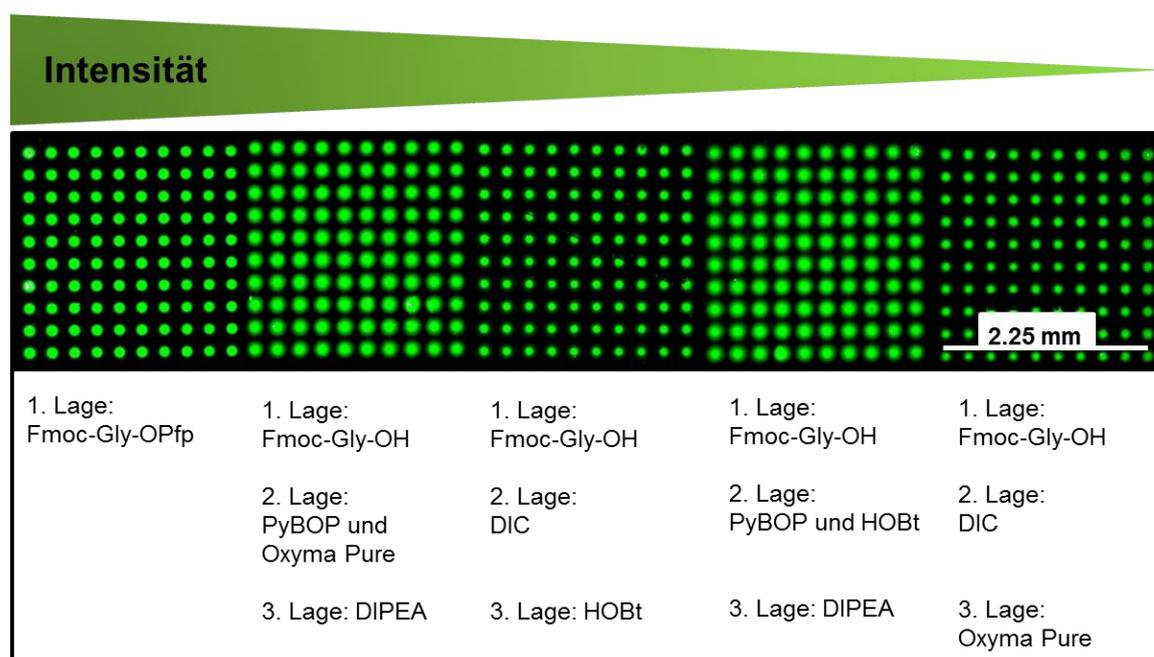
Diese Kontamination der Aminosäuren war nicht zu beobachten.<sup>[123]</sup> In weiteren Experimenten stellte sich jedoch bei der Verwendung von DIC (**6**) heraus, dass das Öfteren sehr schlechte Kupplungsausbeuten detektiert wurden. Möglicherweise wird das DIC (**6**) durch die Luftfeuchtigkeit zersetzt. Im Falle des HBTU (**14**), das in DMF gelöst wurde, war eine Löslichkeit in der Polymermatrix und in DCM nicht möglich, sodass eine inhomogene Donor-Oberfläche entstanden ist. Diese Inhomogenität wurde auch nach der Kupplung beobachtet (Abbildung 55). Die Verwendung von EDC × HCl führte zu sehr großen Spots, die unscharf erscheinen.



**Abbildung 55:** Ausschnitt der Fluoreszenzscans nach einer TAMRA-NHS-Inkubation der gekuppelten Aminosäure. Die Bilder wurden in Helligkeit und Kontrast optimiert.

Das vollständige Lösen von EDC × HCl konnte in DMF, der Polymer-Matrix und in DCM erreicht werden. Es wurde ein homogener Donor erhalten, der jedoch gleichmäßig mit einem weißen Feststoff (wahrscheinlich EDC × HCl) beschichtet war. Die Kupplung des Fmoc-Gly-OH (**164**) war auch hier positiv. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um eine Kontamination durch den Kontakt der Donor-Oberfläche mit der Akzeptor-Oberfläche, sondern um eine Kontamination während der Reaktion im Ofen. Das freie EDC, das einen Siedepunkt kleiner als 50° C hat, konnte durch die Gasphase die benachbarten Spots kontaminieren und somit eine Kupplung der Aminosäure ermöglichen. Bei allen Versuchen konnten die besten Ergebnisse erzielt werden, wenn die Bestrahlungsdauer der Aktivierungsreagenzien und der Aminosäuren 10.0 ms betrug. Jedoch besteht bei einem *Pitch* von 250 μm die Gefahr, dass keine getrennten Spots generiert werden. Das Experiment wurde nach zehn Tagen mit denselben beschichteten Donor-Oberflächen, die unter Argon gelagert wurden, durchgeführt, um die Haltbarkeit der Donor-Oberflächen zu testen. Alle Kupplungen erwiesen sich als positiv. Im Falle des DIC (**6**) wurden deutlich geringere Fluoreszenzintensitäten erhalten. PyBOP (**15**) führte ebenfalls zu einer geringeren Intensität, die jedoch zufriedenstellende Ausbeuten generierte. In weiteren Experimenten wurde aus diesem Grund mit frisch hergestellten Donor-Oberflächen gearbeitet, um Fehler bei der Analyse der Ergebnisse zu vermeiden. Desweiteren wurde die

Verwendung von Oxyma Pure anstelle von HOBt (**8**) untersucht. Dazu wurde ein Layout verwendet, das aus fünf Streifen besteht (Laser-Layout: 4), die per Computerbefehl getrennt beschossen werden können. Der Versuch wurde analog des Versuchs aus Abbildung 56 durchgeführt. In Abbildung 57 ist die Reihenfolge der transferierten Chemikalien dargestellt. Die Fluoreszenzintensitäten und Spotgrößen wurden jeweils verglichen. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der Ausbeute der Anknüpfung der Aminosäure an die freien Amine der Akzeptor-Oberfläche.



**Abbildung 56:** Ausschnitt der Fluoreszenzscans nach einer TAMRA-NHS-Inkubation des gekoppelten Glycins. Das Experiment wurde auf einer Akzeptor-Oberfläche durchgeführt, um Aussagen über die Spotgrößen im Vergleich zu Fmoc-Gly-OPfp (**102**) treffen zu können. Die Bilder wurden in Helligkeit und Kontrast optimiert.

In allen Experimenten konnten hohe Ausbeuten erhalten werden. Im Vergleich zu Fmoc-Gly-OPfp (**102**) ermöglichte PyBOP (**15**) in Kombination mit Oxyma Pure hohe Ausbeuten. In weiteren Experimenten konnte festgestellt werden, dass die Verwendung von Oxyma Pure sehr große Spots generieren kann. In diesem Fall muss die Bestrahlungsdauer reduziert werden, wodurch es jedoch zu verringerten Ausbeuten kommt. Aus diesem Grund wurde in weiteren Experimenten mit dem wasserfreien HOBt (**8**) gearbeitet.

Die Spotgröße der gekuppelten, DIC-aktivierten Aminosäuren war hierbei kleiner als 150  $\mu\text{m}$  und somit kleiner als die des Fmoc-Gly-OPfp (**102**) ( $< 170 \mu\text{m}$ ). Bei der Verwendung von PyBOP (**15**) wurden Spotgrößen von kleiner 200  $\mu\text{m}$  Bestrahlungsdauer bei gleicher Bestrahlungsdauer generiert. Die Verwendung des Oxyma Pure anstelle des HOBt (**8**) führte zu guten Ergebnissen. Aus diesem Grund sollte bei der Verwendung von DIC-aktivierten Aminosäuren ein kleinerer *Pitch* als 250  $\mu\text{m}$  für einen Peptidarray zugänglich sein (siehe Kap. 3.2.1.). Die Verwendung von PyBOP (**15**) lässt wahrscheinlich einen *Pitch* von 250  $\mu\text{m}$  für einen Peptidarray nicht zu.

In weiteren Experimenten wurde in Zusammenarbeit mit Juliane Greifenstein die Kupplung der Aminosäuren mit PyBOP (**15**) oder DIC (**6**) optimiert.<sup>[124]</sup> Dabei wurde sowohl die Reihenfolge der gelagerten Chemikalien als auch die verwendeten Mengen variiert. Die Verdopplung der Menge der eingesetzten Chemikalien auf einer Donor-Oberfläche führte nicht zu besseren Ausbeuten. Möglicherweise ist aufgrund der Reduzierung der Polymermatrix die Diffusion herabgesetzt. Die Lagen-Variation der transferierten Reagenzien und die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und 5 zusammengestellt.<sup>[124]</sup> Bei der Verwendung von PyBOP (**15**) konnten die höchsten Ausbeuten erzielt werden, wenn eine geringere Anzahl an Lagen und somit eine kurze Diffusionsstrecke vorhanden ist. Jedoch sollte eine Donor-Oberfläche stets frisch vorbereitet werden und auf eine Lagerung verzichtet werden. Die Kupplung der Aminosäure (4. Lage) konnte sogar durch eine Diffusion durch drei Lagen erreicht werden. Zusammenfassend konnten jedoch mit allen Lagenkombinationen gute Ergebnisse erzielt werden.

**Tabelle 4:** Kupplung von Fmoc-Gly-OH (**164**) mit PyBOP (**15**).

Lage 1	Lage 2	Lage 3	Lage 4
Fmoc-Gly-OH	PyBOP, DIPEA, HOBt	-	-
PyBOP, DIPEA, HOBt	Fmoc-Gly-OH	-	-
Fmoc-Gly-OH	DIPEA	HOBt	PyBOP
Fmoc-Gly-OH	PyBOP	DIPEA	HOBt
PyBOP	DIPEA	HOBt	Fmoc-Gly-OH
PyBOP	Fmoc-Gly-OH	DIPEA	HOBt

Ausbeute

Bei der Verwendung von DIC (**6**) konnten die besten Ausbeuten erhalten werden, wenn zuerst die Aminosäure und dann nacheinander DIC (**6**) und HOBt (**8**) gelasert wurden. Deutlich schlechtere Ausbeuten wurden bei der Verwendung von DIC (**6**) in der ersten Lage detektiert. Möglicherweise wird dieses durch den direkten Kontakt mit der stark wasserhaltigen Polymeroberfläche sofort zum Harnstoffderivat zersetzt.

**Tabelle 5:** Kupplung von Fmoc-Gly-OH (**164**) mit DIC (**6**).

Lage 1	Lage 2	Lage 3	Lage 4
Fmoc-Gly-OH	DIC	HOBt	-
Fmoc-Gly-OH	HOBt	DIC	-
Fmoc-Gly-OH	HOBt, DIC	-	-
DIC, HOBt	Fmoc-Gly-OH	-	-

Ausbeute

Zusammenfassend ermöglicht die Aktivierung der Aminosäure mit PyBOP (**15**) hohe und zuverlässige Kupplungsausbeuten und sollte dem wasserempfindlichen DIC (**6**) vorgezogen werden. Eine Aussage über die ideale Bestrahlungsdauer kann nicht getroffen werden, da die Spotgröße von vielen Parametern beeinflusst wird. Jedoch können bei der Verwendung von DIC (**6**) und PyBOP (**15**) größere Bestrahlungsdauern verwendet werden, da deutlich kleinere Spots bei gleicher Bestrahlungsdauer im Vergleich zu Fmoc-Gly-OPfp (**102**) generiert werden. Es empfiehlt sich aber mit einer Laserleistung von 100% bei der Verwendung von DIC (**6**) und PyBOP (**15**) eine Bestrahlungsdauer von kleiner als 5.50 ms zu nutzen, um bei einem *Pitch* von 250  $\mu\text{m}$  getrennte Spots zu erhalten. Unter diesen

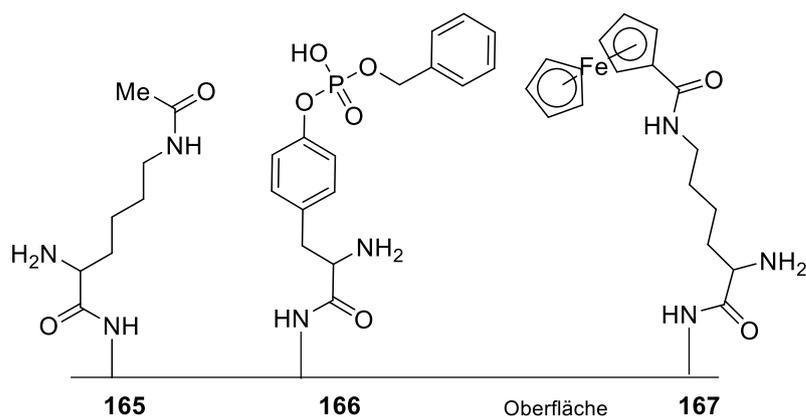
Bedingungen konnten in allen Experimenten getrennte Spots generiert werden. Bei der Nutzung von Fmoc-Gly-OPfp (**102**) kam es bei dieser Bestrahlungsdauer des Öfteren zu ineinanderlaufenden Spots. Für die Generierung eines Peptidarrays mit 250  $\mu\text{m}$ , bei dem getrennte Spots benötigt werden, sollte deshalb im Falle des Fmoc-Gly-OPfp (**102**) die Laserleistung reduziert werden. Hierfür sind allerdings geringere Ausbeuten zu erwarten. Die unterschiedlichen Intensitäten in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer und der Laserleistung wurden von Tobias Foertsch untersucht.<sup>[123]</sup>

In einem weiteren Experiment sollten nun weitere nicht aktivierte Aminosäuren wie beispielsweise posttranslational veränderte Aminosäuren in einen Array eingebaut werden, da die Verwendung von PyBOP (**15**) und DIC (**6**) bis dato nur mit dem sterisch wenig anspruchsvollen Glycin durchgeführt wurde.

In Zusammenarbeit mit Juliane Greifenstein konnte dabei gezeigt werden, dass die posttranslational veränderten Aminosäuren Fmoc-Lys(Ac)-OH und Fmoc-Tyr(PO(OBZL)-OH)-OH mit Hilfe von DIC (**6**) und HOBt (**8**) in guten Ausbeuten an die freien Amine einer  $\beta\text{Ala-10:90-PEGMA-co-MMA}$ -Oberfläche gekuppelt werden konnten (Abbildung 57).<sup>[124]</sup> Des Weiteren konnten die Aminosäuren Fmoc-Ala-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH und Fmoc-Pro-OH unter der Verwendung von DIC (**6**) und HOBt (**8**) und außerdem die modifizierte Aminosäure Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**) unter der Verwendung von PyBOP (**15**), DIPEA und HOBt (**8**) in einen Array eingebaut werden. Zudem konnte die modifizierte Aminosäure Fmoc-Lys(Ferrocen)-OPfp, die jedoch schon aktiviert ist, erfolgreich in einen Array eingebaut werden.

Es konnte festgestellt werden, dass die Kupplung von TAMRA-NHS an die freien Amine der eingebauten Aminosäuren mit extrem unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten erfolgte. Teilweise wurden keine Fluoreszenzsignale erhalten. Durch den Einbau eines Spacers (Abstandshalter) wie z.B. Fmoc-Aminohexansäure konnten deutlich stärkere Signale erhalten werden. Es kommt zum Einen wahrscheinlich zu sterischen Problemen, da z.B. Trityl-Schutzgruppen sehr groß sind und zum anderen können aromatische Schutzgruppen die Fluoreszenz der Fluorophore beeinflussen. Beispielsweise ist die Aminosäure Tryptophan als Quencher bekannt.<sup>[101]</sup> Bei der Verwendung von unterschiedlichen Aminosäuren kann die Fluoreszenzintensität nicht genutzt werden, um eine Aussage über die Kupplungsausbeute zu machen. Es kann lediglich festgestellt

werden, ob die Reaktion funktioniert oder nicht. Um negative oder schwache Signale zu vermeiden, sollte immer ein Spacer vor der Anknüpfung eines Fluorophors eingebaut werden. Zur Analyse der Ausbeute der gekuppelten Aminosäuren via cLIFT-Methode, können lediglich photometrische Untersuchungen durchgeführt werden. Jedoch sind diese Ergebnisse nicht quantitativ und lassen nur eine grobe Abschätzung der Kupplungsausbeute zu (Kap. 3.1.7.).



**Abbildung 57:** Fmoc-Lys(Ac)-oberflächengebunden **165**, Fmoc-Tyr(PO(OBZL)-OH)-oberflächengebunden **166** und Fmoc-Lys(Ferrocen)-oberflächengebunden **167**.

Als Alternative zu TAMRA-NHS kann Biotin an die Oberfläche gebunden werden, das dann anschließend durch ein mit einem Fluorophor gelabelten Streptavidin nachgewiesen werden kann. Aufgrund der Größe des Streptavidins ist hierbei ein Quenching-Effekt eher unwahrscheinlich.

### 3.2.5. Alternative Kupplungsbedingungen

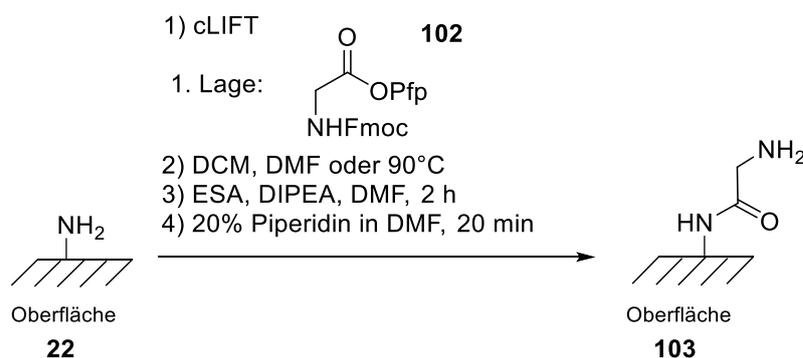
Aufgrund der Verwendung einer Polymermatrix, die als Lösungsmittel fungiert, wurde die Reaktion bis dato im Ofen bei 90 °C durchgeführt. Bei dieser Temperatur wird die Polymermatrix viskos (Glasübergang = ~ 90 °C)<sup>[10]</sup> und ermöglicht so die Diffusion der Materialien zur Synthesoberfläche. Dadurch wird jedoch die Verwendung von Chemikalien, die einen Siedepunkt unterhalb 90 °C besitzen, aufgrund einer möglichen Kontamination, kritisch. Dieses Problem wurde bereits bei EDC festgestellt (Kap. 3.2.4.). Aus diesem Grund sollte die Kupplung nun in einer Lösungsmittel-Atmosphäre durchgeführt werden. Dichlormethan bietet sich als Lösungsmittel an, da sich die

Polymermatrix sehr gut in Dichlormethan löst. Eine weitere Möglichkeit wäre Dimethylformamid, das jedoch aufgrund seines niedrigen Dampfdrucks wahrscheinlich ungeeignet ist. Aufgrund der Lösungsmittel-Atmosphäre kann es jedoch zu einer starken lateralen Diffusion der Materialien auf der Oberfläche kommen. Die Matrix ist nicht nur noch viskos, sondern kann auch durch das Lösungsmittel, das sich in der Atmosphäre befindet, gelöst werden.

### 3.2.5.1. Kupplung von Aminosäure-Aktivestern in einer Lösungsmittel-Atmosphäre

Zu Beginn wurde ein Experiment auf drei Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen durchgeführt. Fmoc-Gly-OPfp (**102**) wurde auf die Akzeptor-Oberfläche mittels eines Lasers transferiert.

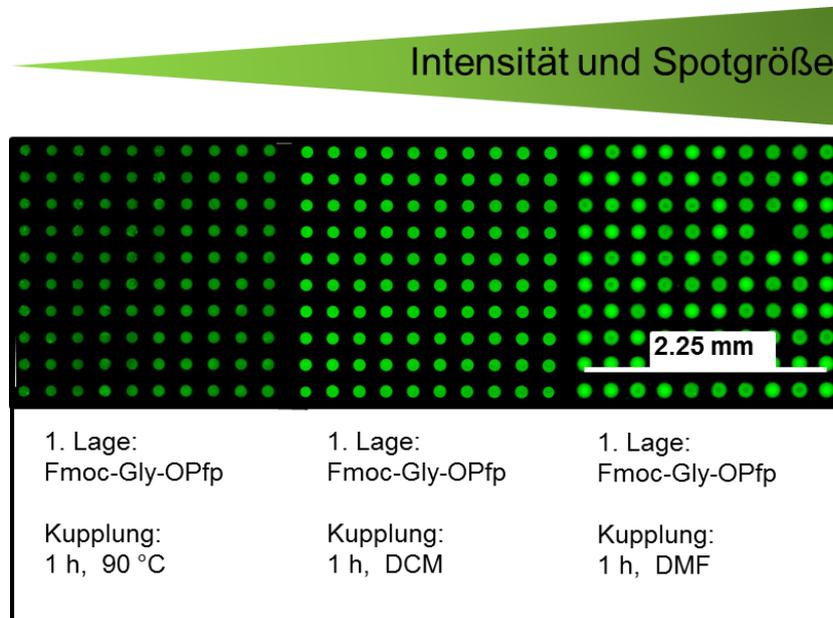
Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurden Oberflächen derselben Charge verwendet und alle Syntheseschritte, außer der Kupplung, zeitgleich durchgeführt. Anschließend wurde eine Kupplung in einer DCM-Atmosphäre bzw. einer DMF-Atmosphäre innerhalb von 1 h bei 90 °C durchgeführt. Die Oberflächen wurden hierbei lediglich unter eine Glaskammer, in die 30 min zuvor ein Gefäß mit DMF bzw. DCM gestellt wurde, gelegt. Nach einer Acetylierung und einer anschließenden Fmoc-Entschützung wurde dann TAMRA-NHS in PBS-T an die freien Amine gekuppelt, um die Spotverbreiterung, die durch Diffusion auftreten kann, zu detektieren (Schema 36).



**Schema 36:** Kupplung vom Fmoc-Gly-OPfp (**102**) in einer Lösungsmittel-Atmosphäre.

Die Kupplung mit DCM und DMF führte zu starken Fluoreszenzsignalen (Abbildung 58). Es konnte nur eine geringe Diffusion beobachtet (Spotgröße bei DMF: < 140  $\mu\text{m}$ ; Spotgröße bei DCM: < 130  $\mu\text{m}$  und Spotgröße bei 90° C: < 125  $\mu\text{m}$ ). Das Experiment

zeigte, dass die Lösungsmittel DCM und DMF eine Spotverbreiterung verursachen. Auf Grund der Qualitätsunterschiede einer Oberflächencharge und der möglichen Schwankung der Laserleistung, können daraus keine präziseren Schlüsse über die Spotverbreiterung gezogen werden.

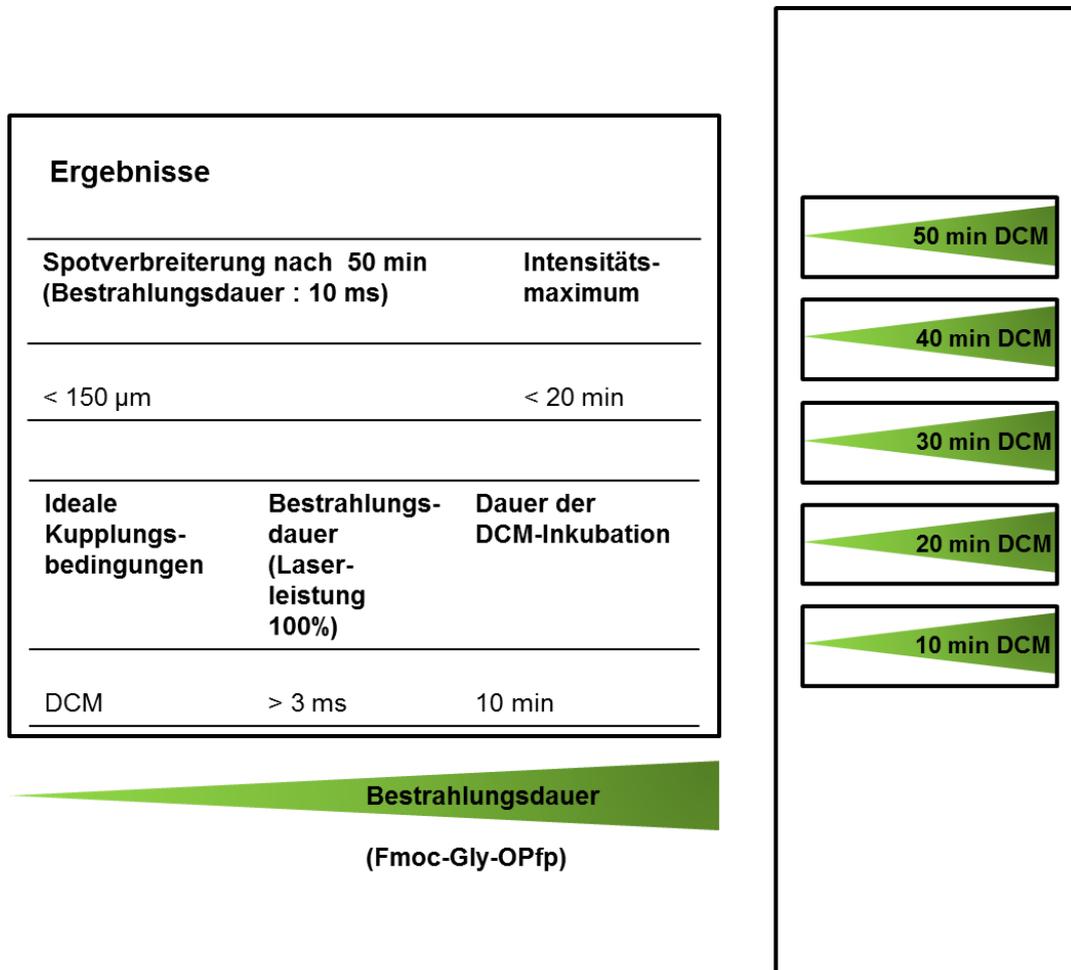


**Abbildung 58:** Fluoreszenzscans nach einer TAMRA-NHS Inkubation der mit der cLIFT-Methode generierten Peptidarrays und anschließender Kupplung im Ofen oder in einer Lösungsmittel-Atmosphäre. Die Bilder wurden in Helligkeit und Kontrast optimiert.

Zudem konnten durch die Kupplung mit DCM oder DMF höhere Fluoreszenzintensitäten erhalten werden. Auf Grund der gelösten Polymermatrix können die Chemikalien wahrscheinlich besser an die Akzeptor-Oberfläche diffundieren, sodass höhere Kupplungsausbeuten erreicht werden können. Die Verwendung von DCM ermöglichte sehr homogene Spots, jedoch wurden durch DMF weniger homogene Spots generiert. Das ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass die Polymermatrix eine bessere Löslichkeit in DCM besitzt. Aufgrund der inhomogenen Spots durch Verwendung von DMF wurden die weiteren Experimente nur mit DCM durchgeführt.

In einer weiteren Versuchsreihe sollte nun die Diffusion in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer von DCM analysiert werden (Abbildung 59). Dazu wurde ein Laser-Layout mit fünf Streifen gewählt, die per Computerbefehl getrennt beschossen werden können (Laser-Layout: 4). Zudem wurde die Bestrahlungsdauer variiert, um

unterschiedlich große Spots bei gleichem *Pitch* zu generieren und so bessere Aussagen über die Diffusion treffen zu können.



**Abbildung 59:** Laser-Layout 4 (*Pitch*: 250  $\mu\text{m}$ , steigende Bestrahlungsdauer) und die zugehörigen Ergebnisse nach der Kupplung mit DCM.

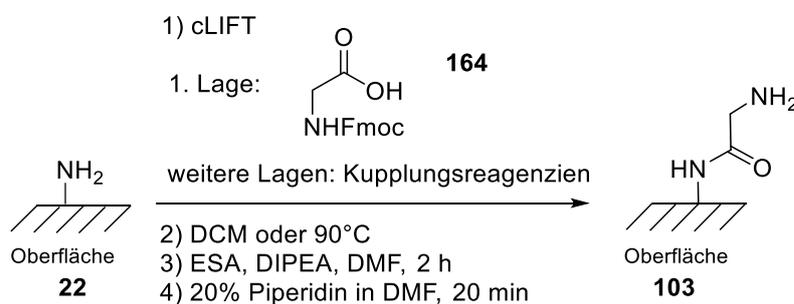
Der Versuch wurde analog zum Versuch in Schema 36 durchgeführt, jedoch wurde die Oberfläche nach dem ersten gelaserten Block von Fmoc-Gly-OPfp (**102**) nur für 10 min mit Dichlormethan inkubiert.

Bei diesem Experiment war jedoch eine eindeutige Diffusion mit steigender Kupplungsdauer zu detektieren. Die maximale Fluoreszenzintensität, die mit der Synthese-Ausbeute korreliert, konnte innerhalb von 20 min bei einer Bestrahlungsdauer von > 3.00 ms erreicht werden. Die Diffusion war hierbei kleiner als der *Pitch*, sodass getrennte Spots generiert werden konnten. Aufgrund der guten Ausbeuten ist es ausreichend die Aminosäure innerhalb von 10 min zu kuppeln. Hierbei ist eine geringe Diffusion zu erwarten (< 30.0  $\mu\text{m}$ ). Eine Bestrahlungsdauer von kleiner als 3.00 ms bei einem *Pitch* von

250  $\mu\text{m}$  ist für eine gute Ausbeute nicht zu empfehlen. Jedoch muss hierbei beachtet werden, dass es je nach vorhandenen Parametern (beispielsweise: Luftfeuchtigkeit, schwankende Laserleistung etc.) zu nicht separaten Spots kommen kann. Bei der Synthese von Peptidarrays in einer Lösungsmittel-Atmosphäre muss diese Diffusion mit einkalkuliert werden, sodass bei gleichbleibender Bestrahlungsdauer eine geringere Laserleistung als bei der Kupplung im Ofen eingesetzt werden muss, um einen Peptidarray mit einem *Pitch* von 250  $\mu\text{m}$  mit getrennten Peptidspots zu ermöglichen. Jedoch wird durch die Kupplung in einer DCM-Atmosphäre die Reaktionszeit deutlich verkürzt, sodass diese Kupplungsmethode vorzuziehen ist.

### 3.2.5.2. Kupplung von Aminosäuren mit Atmosphäre

Auf Grund der erfolgreichen Kupplung von aktivierten Aminosäuren in einer Dampf-Atmosphäre, sollte nun die Kupplung von Aminosäuren, die mit DIC (**6**) oder PyBOP (**15**) während des Kupplungsschritts aktiviert wurden, unter denselben Bedingungen ermöglicht werden (Schema 37).



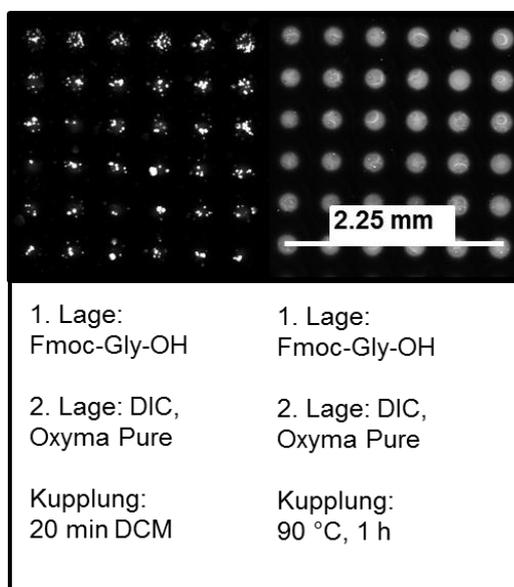
**Schema 37:** Kupplung vom Fmoc-Gly-OH (**164**) durch die Verwendung von Kupplungsreagenzien in einer Lösungsmittel-Atmosphäre.

Für die Versuche wurde Layout 4 genutzt, bei dem die Bestrahlungsdauer variiert (0.10 ms bis 10 ms) (vgl. Abbildung 57).

Die Kupplung von Fmoc-Gly-OH (**164**) wurde mit Laser-transferiertem PyBOP (**15**), HOBt (**8**) und DIPEA oder mit Laser-transferiertem DIC (**6**), HOBt (**8**) für 20 min in einer DCM-Atmosphäre und zum Vergleich zudem im Ofen durchgeführt. Die Versuche wurden zudem mit Oxyma Pure anstelle des HOBt (**8**) durchgeführt. Die Substanzen wurden in der genannten Reihenfolge getrennt voneinander transferiert. Oxyma Pure und DIC (**6**) wurden jedoch gemeinsam transferiert. Zusätzlich wurde jeweils Fmoc-Gly-OPfp (**102**) zur

Überprüfung der erfolgreichen Kupplung an die Oberfläche Laser-transferiert und anschließend gekuppelt.

Die Kupplung von Fmoc-Gly-OH (**164**) wurde mit Laser-transferiertem PyBOP (**15**), HOBt (**8**) und DIPEA oder mit Laser-transferiertem DIC (**6**), HOBt (**8**) für 20 min in einer DCM-Atmosphäre und zum Vergleich zudem bei 90 °C durchgeführt (Abbildung 60). Die Versuche wurden zudem mit Oxyma Pure anstelle des HOBt (**8**) durchgeführt. Die Substanzen wurden in der genannten Reihenfolge getrennt voneinander transferiert. Oxyma Pure und DIC (**6**) wurden jedoch gemeinsam transferiert. Zusätzlich wurde jeweils Fmoc-Gly-OPfp (**102**) zur Überprüfung der erfolgreichen Kupplung an die Oberfläche Laser-transferiert und anschließend gekuppelt.



**Abbildung 60:** Fluoreszenzscans nach einer TAMRA-NHS Inkubation der mit der cLIFT-Methode generierten Peptidarrays und anschließender Kupplung im Ofen oder in einer DCM-Atmosphäre. Die Bilder wurden in Helligkeit und Kontrast optimiert.

Die Kupplung des Fmoc-Gly-OH (**164**) ist nur bei der Verwendung von DIC (**6**) und Oxyma Pure in einem Donor gelungen. In Abbildung 59 ist das Graustufenbild des Fluoreszenzscans nach einer TAMRA-NHS Inkubation abgebildet, um die Beschaffenheit der Spots besser abzubilden.

Mithilfe dieser Methode konnten keine homogenen Spots generiert werden. Es scheint nicht möglich zu sein innerhalb von 20 min eine Durchmischung der einzelnen transferierten Materialsichten in einer DCM-Atmosphäre zu gewährleisten. Die Kombination Fmoc-Gly-OH (**64**) und DIC (**6**) zusammen mit Oxyma Pure wurde

vermutlich durch die kürzere Diffusionsstrecke im Vergleich zu PyBOP (**15**), DIPEA und HOBt (**8**) ermöglicht. Eine längere Inkubationszeit ist notwendig, die jedoch aufgrund von einer starken lateralen Diffusion nicht anwendbar ist, da sonst keine separaten Spots zugänglich wären. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Kupplungen, die den Transfer mehrerer Lagen benötigen, durchgeführt.

### 3.2.6. Modifikation von Peptidarrays mit der cLIFT-Methode

Nachdem die Optimierung der Kupplung und der *in situ* Aktivierung der Aminosäuren durchgeführt wurde, sollten nun ausprobiert werden, ob es möglich ist, mit der cLIFT-Methode auch andere Moleküle als Aminosäuren zu transferieren und diese dann erfolgreich in einen Peptidarray einzubauen, um z. B. die Seitenketten eines Peptides zu modifizieren. Von großem Interesse war hierbei der Einbau von Fluorophoren in einen Peptidarray, da sich zahlreiche Fluorophore unspezifisch in den Polymerfilm einlagern und somit einen starken Fluoreszenzhintergrund verursachen, der eine Auswertung erschwert (Kap. 3.1.4.). Zusätzlich sollten auch weitere Reaktionstypen auf ihre Kompatibilität mit der cLIFT-Methode überprüft werden.

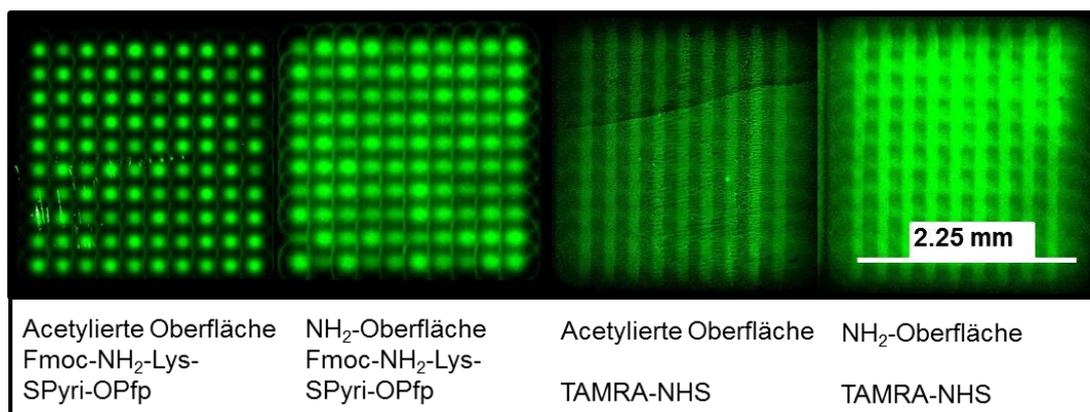
#### 3.2.6.1. Kupplung von Fluorophoren mit der cLIFT-Methode

Für den Laser-Transfer und die Kupplung eines Fluorophors wurde zuerst eine OPfp-aktivierte Aminosäure, die mit einem Fluorophor funktionalisiert wurde (Fmoc-NH-Lys-(4-(4-(Dimethylamino)styryl)-2,6-diisopropylpyridinium(SPyri))-OPfp), verwendet, da sicher ist, dass im Ofen eine Bildung einer Amidbindung möglich ist. Für das Experiment wurde die modifizierte Aminosäure mit einem variablen Laserpuls bei gleichbleibender Laserleistung auf eine entschützte NH<sub>2</sub>-βAla-10:90 PEGMA-co-MMA Oberfläche transferiert und anschließend gekuppelt. Zusätzlich wurde eine Ac-NH-βAla-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche verwendet, um eine unspezifische Einlagerung des Fluorophores zu detektieren, da so eine Kupplung nicht stattfinden kann. Für die Entfernung des nicht gekuppelten Moleküls wurde ein längeres Waschprotokoll entwickelt, um ungebundene Moleküle zu entfernen (Kap. 5.).

Der anschließend durchgeführte Fluoreszenzscan zeigte eine erfolgreiche Kupplung, jedoch lagerte sich der Fluorophor stark in die acetylierte Oberfläche ein. Das erhaltene

Fluoreszenzsignal war hierbei deutlich geschwächt. Fmoc-Aminosäure-Ester können im Vergleich nicht auf den acetylierten Oberflächen nachgewiesen werden, wenn anschließend der *N*-Terminus mit einem Fluorophor inkubiert wird. Möglicherweise wurde der Fluorophor durch den Transfer in die tieferen Schichten der Polymeroberfläche befördert, sodass es sich nicht mehr entfernen lässt. Außerhalb der Spots ist jedoch kein fluoreszierender Hintergrund zu detektieren. Das zeigt, dass der nicht gebundene Fluorophor sich mit dem Waschschritt gut entfernen lässt. Aus diesem Grund wurde von einer positiven Kupplung ausgegangen.

Zudem wurde TAMRA-NHS Laser-transferiert und im Ofen gekuppelt. Auch hier wurde eine geringere Fluoreszenzintensität der acylierten Oberfläche festgestellt (Abbildung 61). Die gebildete Spotform (Ring) anstelle der bisher beobachteten gefüllten Kreise wurde bei der Verwendung der Aminosäuren bereits festgestellt. Die Spotform ist hierbei von vielen Faktoren abhängig und wurde wahrscheinlich nicht TAMRA-NHS verursacht.<sup>[123]</sup>



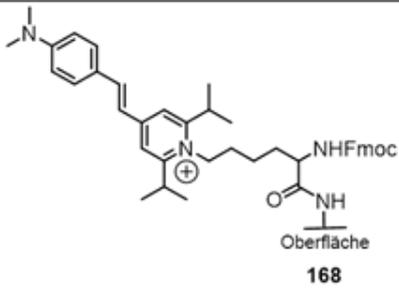
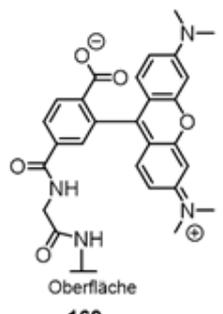
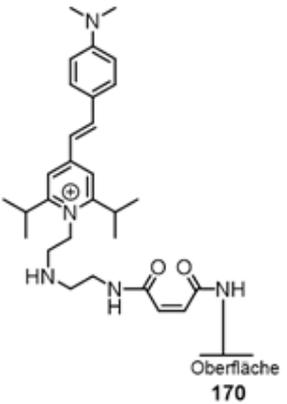
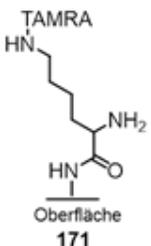
**Abbildung 61:** Fluoreszenzscans nach einem Transfer von Fmoc-NH<sub>2</sub>-Lys-Spyri-OPfp und TAMRA-NHS und anschließender Kupplung bei 90 °C. Die Bilder wurden in Helligkeit und Kontrast optimiert.

Um diese positive Kupplung zu beweisen, wurde der Versuch mit dem Fmoc-Lys-Spyri-OPfp-Baustein auf einer Gly-Rink- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche wiederholt. Jedoch wurde zusätzlich Fmoc-Aminohexansäure als Spacer verwendet. Das Rohprodukt wurde vom säurelabilen Rink-Linker (**87**) abgespalten und konnte *via* MALDI verifiziert werden.

Aufgrund der positiven Anknüpfung wurden weitere Fluorophore mit cLIFT transferiert und gekuppelt. Die verwendeten Fluorophore und die zugehörigen Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Voraussetzung für einen homogenen Lasertransfer und

eine Kupplung ist die Erzeugung einer homogenen Donor-Oberfläche, sodass sich die verwendeten Fluorophore in DCM oder Aceton in Kombination mit der benötigten Polymermatrix so gut wie möglich lösen. Dadurch ist auch gewährleistet, dass die Chemikalien im Ofen durch das Matrixmaterial diffundieren können.

**Tabelle 6:** Gekoppelte Fluorophore via cLIFT-Methode.

Fluorophor	Produkt	Kupplungsbedingung
Fmoc-NH <sub>2</sub> -Lys-(SPyri)-OPfp	 <p style="text-align: center;"><b>168</b></p>	90 °C, 1.5 h
TAMRA-NHS	 <p style="text-align: center;"><b>169</b></p>	90 °C, 1.5 h
Spyri(ethylamin)-ethylisomaleimid	 <p style="text-align: center;"><b>170</b></p>	90 °C, 1.5 h
1. Lage: Fmoc-Lys(TAMRA)-OH 2. Lage: DIC (6) 3. Lage: HOBT	 <p style="text-align: center;"><b>171</b></p>	90 °C, 1.5 h

Um einen weiteren Reaktionstyp mit der cLIFT-Methode zu testen, wurde ein Fluorophor, das mit einem Isomaleimid funktionalisiert wurde (Spyri(ethyl-amin)ethyl-isomaleimid), transferiert. Der Fluorophor lagerte sich unspezifisch in eine acetylierte Oberfläche ein und konnte mit einer schwächeren Fluoreszenz detektiert werden.

Des Weiteren wurde der Einbau eines Fluorophors (Fmoc-Lys(TAMRA)-OH), das an ein Lysin gekuppelt wurde, getestet. Aufgrund der notwendigen Aktivierung kann die unspezifische Einlagerung direkt auf einer Oberfläche mit freien Aminen getestet werden. Die Anknüpfung von Fmoc-Lys(TAMRA)-OH und der Aktivierung mit DIC (6) und HOBt (8), die beide Laser-transferiert wurden, war ebenfalls erfolgreich. Es wurde jedoch erneut eine deutlich schwächere Fluoreszenzintensität ohne die Verwendung von Kupplungsreagenzien detektiert.

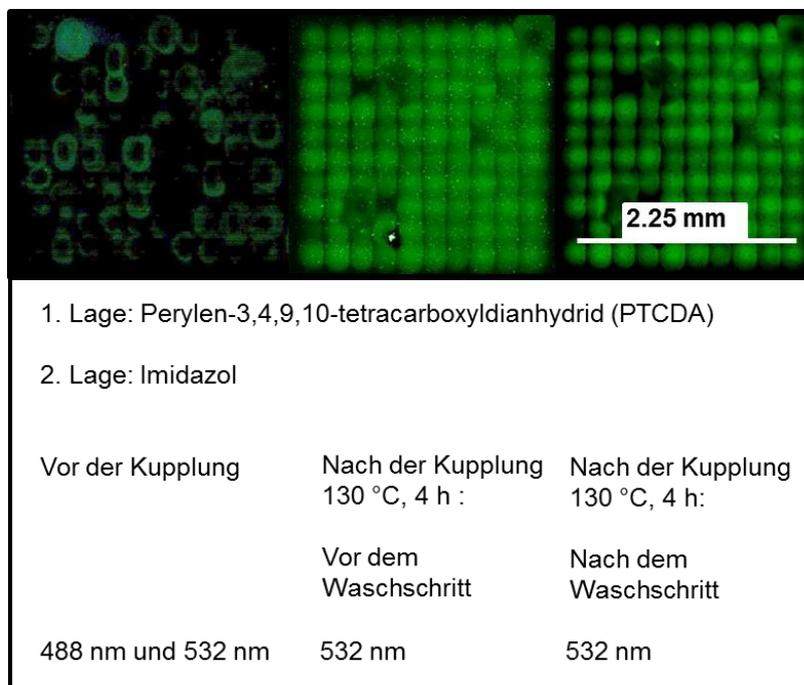
Schließlich eignet sich die Methode nur bedingt, um gezielt Peptidspots mit einem Fluorophor zu modifizieren. Durch den Lasertransfer werden anscheinend zu große Mengen des Fluorophors transferiert, sodass sie sich nicht mehr entfernen lassen und es zu starken Fluoreszenzsignalen kommt. Zu beachten ist jedoch, dass jeder Fluorophor unterschiedlich mit dem Polymerfilm und dem gekuppelten Peptid interagiert, sodass sich unterschiedliche Mengen der Fluorophore in den Film einlagern. Die Fluoreszenzunterscheide von acetylierten Spots und Spots mit freien Aminen, die jeweils mit einem Fluorophor beschossen wurden, sind zu gering, um eine Folgerung daraus zu ziehen. Bei der Anbindung eines Fluorophors in Lösung kann dagegen mit starken Verdünnungen gearbeitet werden, sodass acetylierte Spots sehr gut von Spots mit freien Aminen unterschieden werden können. Eine Aussage über den Erfolg einer Reaktion kann hierbei nicht getroffen werden, da das Signal nur durch eine unspezifische Einlagerung des Fluorophors zustande gekommen ist. Wenn ein Fluorophor mit der cLIFT-Methode an einer bestimmten Stelle eingebaut wird, kann ohne einen massenspektrometrischen Beweis nicht verifiziert werden, ob eine Anknüpfung erfolgreich stattgefunden hat oder nicht. Jedoch ist im Vergleich zu einer Kupplung in Lösung der große Vorteil, dass ein starkes Hintergrundsignal außerhalb der Spots verhindert wird. Umliegende Spots werden dadurch nicht kontaminiert.

### 3.2.6.2. **Synthese von Fluorophoren mit der cLIFT-Methode**

Wie bereits in Kapitel 3.2.5. gezeigt können synthetisierte Fluorophore *via* c-LIFT-Methode transferiert und in einem zweiten Hitze-induzierten Schritt gekuppelt werden. Jedoch wurde beobachtet, dass sich diese Fluorophore unspezifisch in die Polymeroberfläche einlagern und nicht mehr entfernt werden können. Die Verwendung von Fluorophoren, zum Beispiel zur Detektion von erfolgreichen chemischen Synthesen in gezielten Spots in einem Array, ist aus diesem Grund nicht möglich. Deshalb sollten diese Fluorophore erst nach Laser-Transfer und Kupplung an der Oberfläche synthetisiert werden. Voraussetzung ist, dass die Edukte im gewünschten Anregungsbereich keine Fluoreszenz zeigen und sich die Edukte möglichst vollständig von der Oberfläche entfernen lassen. Dazu wurden Cumarin<sup>[128]</sup>- und Perylen<sup>[129]</sup>-basierte Fluorophore gewählt.



spielte. Mit Hilfe von einem Fluoreszenzscanner wurde vor der Kupplung und nach der Kupplung bei 130 °C und nach einem Waschschrift die Fluoreszenz detektiert (Abbildung 62).



**Abbildung 62:** Fluoreszenzscans nach dem Lasertransfer des Perylen-3,4,9,10-tetracarboxyldianhydrid und des Imidazol und abschließender Kupplung im Ofen. Die Bilder wurden in Helligkeit und Kontrast optimiert.

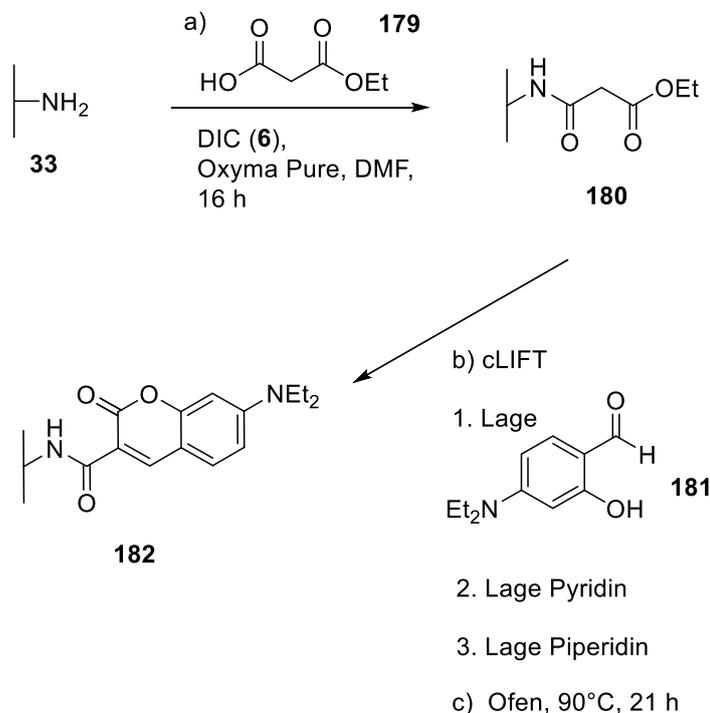
Das Edukt zeigte bei 532 nm keine Fluoreszenz. Die detektierte inhomogene Fluoreszenz bei 532 nm ist auf das Polymermatrixmaterial zurückzuführen, das eine geringe Fluoreszenz aufweist. In einem weiteren Syntheseschritt wurde das mono-Boc-diaminobutan (**174**) mittels cLIFT transferiert und an den synthetisierten Fluorophor gekuppelt. Anschließend wurde durch eine Abspaltung vom immobilisierten Rink-Amid-Linker (**87**) mit 91% TFA in DCM ein dunkelblaues Rohprodukt erhalten. Das Produkt **175** (siehe Schema 38) konnte massenspektrometrisch verifiziert werden. Zusätzlich wurde getestet, ob sich das Perylen-3,4,9,10-tetracarboxyldianhydrid (**172**) unspezifisch in die Oberfläche einlagerte. Dazu wurde Anhydrid **172** auf eine acetylierte Oberfläche **177** transferiert und anschließend mit einem Amin (Propargylamin (**114**)) versetzt. Die Theorie besagt, dass im Falle von unspezifisch eingelagertem Edukt **172** das Amin **178** reagiert und dann ein Fluoreszenzsignal detektierbar ist. Die Oberfläche zeigte jedoch keine Fluoreszenz, sodass davon auszugehen ist, dass das Anhydrid **172** vollständig entfernt werden konnte.

Zusammenfassend können mit dieser zuverlässigen Methode gezielt Spots eines Peptidarrays detektiert werden, solange ein freies Amin vorhanden ist. Dadurch ergeben sich folgende Vorteile: 1) Die restlichen Spots werden nicht angefärbt, also kann das Experiment als eine Art Kontrollexperiment genutzt werden, um die erfolgreiche Synthese eines Kupplungszyklus zu überprüfen; 2) Die Methode verhindert eine starke Hintergrundfluoreszenz, die bei der Kupplung aus der Lösung auftritt.

Jedoch ist es zu empfehlen, dass das Edukt **172** so modifiziert wird, dass eine vollständige Löslichkeit in DCM oder Aceton und dem Matrixmaterial gewährleistet ist. So wird eine homogene Donor-Oberfläche zugänglich. Als eine Alternative könnte ein anderes Matrixmaterial eingesetzt werden, in dem sich das Edukt löst.

### 3.2.4.2.2. Cumarin-basierte Fluorophore

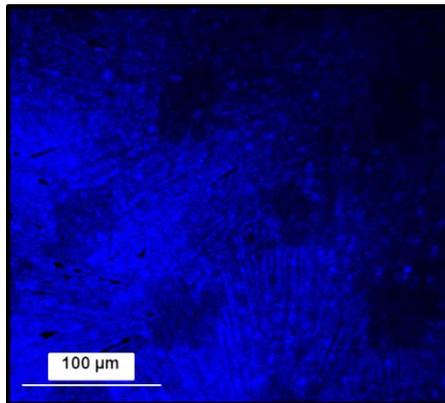
Für die Synthese eines Cumarin-basierten Fluorophors wurde die Knoevenagel-Kondensation mit einem anschließendem Ringschluss zum Cumarin **182** genutzt.<sup>[127]</sup>



**Schema 39:** Synthese des Cumarin-basierten Fluorophors **182**.

Es wurde eine  $\text{NH}_2$ - $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche mit mono-Ethyl-malonat (**179**), DIC (**6**) und Oxyma Pure in DMF zum Produkt **180** umgesetzt.

Anschließend wurde der Aldehyd 4-Diethylaminosalicylaldehyd (**181**) Laser-transferiert. Zudem wurde als zweite Schicht die Base Pyridin und als dritte Schicht die Base Piperidin transferiert. Als Layout wurde Laser-Layout 1 (*Pitch* 100  $\mu\text{m}$ , Bestrahlungsdauer 5.00 ms) verwendet, um eine flächige Beschichtung der Oberfläche zu ermöglichen. Anschließend wurde bei 90 °C über Nacht gekuppelt, um eine ausreichende Kupplungszeit für den zweistufigen Prozess zu gewährleisten. Das Produkt wurde mittels seiner Fluoreszenz verifiziert (Abbildung 63). Als Referenz diente eine Ethyl-malonat- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche, die keine Fluoreszenz aufwies.



**Abbildung 63:** Fluoreszenzbild des Cumarin-basierten Fluorophores **18**, das an einem konfokalen Mikroskop aufgenommen wurde (Anregungswellenlänge: 405 nm, Detektion: 420 nm – 480 nm.) und Strukturausschnitt des Arrays. Das Bild wurde in Helligkeit und Kontrast optimiert.

Damit bietet die Synthese eines Cumarin-basierten Fluorophors eine weitere Möglichkeit zum gezielten Einbau eines Fluorophors in einen Peptidarray. Die Synthese ist jedoch im Vergleich zum Aufbau von Perylen-basierten Fluorophoren wesentlich zeitaufwendiger.

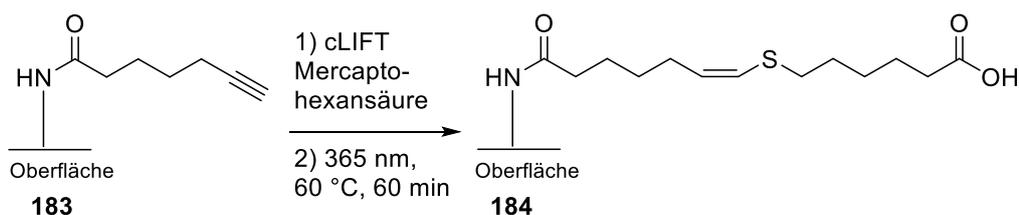
### 3.2.7. Click-Chemie mit der cLIFT-Methode

In den folgenden Experimenten sollten nun weitere Reaktionen getestet werden, um einen Peptidarray gezielt zu modifizieren. Dazu eignet sich besonders gut die Thiol-in- oder Thiol-en-Click-Chemie, da durch die Seitenketten von Cysteinen Thiole zur Verfügung stehen (Kap. 1.11.). Der erste Vorteil hierbei ist, dass eine Modifizierung sogar nach einer Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen eines Peptidarrays vorgenommen werden kann, da die Alkene und Alkine nicht zu den 20 proteinogenen Aminosäuren zählen. Der zweite Vorteil ist, dass keine weiteren Kupplungsreagenzien nötig sind. Die Aktivierung der

radikalischen Reaktion kann durch UV-Bestrahlung erfolgen. Eine weitere mögliche Reaktion ist die SPAAC-Reaktion (Kap.1.11.). Der Vorteil der Reaktion zwischen einem Azid und einem Cyclooctin ist, dass keine weiteren Kupplungsreagenzien benötigt werden. Die Reaktion kann zudem nach Entfernung der Schutzgruppen der Seitenketten des Peptides durchgeführt werden. Ein Azid kann beispielsweise über das kommerziell käufliche Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**) in eine Aminosäuresequenz eingebracht werden.

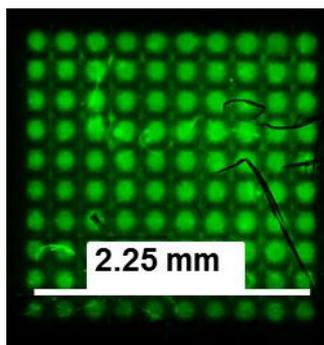
### 3.2.7.1. Thiol-in Chemie

Für die Durchführung der Thiol-in-Click-Chemie<sup>[97]</sup> wurde eine entschlützte NH<sub>2</sub>-βAla-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche mit Heptinsäure unter Verwendung von DIC (**6**) und HOBt (**8**) in DMF funktionalisiert. Anschließend wurde Mercaptohexansäure Laser-transferiert. Als Matrix wurde jedoch ein Matrixmaterial (F1518), das erfolgreich von Juliane Greifenstein<sup>[124]</sup> bei der cLIFT-Methode eingesetzt wurde, verwendet, da die Matrix einen niedrigen Glasübergang von ca. 50 °C besitzt. Die Kupplung wurde dann bei 60 °C in einer Kammer, die mit Argon gefüllt wurde und mit UV-Licht (365 nm) bestrahlt wurde, auf einer Heizplatte innerhalb von 60 min durchgeführt. Zur Detektion der erfolgreichen Kupplung wurde anschließend ein Fluorophor-NH<sub>2</sub> mit DIC (**6**) und HOBt (**8**) in DMF an die freie Carboxyl-Gruppe gekuppelt. Das Produkt konnte erfolgreich nach einer Fluoreszenzmarkierung verifiziert werden (Abbildung 64).



**Schema 40:** Thiol-in Chemie unter Ausbildung des Produktes **184**.

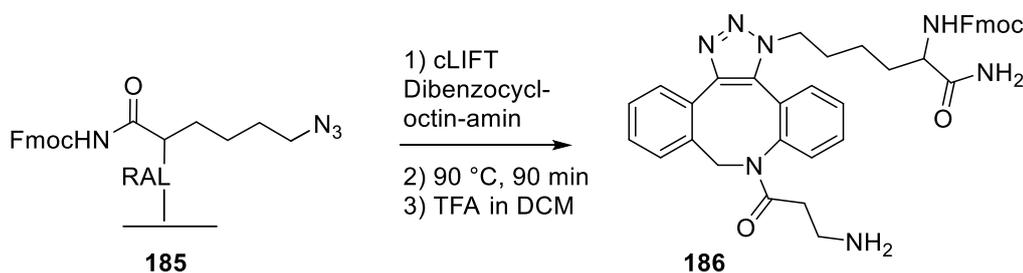
Zur Überprüfung der erfolgreichen Reaktion wurde ein Teststreifen, der auch mit Mercaptohexansäure beschossen wurde, jedoch nicht dem UV-Licht ausgesetzt wurde, genutzt.



**Abbildung 64:** Fluoreszenzbild (532 nm) des Produktes **184** nach einer Fluorophor-NH<sub>2</sub>-Inkubation. Das Bild wurde in Helligkeit und Kontrast optimiert.

### 3.2.7.2. SPAAC-Reaktion

In vorherigen Versuchen wurde festgestellt, dass Oberflächen, die mit Cyclooctinen funktionalisiert wurden, sehr instabil sind. Aus diesem Grund wurde in den im Folgenden beschriebenen Experimenten eine NH<sub>2</sub>-Rink-βAla-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche mit dem Azid Fmoc-Lys-(N<sub>3</sub>)-OH (**110**) unter der Verwendung von PyBOP (**15**), DIPEA, HOBt (**8**) in DMF funktionalisiert. Das Layout 1 wurde verwendet, um eine flächige Beschichtung der Oberfläche zu gewährleisten. Anschließend wurde ein Dibenzocyclooctin-amin Laser-transferiert und im Ofen bei 90 °C an das Azid des immobilisierten Lysins gekuppelt (Schema 41). Das Rohprodukt wurde vom Rink Amid-Linker (**87**) mittels TFA abgespalten und Produkt **186** konnte massenspektrometrisch verifiziert werden.



**Schema 41:** SPAAC unter Bildung des Produktes **186**.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die cLIFT-Methode nicht nur für die Synthese von Peptidarrays geeignet ist. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Moleküle Laser-transferiert werden können. Aufgrund der Durchmischung mehrerer getrennt gelagerten Chemikalien-Lagen, können zahlreiche Reaktionen zugänglich gemacht werden. Der

Einbau von Aminosäuren unter der Verwendung der Kupplungsreagenzien PyBOP (**15**), DIC (**6**) und EDC  $\times$  HCl konnte erfolgreich durchgeführt werden. Zudem konnten weitere Reaktionstypen (Isomaleimid/NH<sub>2</sub>-Reaktion, nucleophile Substitution, Knoevenagel-Reaktion, Thiol-in-Click-Chemie und die SPAAC-Reaktion) erfolgreich durchgeführt werden. Durch den Einbau von Perylen- oder Cumarin-basierten Fluorophoren in einen Peptidarray, ist es nun möglich Kontrollspots in einem Syntheseschritt gezielt zu detektieren, ohne dabei den Array zu zerstören. Als weitere Detektionsmöglichkeit kann die bildgebende MALDI-Spektrometrie durchgeführt werden. Der Lasertransfer der benötigten MALDI-Matrix ermöglichte es einzelne Moleküle in Kontrollspots, die orts aufgelöst von einem Photo-Linker abgespalten werden können, nachzuweisen ohne den Array zu zerstören.

Letztendlich zeigt die cLIFT-Methode Potenzial, um zahlreiche weitere Reaktionstypen zugänglich zu machen, solange die Edukte den Anforderungen entsprechen bzw. standhalten. Folgendes ist für die Synthese eines homogenen Molekül-Arrays zu beachten:

- 1) Die Reagenzien müssen bei den Transferbedingungen stabil sein;
- 2) Wasser- oder sauerstoffempfindliche Stoffe sind nur bedingt geeignet;
- 3) Unlösliche Stoffe sollten vermieden werden, da sie die Polymeroberfläche zerstören können;
- 4) Eine Löslichkeit in der Polymermatrix muss gewährleistet sein (polare Stoffe, die sich nur in Wasser, Methanol oder DMSO lösen können nicht verwendet werden);
- 5) Die verwendeten Moleküle dürfen keinen Siedepunkt unterhalb der Kupplungstemperatur besitzen, da es sonst zu einer Kontamination in der direkten Umgebung kommen kann;
- 6) Stoffe, die einen Schmelzpunkt unterhalb der Raumtemperatur besitzen, sind nur bedingt geeignet.

Besonders die Bestrahlungsdauer und die dazugehörige Laserleistung für die unterschiedlichen Reagenzien benötigen Optimierung, um hochdichte Arrays mit separaten Spots in guten Ausbeuten zu ermöglichen.

Zudem werden neue Matrixmaterialien benötigt, die eine Löslichkeit von polaren Stoffen zulassen oder einen niedrigeren Glasübergang besitzen, um Stoffe mit Siedepunkten unterhalb von 90 °C verwenden zu können.

### **3.3. Synthese von Peptoiden in Arrayformat mit der cLIFT-Methode**

Im vorangehenden Kapitel wurde bereits gezeigt, dass zahlreiche weitere chemische Reaktionen mit der cLIFT-Methode zugänglich sind. Eine Synthese von Molekülen im Arrayformat konnte erreicht werden, indem zahlreiche Chemikalien, die in einer Polymermatrix eingebettet waren, hintereinander auf eine Akzeptor-Oberfläche Laser-transferiert wurden. Die Kupplung an die Akzeptor-Oberfläche fand in einem anschließenden zweiten Hitze-induzierten Schritt, indem eine Durchmischung der benötigten Edukte und Hilfsreagenzien durch eine Diffusion in der viskosen Polymermatrix ermöglicht wurde, statt.

In diesem Kapitel wurden nun Peptoidarrays mit der cLIFT-Methode zugänglich gemacht. Für die Synthese von Peptoiden bot sich entweder die Submonomer-Methode (Kap. 1.6.2:) oder die Monomer-Methode (Kap. 1.6.1) an. Bei der Submonomer-Methode, wird das Peptoid, durch die Wiederholung der Syntheseschritte: (1) Acylierung und (2) Nucleophile Substitution, aufgebaut. Bei der Monomer-Methode erfolgt der Aufbau aus vorsynthetisierten *N*-substituierten-Glycinen. Das Peptoid wird hierbei, durch die Wiederholung der Syntheseschritte: (1) Kupplung des *N*-substituierten-Glycins mit einem Aktivierungsreagenz z.B. DIC (**6**) und (2) Fmoc-Entschützung, aufgebaut.

Zuerst wurde jedoch der Fokus auf die Submonomer-Methode gelegt, da hier keine zusätzliche Monomersynthese nötig war. Die bei der Submonomer-Methode benötigten Chemikalien (BrAcOH (**37**), Aktivierungsreagenzien, Amine) können kommerziell günstig erworben werden. Im Gegensatz dazu müssen für die Monomer-Methode die Bausteine erst synthetisiert werden. Um eine möglichst große Bandbreite an Aminen abzudecken müssen sehr viele verschiedene Bausteine synthetisiert werden, was sehr zeit- und kostenintensiv ist.

Die Synthese der Peptoidarrays wurde auf Fmoc-NH<sub>2</sub>-βAla-10:90-PEGMA-co-MMA Oberflächen durchgeführt, da sie wie bereits in Kap. 3.1. beschrieben wurde, eine sehr gute Proteinresistenz besitzen, die für spätere Bindungsstudien eine wichtige Rolle spielt und außerdem haben sich diese Oberflächen in der Peptid-Synthese mit der cLIFT-Methode als geeignet für Laser-basierte Syntheseansätze herausgestellt. Jedoch war zu beachten, dass die Fmoc-NH<sub>2</sub>-βAla-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche zahlreiche Estergruppen trägt. Die Verwendung von hohen Aminkonzentrationen ist dann kritisch, da die Amine die Esterbindungen *via* Aminolyse spalten könnten. Jedoch werden die Oberflächen bereits routinemäßig in der Peptidchemie verwendet, bei der eine Entschützung mit 20 vol% Piperidin, das ein potenzielles sekundäres Amin für die nucleophile Substitution darstellt, in DMF ohne Probleme vollzogen werden kann. Eine längere Entschützungzeit führt jedoch zur Zerstörung des Polymerfilms und ist auf die Aminolyse zurückzuführen. Die geringen Aminkonzentrationen, die mit der c-LIFT-Methode möglich sind, sollten deshalb kein Problem darstellen.

Zudem kamen Syntheseoberflächen mit höheren Derivatisierungsgraden (> 1.00 nmol/cm<sup>2</sup>) nicht in Frage, da die transferierte Materialmenge zu gering ist, um die freien Bindungsstellen der Polymeroberfläche abzusättigen. Auf Grund der geringen Derivatisierung boten sich nur wenige analytische Methoden an, um Kupplungsausbeuten oder gar Nebenprodukte zu untersuchen. Die zuverlässigste Methode, um herauszufinden, ob ein Molekül tatsächlich synthetisiert werden konnte, war die Massenspektrometrie.

### 3.3.1. Vorbetrachtungen

Die Benutzung der cLIFT-Methode für Peptide mit der Submonomer-Methode stellte eine besondere Herausforderung dar. Dabei war zu beachten, dass die eingesetzten Chemikalien der Luftfeuchtigkeit und einer Sauerstoff-Atmosphäre ausgesetzt waren. Zudem mussten die eingesetzten Chemikalien in der verwendeten Polymermatrix in Kombination mit dem Lösungsmittel DCM oder Aceton mischbar sein, um eine homogene Donor-Oberfläche zu erzeugen, die wiederum zu homogenen Spots führen sollte. Die eingesetzten Chemikalien durften möglichst nicht nach dem abgeschlossenen Beschichtungsprozess auf der Donor-Oberfläche als Feststoff ausfallen, da sonst die Diffusion durch die Polymermatrix nicht gewährleistet war.

### 3.3.1.1. Acylierung

Bei der Acylierung wird normalerweise eine hohe Konzentration von Bromessigsäure in einem Lösungsmittel in Kombination mit einem hohen Überschuss an DIC (**6**) eingesetzt, um eine hohe Ausbeute zu generieren.<sup>[19]</sup> Das aus der Peptidchemie bekannte HOBt (**8**), das die Umsetzung zur Ausbildung einer Amidbindung beschleunigt und somit Nebenreaktionen unterdrückt, kann bei Peptoiden nicht eingesetzt werden, da es zu zahlreichen Abbruch- und Nebenreaktion führt.<sup>[19]</sup> Bei der Synthese eines Peptoids mit HOBt (**8**) werden nur sehr geringe Mengen des gewünschten Peptoids erhalten, da die Acylierung nicht vollständig abläuft.<sup>[108]</sup> Des Weiteren führte die Verwendung von Uroniumsalzen, als Aktivierungsreagenzien, in Kombination mit DIPEA zu einer unvollständigen Bromacylierung und kam für die Peptoidsynthese auch nicht in Frage.<sup>[108]</sup>

Mit der cLIFT-Methode sind hohe Konzentrationen an der Oberfläche schwer realisierbar, da die Durchmischung der einzelnen Lagen und die Diffusion zur Oberfläche, aufgrund des viskosen Matrixmaterials, sehr stark eingeschränkt sind. Des Weiteren konnte im vorangehenden Kapitel gezeigt werden, dass sehr schlechte Reaktionsausbeuten erhalten wurden, wenn zuerst das Aktivierungsreagenz und dann die Aminosäure auf die Oberfläche aufgebracht wurden. Aus diesem Grund wurden alternative Lagenreihenfolgen getestet.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Donoren mit DIC (**6**) aufgrund seiner Wasserempfindlichkeit nicht lagerfähig waren. Die Donor-Oberflächen wurden deshalb stets frisch generiert. Des Weiteren wurde eine Kontamination des DIC (**6**), durch den Kontakt der DIC-Donor-Oberfläche mit der Akzeptor-Oberfläche festgestellt. Diese Kontamination war jedoch kein Problem, da DIC (**6**) in allen Peptidspots für die Kupplung benötigt wurde.

Eine Alternative zur *in situ* Aktivierung von Bromessigsäure sind Aktivester der Bromessigsäure. Die Aktivester Bromessigsäure-2,4-Dinitrophenol (**40**)<sup>[70, 108, 131]</sup>, Bromessigsäure-Pentafluorophenol (**41**)<sup>[108, 131]</sup> und Bromessigsäure-*N*-Succinimidylester (**42**)<sup>[108, 132]</sup> konnten bereits in isolierter Form synthetisiert werden. Heine *et.al.* konnte zeigen, dass die Verwendung von BrAc-ODNP (**40**) und BrAc-OPfp (**41**) zu hohen Produktausbeuten und Reinheiten führte. Im Falle der mangelnden Reaktivität des BrAc-OSu (**42**) kam es jedoch zu einer unvollständigen Acylierung. Die Konkurrenzreaktion der nucleophilen Substitution anstelle der Acylierung ist im Falle des

BrAc-OPfp (**41**) kleiner 1% und im Falle des BrAc-OSu (**42**) kleiner 5% aufgetreten. (siehe Kap. 1.6.).<sup>[70]</sup>

### 3.3.1.2. Nucleophile Substitution

In der nucleophilen Substitution für die Peptoidsynthese können zahlreiche Amine eingesetzt werden, solange sie reaktiv genug sind eine nucleophile Substitution mit einem Bromid einzugehen und das gebildete sekundäre Amin acylierbar ist. Welche Amine eingesetzt werden können ist in der Literatur zu finden.<sup>[19, 60, 108, 133]</sup> Die reaktiven funktionellen Gruppen (u.a. Amine, Alkohole, Carbonsäuren Thiole etc.) der Seitenketten müssen hierbei geschützt werden.<sup>[19, 133b]</sup> Heine *et. al.* konnte zeigen, dass die Verwendung des BrAc-ODNP (**40**) sogar ungeschützte Aminoalkohole zuließ.<sup>[108]</sup>

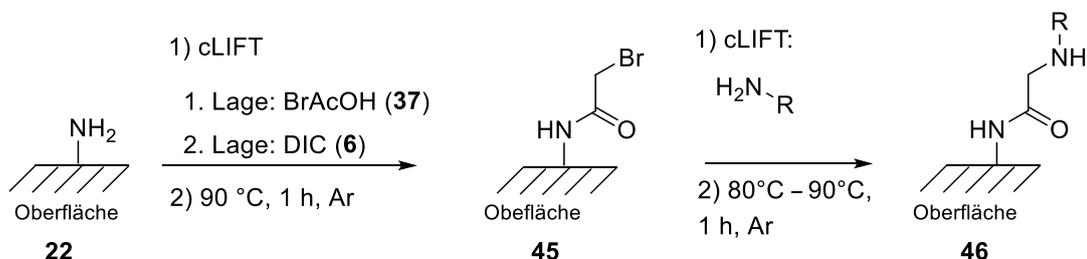
Bei der Durchführung der cLIFT-Methode zur Funktionalisierung von Oberflächen mussten jedoch noch einige Faktoren beachtet werden. Die nucleophile Substitution wird normalerweise ebenfalls mit hohen Aminkonzentrationen durchgeführt<sup>[108]</sup>, die wie oben beschrieben in Kombination mit dem Laser-basierten Transfer schwer realisierbar sind.

Des Weiteren sind sehr viele Amine bei Raumtemperatur flüssig, sodass mit einer Verdunstung zu rechnen ist, dadurch wird die Reaktionszeit deutlich verkürzt und verringerte Kupplungsausbeuten sind zu erwarten. Heine *et.al*, konnte bereits zeigen, dass bei der Synthese von Peptoiden auf einer Cellulosemembran *via* Spotting erst gute Ausbeuten erreicht werden konnten, wenn die eingesetzten Amine einen Siedepunkt oberhalb von 50°C besitzen.<sup>[70, 108]</sup>

Im Falle der cLIFT-Methode bei der die Kupplung bei 90 °C abläuft, war zu beachten, dass Amine mit einem Siedepunkt unterhalb der Kupplungstemperatur, die die Matrix benötigte um viskos zu werden, kritisch waren, da die Aminkonzentration durch Verdunstung verringert werden könnten und es zu einer Kontamination der benachbarten Spots kommen könnte.

### 3.3.2. Generierung der ersten Peptoidarrays mit der cLIFT-Methode

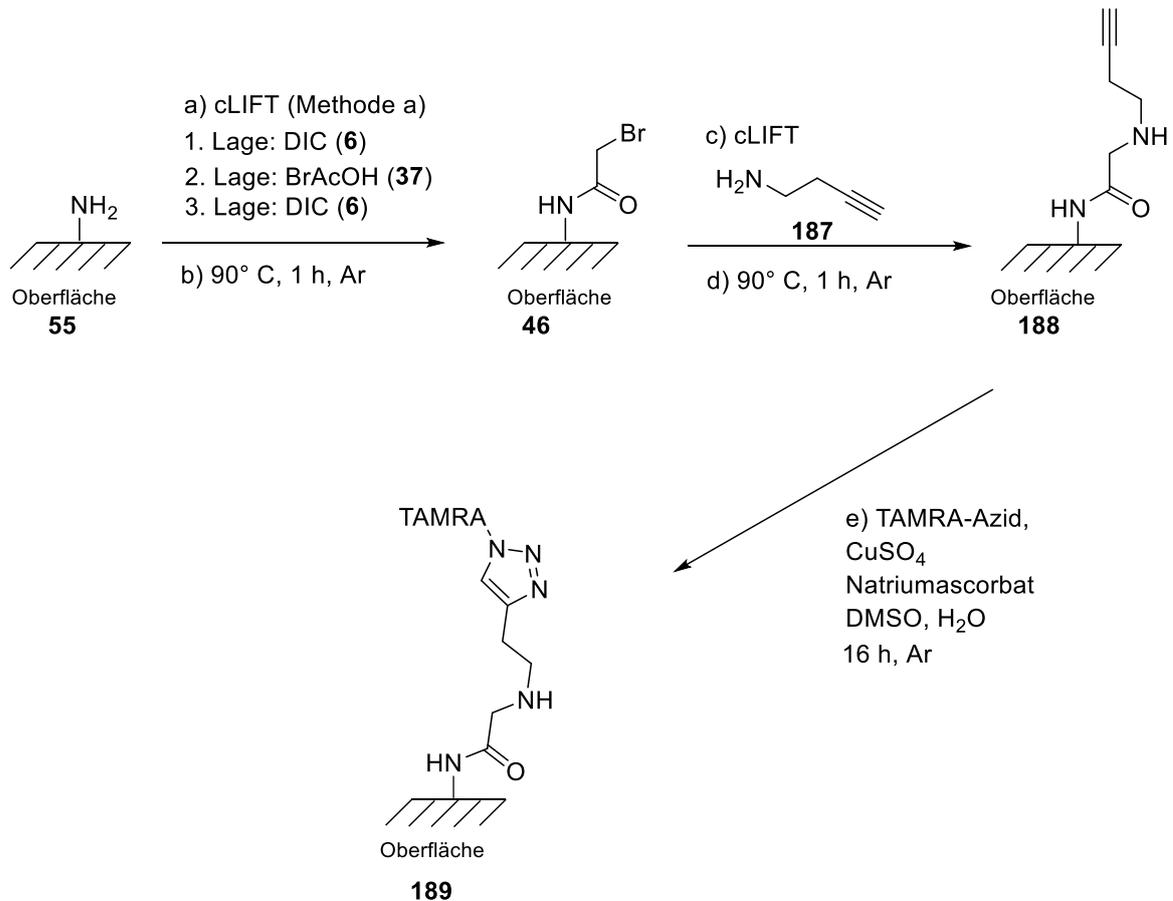
In Zusammenarbeit mit Juliane Greifenstein wurde die Synthese der ersten Peptoidarrays mit der Submonomer-Methode getestet (Schema 42).<sup>[124]</sup>



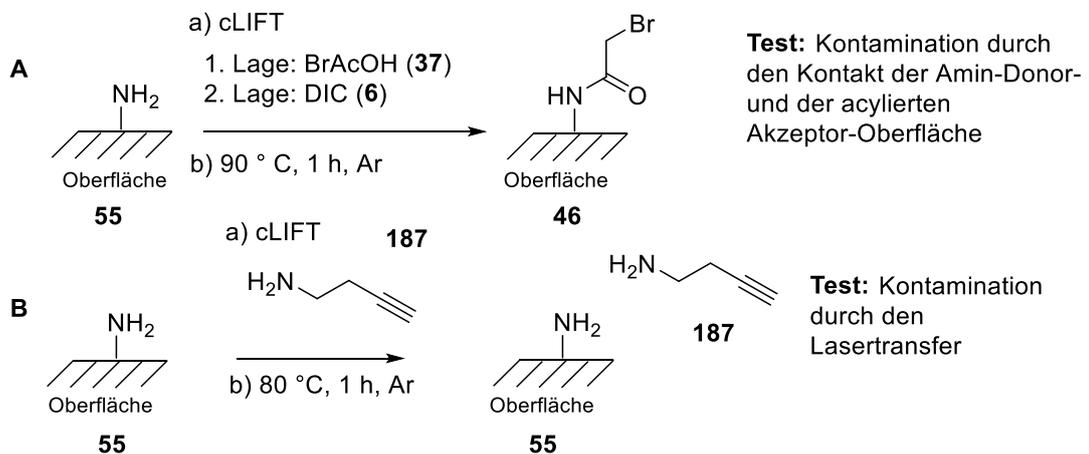
Schema 42: Erste Syntheseroute der cLIFT-Methode *via* Submonomer-Methode.

Zu Beginn wurde eine markierte Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90 PEGMA-co-MMA Oberfläche mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt. Anschließend wurde zuerst BrAcOH (**37**) und dann DIC (**6**) Laser-transferiert und dann bei 90 °C an die freien Amine des immobilisierten  $\beta$ -Alanins (**55**) gekuppelt. Abschließend wurde das Amin Laser-transferiert und die nucleophile Substitution bei 80 – 90 °C durchgeführt.

Die Amine Propargylamin (**114**) oder Aminobutin (**187**) wurden verwendet, um eine Peptoidbindung durch die Kupplung mit TAMRA-N<sub>3</sub> *via* CuAAC nachzuweisen und die Form und die Homogenität des generierten Spots zu überprüfen (Schema 43).



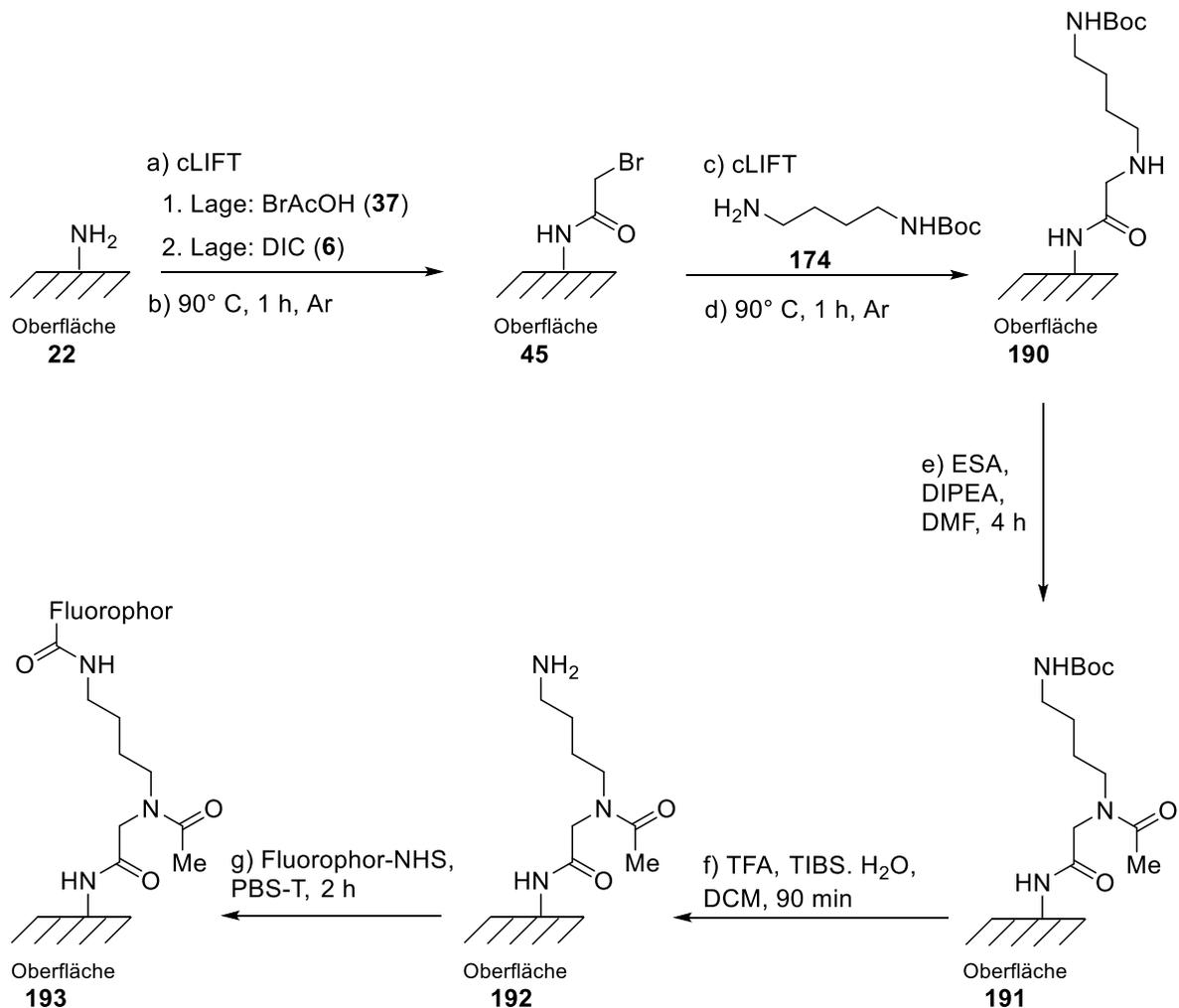
## Kontrollexperimente



**Schema 43:** Synthese des Peptoids **188** via der Submonomer-Methode und Detektion mittels TAMRA-Azid via Click-Chemie. Das Experiment wurde auf einer einzigen NH<sub>2</sub>-βAla-PEGMA-co-MMA Oberfläche durchgeführt, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können.

Das verwendete Propargylamin (**114**) lagerte sich jedoch extrem unspezifisch in die Polymer-Oberfläche ein, wenn es auf eine  $\text{NH}_2$ - $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche Laser-transferiert wurde (Kontrollexperiment B), sodass anhand der Fluoreszenz keine Aussage über eine erfolgreiche Kupplung gemacht werden konnte.<sup>[124]</sup> Bei der Verwendung von Aminobutin (**187**) (Kontrollexperiment B) wurde eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Spots des Hauptexperimentes nach einer Kupplung des TAMRA- $\text{N}_3$  an das immobilisierte Alkin detektiert, sodass hier von einer deutlich geringeren Interaktion mit der Oberfläche ausgegangen wurde. Um gute Spotintensitäten zu erhalten, mussten hohe Pulsdauern ( $> 15$  ms) bei einer Laserleistung von 100% eingesetzt werden.

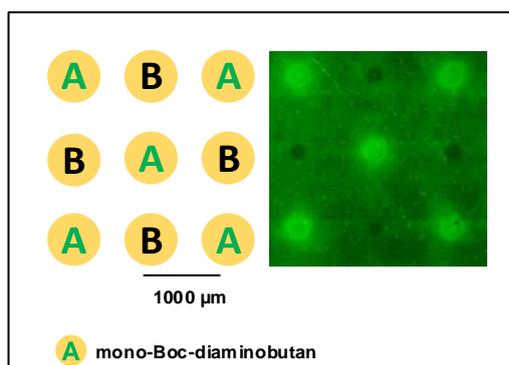
Als ein weiteres Amin wurde ein Mono-Boc-geschütztes-Amin ausgewählt (Schema 44).



**Schema 44:** Synthese des Peptoids **190** und Detektion mittels TAMRA-NHS nach einer Acetylierung und Entschützung mit TFA.

Nach der Ausbildung der Peptoidbindung wurde die Oberfläche acetyliert und anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe mit TFA abgespalten. Die resultierenden freien Amine wurden dann für Detektion der gebildeten Peptoidbindung mit TAMRA-NHS, *DyLight* 650-NHS oder *DyLight* 680-NHS umgesetzt. Erneut konnten geringe Fluoreszenzintensitäten des Kontrollexperimentes B detektiert werden.

In Abbildung 65, ist ein Peptidarray dargestellt. Nach Schema 44 wurde eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90 PEGMA-co-MMA Oberfläche mit 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt. Dann wurde ein Peptidarray mit einem Schachbrettmuster AB generiert, bei dem der Spot **A** und **B** mit BrAcOH (**37**) acyliert wurden. Für die Acylierung wurde die Donor-Reihenfolge beim Lasertransfer verändert. Nacheinander wurden DIC (**6**), dann BrAcOH (**37**) und dann erneut DIC (**6**) Laser-transferiert. Die Veränderung wurde durchgeführt, da der direkte Kontakt der BrAcOH (**37**) mit der Oberfläche vermieden werden sollte, da sonst eine nucleophile Substitution anstelle der gewünschten Acylierung möglich gewesen wäre. Die Aktivierung der Bromessigsäure kann erst stattfinden, wenn das DIC (**6**) durch das Matrixmaterial in die erste Lage der BrAcOH (**37**) hinein diffundiert ist. Auf Grund der Wasserempfindlichkeit des Carbodiimids **6**, wurde eine weitere Lage des DIC (**6**) transferiert. In vorherigen Experimenten konnten nur sehr schlechte Intensität nach einer Fluoreszenzmarkierung detektiert werden. Dabei wurde vermutet, dass das DIC (**6**) durch den direkten Kontakt mit der wasserhaltigen Oberfläche zum Harnstoffderivat umgesetzt wurde. Anschließend wurde nur auf den Spot **A** das Amin Laser-transferiert und abschließend die nucleophile Substitution durchgeführt.



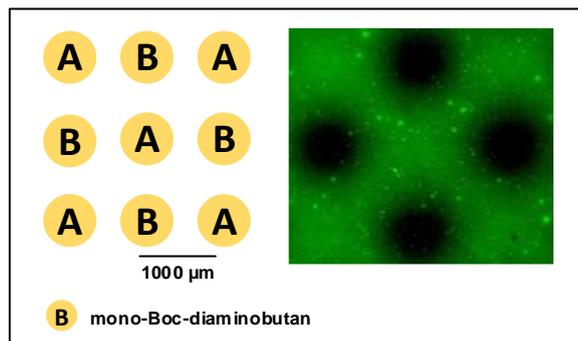
**Abbildung 65:** Peptidarray-Layout. Position **A**: BrAcOH (**37**) (Laser-Layout: 3; 15 ms), mono-Boc-diaminobutan (**174**) (Laser-Layout: 3; 15 ms) und Position **B**: BrAcOH (**37**) (15 ms). (B) Fluoreszenzscan, nach einer TAMRA-NHS Inkubation.

Nach einer Fluoreszenzmarkierung konnte nur die Peptoidbindung in Position **A** nachgewiesen werden, sodass eine Kontamination des Amins durch den direkten Kontakt der Akzeptor-Oberfläche mit der Amin-Donor-Oberfläche ausgeschlossen wurde. Es wurde jedoch ein starker Fluoreszenzhintergrund nach der Markierung detektiert. Zuerst wurde vermutet, dass diese Kontamination durch die unspezifische Einlagerung des Fluorophors in die  $\text{NH}_2$ - $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche zustande kommt, die bei zahlreichen unterschiedlichen Fluorophoren gelegentlich detektierbar war.

In weiteren Experimenten wurde auf eine Oberfläche, die nicht mit Bromessigsäure (**37**) und DIC (**6**) in Kontakt kamen, ein Amin Laser-transferiert. Es wurden keine Fluoreszenzsignale nach einer Markierung erhalten, sodass von einer unspezifischen Einlagerung der Amine nicht ausgegangen werden kann. Aus diesem Grund muss es sich um eine Kontamination durch die Bromessigsäure (**37**) und DIC (**6**) handeln. Diese Kontamination war bereits von DIC (**6**) bekannt (Kap 3.2.4.). Aus diesem Grund wurde die Oberfläche nicht nur in den Spots acyliert, sondern in geringen Mengen überall dort, wo sich die Akzeptor- und Donor-Oberfläche berührten. Das Laser-transferierte Amin konnte deshalb an die Oberfläche kuppeln, sodass diese Spots nach einer Fluoreszenzmarkierung detektierbar waren.

In weiteren Experimenten mit unterschiedlichen Fluorophoren stellte sich heraus, dass die starke Fluoreszenz des Hintergrundes durch eine Interaktion des Fluorophors mit der acylierten Oberfläche zustande kommt. Diese Vermutung wurde bekräftigt, da diese Kontamination deutlich verringert wurde, wenn die Donor-Oberflächen nach dem Beschichtungsvorgang unter vermindertem Druck für 15 min getrocknet wurden. Dabei wurden die restlichen Lösungsmittelrückstände entfernt, sodass die Oberfläche deutlich trockener war und eine Kontamination unwahrscheinlicher war.

Des Weiteren wurde diese Vermutung bestätigt, da diese Interaktion nicht detektiert wurde, wenn auf einen Spot **A** ein Amin Laser-transferiert wurde, das mit dem Fluorophor, das zur Detektion genutzt werden sollte, reagieren konnte und auf Spot **B** ein Amin Laser-transferiert wurde, das nicht mit dem Fluorophor reagieren konnte (Abbildung 66).



**Abbildung 66:** (A) Peptoidarray-Layout. Position **A**: BrAcOH (**37**) (Laser-Layout: 3; 15 ms) und Position **B**: BrAcOH (**37**) (Laser-Layout: 3; 15 ms), mono-Boc-diaminobutan (**174**) (15 ms). (B) Fluoreszenzscan, nach einer TAMRA-N<sub>3</sub> Inkubation.

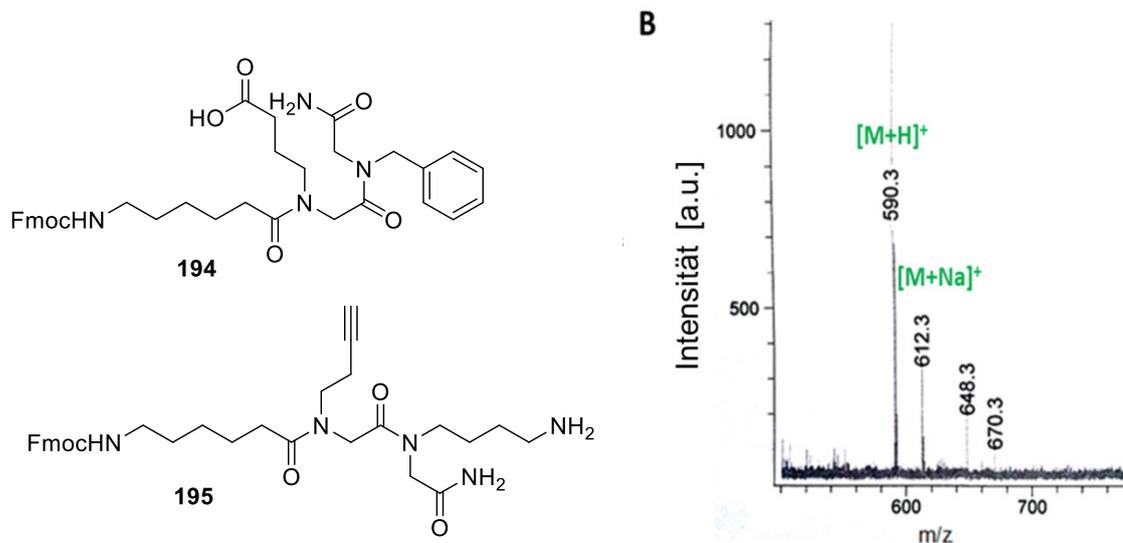
In Spot A konnte eine geringe Fluoreszenz detektiert werden, im Spot B jedoch nicht. Der acylierte Hintergrund hingegen zeigte auch eine geringe Fluoreszenz. Auf dem Spot **B** gab es keine oder nur sehr geringen Mengen an freien Bromatomen, sodass diese Interaktion nicht stattfinden konnte.

Als Lösung für die Kontamination außerhalb der Spots kann die Oberfläche mit Fmoc-Gly-OPfp (**102**) vorstrukturiert werden, sodass die Acylierung nur in den Spots stattfinden kann, die mit Glycin vorstrukturiert worden sind. Wenn ausschließlich ein Peptoidarray generiert werden soll, ist diese Kontamination kein Problem, da alle Spots acyliert werden müssen. Bei der Durchführung weiterer Reaktion in einem Array, bei dem nicht alle Spots acyliert werden dürfen ist diese Kontamination nicht tolerierbar, sodass sich die Methode nicht eignet.

### 3.3.3. Detektion der Peptide *via* Massenspektrometrie

Die Detektion der erfolgreichen Peptidsynthese an Hand von Fluoreszenz ist nicht ausreichend, um zu beweisen, dass eine Peptidbindung wirklich generiert wurde. Aus diesem Grund wurden zwei Dimere auf einer NH<sub>2</sub>-Rink βAla-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit der cLIFT-Methode (Laser-Layout: 1) synthetisiert (Abbildung 67). Für die Acylierung wurde BrAcOH (**37**) und DIC (**6**) verwendet. Die nucleophile Substitution wurde bei dem Peptoid **194** mit Benzylamin und *tert*-Butyl-aminobutansäure durchgeführt und bei dem Peptoid **195** wurde zuerst mono-Boc-diaminobutan (**174**) und dann Propargylamin (**114**) verwendet. Anschließend

wurde das sekundäre Amin mit Fmoc-Aminohexansäure unter der Verwendung von DIC (**6**) und HOBt (**8**) in DMF acyliert. Dadurch konnten bei der Abspaltung der Peptoide Nebenreaktionen vermieden werden. Dabei wurde ein Layout (Laser-Layout: 1) gewählt, dass eine möglichst flächige Synthese ermöglicht, um hohe Rohproduktmengen zu erhalten. Das Rohprodukt wurde anschließend mit TFA abgespalten und konnte *via* MALDI-MS nachgewiesen werden.

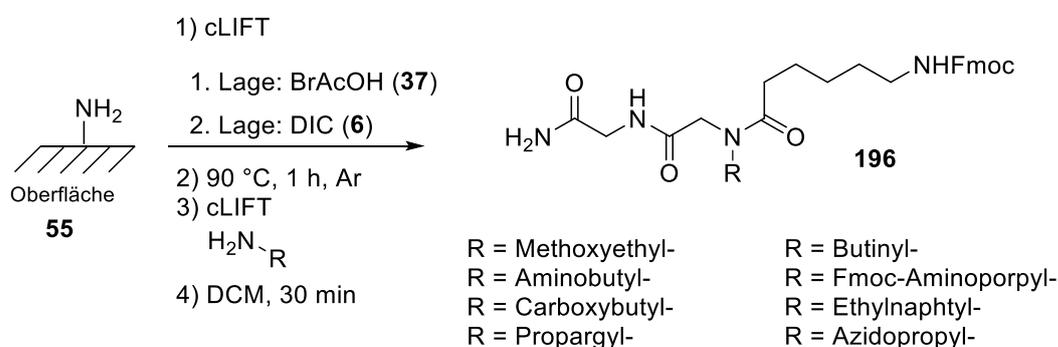


**Abbildung 67:** (A) Synthetisierte Peptoide **194** und **195** via cLIFT-Methode unter der Verwendung von BrAcOH (**37**) (1. Lage) und DIC (**6**) (2. Lage). (B) Massenspektrum des Rohproduktes des Peptoids **195**.

Zusätzlich wurde Elektrospray-Ionisation (ESI)-Massenspektrometrie durchgeführt, um mögliche Abbruchreaktionen und die Nebenreaktionen zu detektieren (Kap. 1.6.). Es konnten jedoch nur die Massepeaks der gewünschten Produkte und des Abbruchprodukts, dass aus der Kupplung der Aminohexansäure an den freien *N*-Terminus des Rink-Amid-Linkers (**87**) generiert wurde, detektiert werden. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um eine unvollständige Acylierung, sondern um die Tatsache, dass die transferierte Materialmenge nicht ausreicht, um alle freien Bindungsstellen der Oberfläche abzusättigen. Bereits bei der Synthese der Peptidarrays wurde detektiert, dass die transferierte Materialmenge nicht ausreichend ist (Kap. 3.2.2.). Aus diesem Grund, ist davon auszugehen, dass die Synthese mit einer hohen Reinheiten verläuft.

Des Weiteren wurde ortsaugelöste MALDI-Massenspektrometrie durchgeführt (siehe Kap. 3.2.3.), um unterschiedliche Peptoide, die auf einem Array abgespalten werden,

nachzuweisen. Dazu wurden verschiedene Peptide mit der cLIFT-Methode in abgegrenzten Blöcken auf einer NH<sub>2</sub>-Photo-βAla-PEGMA-co-MMA Oberfläche synthetisiert und abschließend durch eine UV-Bestrahlung abgespalten. (Laser-Layout: 1). Die Versuchsdurchführung ist in Schema 45 erläutert. Die Kupplung der Amine erfolgte mit DCM auf Grund des niedrigen Siedepunktes von Azidopropylamin und Propargylamin (**114**), um die Gefahr der Kontamination zu vermeiden. In einem Linienscan konnten dann die Peptide **196** abgebildeten Peptide nachgewiesen werden. Diese Methode ermöglicht es, Kontrollpeptid-Spots während einer Peptidarraysynthese nachzuweisen, da während der Synthese mit der Submonomer-Methode keine Reaktionskontrolle durchgeführt werden kann.



**Schema 45:** Synthetisierte Peptide via cLIFT-Methode, die anschließend via orts aufgelöster MALDI-MS in einem Linienscan detektiert werden konnten.

### 3.3.4. Peptidsynthese nach der Submonomer-Methode mit Bromessigsäure-Aktivestern

Letzendlich können Peptidarrays durch die Verwendung von Bromessigsäure (**37**) und DIC (**6**) synthetisiert werden. Jedoch wird eine hohe Bestrahlungsdauer (> 15 ms) bei einer Laserleistung von 100% benötigt, um gute Kupplungsausbeuten bei einem *Pitch* von 250 μm zu generieren. Diese hohe Bestrahlungsdauer könnte jedoch zu einer Schädigung der Oberfläche führen und verlängert zudem den Laserprozess, sodass alternative Bromacylierungs-Methoden vorzuziehen waren. Die Submonomer-Methode unter der

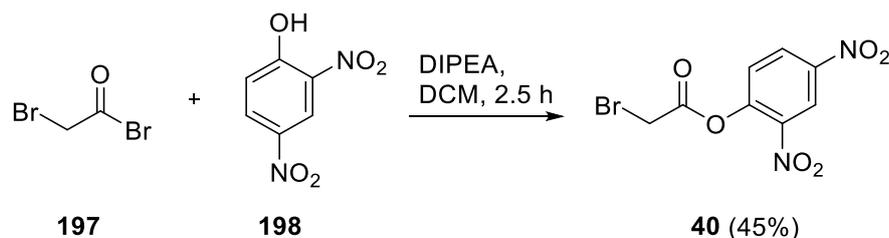
Verwendung von Bromessigsäure (**37**) und DIC (**6**) wurde aus diesem Grund nicht weiter optimiert und die Aktivester der Bromessigsäure verwendet.

Die Acylierung mit einem Aktivester der Bromessigsäure (Kap. 3.3.1.3.) hatte den Vorteil, dass nur eine Donor-Oberfläche anstelle von zwei oder gar drei benötigt wurde und die Donor-Oberflächen lagerfähig wurden. Es wurde bereits gezeigt, dass OPfp-aktivierte Aminosäuren-Donor-Oberflächen fünf Monate gelagert werden konnten. Die DIC-Donor-Oberflächen waren nicht lagerfähig und mussten immer frisch hergestellt werden. Zudem war die Methode vielversprechend, um die in Kapitel 3.3.2. beschriebene Kontamination der Acylierung zu vermeiden und um höheren Ausbeuten, bei einer kurzen Bestrahlungsdauer, zu erhalten.

### 3.3.4.1. Synthese der Aktivester

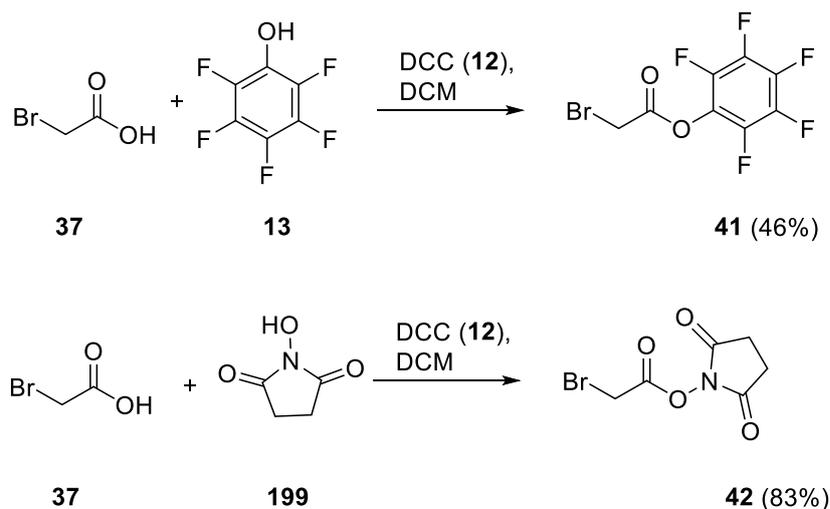
Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen der Spot-Synthese auf einer Cellulosemembran und der cLIFT-Methode wurden alle drei in der Literatur beschriebenen Aktivester (siehe Kap. 3.3.1.3.) synthetisiert.

Die Synthese des Bromessigsäure-Dinitrophenolester (**40**)<sup>[70, 108, 129]</sup> erfolgte durch die Reaktion von Bromoacetyl bromid (**197**) und 2,4 Dinitrophenol (**198**) nach einer Literatur bekannten Reaktion (Schema 46).



**Schema 46:** Synthese von Bromessigsäure-Dinitrophenolester (**40**).

Bromessigsäure-pentafluorophenolester (**41**)<sup>[130]</sup> und Bromessigsäure-*N*-succinimidylester (**42**)<sup>[108]</sup> wurden durch die Reaktion von Bromessigsäure (**37**) und Pentafluorophenol (**13**) oder *N*-Hydroxysuccinimid (**199**) mit DCC (**12**) nach einer Literatur bekannten Reaktion erhalten. Die Aktivester **41** und **42** wurden ohne eine weitere Aufreinigung umgesetzt. Der Aktivester **41** enthielt als Verunreinigung (10.0 mol%) des entstandenen Harnstoffderivates des DCC (**12**). Der Aktivester **42** enthielt noch das Edukt (Pentafluorophenol (**13**)).



**Schema 47:** Synthese von Bromessigsäure-Pentafluorphenol (**41**) und Bromessigsäure-*N*-succinimidylester (**42**).

### 3.3.4.2. Kompatibilitätstest der Bromessigsäure-Aktivester mit der cLIFT-Methode

Analog zu den in Schema 43 und 44 beschriebenen Syntheserouten wurden die Aktivester getestet.

Zu Beginn wurde die Pulsdauer von 15 ms und ein *Pitch* von 1.00 mm ausgewählt, da die Benutzung der BrOAc (**37**) in Kombination mit DIC (**6**), diese Pulsdauern erforderte. Dabei wurden bei der Verwendung vom Bromessigsäure-ODNP (**40**) und Bromessigsäure-OPfp (**41**) sehr große Spots generiert. Bromessigsäure-OSu (**42**) führte hingegen zu kleineren Spots.

Nach einer Fluoreszenzmarkierung konnten die höchsten Fluoreszenzsignale mit Bromessigsäure-OSu (**42**) und Bromessigsäure-ODNP (**40**) erhalten werden. Bromessigsäuren-OPfp (**41**) führte zu sehr schwachen Fluoreszenzintensitäten und sehr inhomogenen Spots. Zu bedenken ist, dass der Aktivester **41** eigentlich reaktiver ist als der Aktivester **42**, somit eine höhere Fluoreszenzintensität zu erwarten war. Jedoch ist der Aktivester **42** bei Raumtemperatur flüssig, sodass dieser im Vergleich zu den anderen beiden Aktivestern nicht so stabil ist. Auf die Verwendung von Bromessigsäure-OSu (**42**) wurde jedoch verzichtet, da es zu einer unvollständigen Acylierung führt<sup>[108]</sup> und die

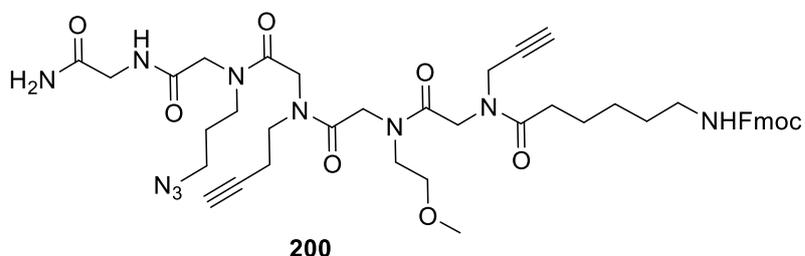
Bromessigsäure-ODNP (**40**) ähnliche Fluoreszenzintensitäten zeigte. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

**Tabelle 7:** Ergebnisse der Peptidsynthese mit Aktivestern der Bromessigsäure.

Aktivester der BrAcOH	Ausbeute
Fmoc-BrAc-OSu	↓
Fmoc-BrAc-ODNP	
Fmoc-BrAc-OPfp	

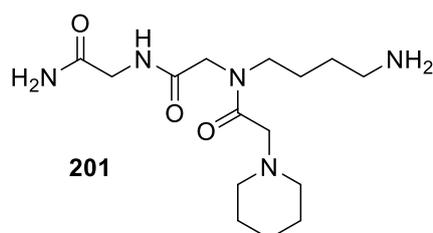
Alle weiteren Experimente wurden aus diesem Grund mit BrAc-DNP (**40**) durchgeführt. Für die nucleophile Substitution wurden die Amin-Donor-Oberflächen vor der Benutzung vorsichtshalber unter vermindertem Druck getrocknet, um eine Kontamination zu vermeiden. Um sicherzustellen, dass das erhaltene Fluoreszenzsignal durch die Bildung der gewünschten Peptoids zustande kam, wurden Peptide auf einer NH<sub>2</sub>-Gly-Rink-βAla-PEGMA-co-MMA synthetisiert. Nach der Reaktion wurde das Rohprodukt mit TFA abgespalten und eine massenspektrometrische Analyse *via* MALDI durchgeführt.

Durch die Verwendung des Aktivester **40** ist es gelungen bis zu vier Peptoidbindungen *via* cLIFT Methode zu synthetisieren (Abbildung 68). Das Peptoid **200** wurde durch eine abwechselnde Acylierung mit dem Aktivester **40** und der nucleophile Substitution mit Azidopropylamin, Aminobutin (**187**), Methoxyethylamin (**123**) und Propargylamin (**114**) synthetisiert (Laser-Layout: 1). Anschließend wurde das sekundäre Amin mit Fmoc-Aminohexansäure unter der Verwendung von DIC (**6**) und HOBt (**8**) in DMF acyliert. Das Peptoid **200** konnte *via* MALDI-MS nachgewiesen werden.



**Abbildung 68:** Synthetisiertes Tetramer **200** unter der Verwendung des Aktivester **40**.

Bettina Streit konnte zudem zeigen, dass die Verwendung des Aktivester **40** mit hohen Reinheiten verläuft.<sup>[134]</sup> In einem ESI-MS Experiment konnte nur das Peptoid **201** und das gekoppelte Glycin an den Rink-Linker (**37**) im Massenspektrum detektiert werden. Wie erwartet, war die transferierte Materialmenge nicht ausreichend, um die freien Bindungsstellen der Oberfläche abzusättigen (Abbildung 69).

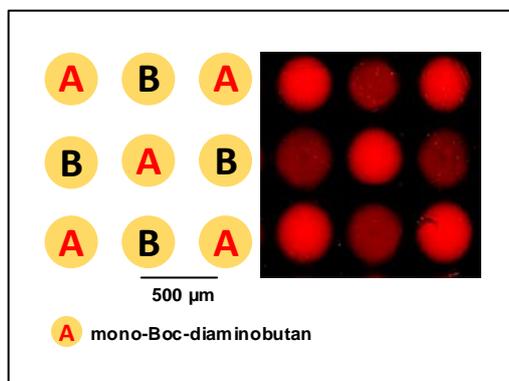


**Abbildung 69:** Synthetisiertes Peptoid **201** mit der cLIFT-Methode *via* Submonomer-Methode.

### 3.3.5. Optimierung der Peptoidsynthese

Die Optimierungen zu der Verwendung des Aktivesters **40** wurden in Zusammenarbeit mit Bettina Streit durchgeführt.<sup>[134]</sup>

Bei der Verwendung des Aktivester **40** wurde festgestellt, dass der Kontakt der Akzeptor-Oberfläche und der Aktivester-Donor-Oberfläche zu keiner Kontamination führt. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die acylierten Spots, die mit dem Aktivester **40** generiert wurden, eine starke Interaktion mit den Fluorophoren, die zur Detektion genutzt wurden besitzen, sodass sich die Fluorophore in den Spots anlagerten, obwohl dort kein Amin Laser-transferiert wurde (Abbildung 70).

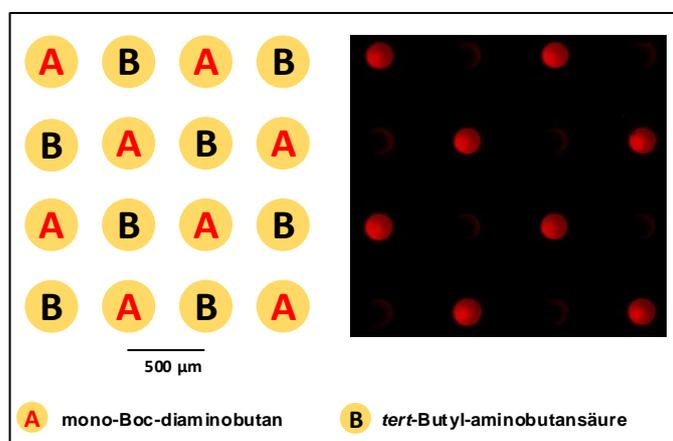


**Abbildung 70:** Peptoidarray-Layout. Position A: BrAc-ODNP (**40**) (Laser-Layout: 8; 15 ms), mono-Boc-diaminobutan (**174**) (Laser-Layout: 8; 15 ms) und Position B: BrAc-ODNP (**40**) (15 ms) und

Fluoreszenzscan, nach einer *DyLight* 650-NHS Inkubation. Das Bild wurde in Helligkeit und Kontrast optimiert.

Die Kontamination durch den Kontakt mit einer Amin-Donor-Oberfläche konnte ausgeschlossen werden, da 1) Ein acylierter Array, nach der Inkubation mit den verwendeten Fluorophoren ein Signal zeigte, obwohl die Oberfläche nicht mit den Aminen in Kontakt kam 2) Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Aminen (mono-Boc-diaminobutan (**174**) und *tert*-Butyl-butansäure) in einem Peptoidarray führten zu getrennten Fluoreszenzsignalen. Spots die bereits mit einem Amin funktionalisiert wurden interagieren nicht mehr mit dem Fluorophor. Das ist darauf zurückzuführen, dass die Brom-acylierten Spots, durch eine abschließende nucleophile Substitution nicht mehr existierten, sodass keine Interaktion mit dem Fluorophor stattfinden kann.

Das durchgeführte Experiment in Abbildung 71, bei dem ein Peptoidarray aufgebaut wurde verdeutlicht den erwähnten Punkt 2.<sup>[134]</sup> In diesem Experiment wurde eine vorstrukturierte Gly-Oberfläche verwendet. Auf Position **A** wurde mono-Boc-diaminobutan (**174**) Laser-transferiert und in Position **B** *tert*-Butyl-aminobutansäure.



**Abbildung 71:** Peptoidarray-Layout. Position **A** : BrAc-ODNP (**40**) (Laser-Layout: 5; 1.5 ms), mono-Boc-diaminobutan (**174**) (10 ms) und Position **B**: BrAc-ODNP (**40**) (Laser-Layout: 5; 1.5 ms), *tert*-Butyl-aminobutansäure (Laser-Layout: 6; 10 ms).<sup>[134]</sup> Und Fluoreszenzscan, nach einer *DyLight* 650-NHS Inkubation, die nach einer Acetylierung und anschließender TFA-Entschützung durchgeführt wurde. Hierbei wurden spezifisch die freien Amine des Spots **A** detektiert. Aufgrund einer fehlenden Fluoreszenz des Spot **B** kann von einer Kontamination durch die Amin-Donor-Oberfläche ausgeschlossen werden. Das Bild wurde in Helligkeit und Kontrast optimiert.

Nach einer Acetylierung und abschließender Seitenkettenentschützung wurde mit *DyLight* 650 inkubiert. Spot **A** wies hierbei ein Fluoreszenzsignal auf. Spot **B** zeigte hierbei auch eine geringe Fluoreszenz, jedoch nur an den Stellen des acylierten Spots, wo das Amin nicht Laser-transferiert wurde. Da der acylierte Spot desamins etwas kleiner ist, konnte der Effekt gut beobachtet werden.

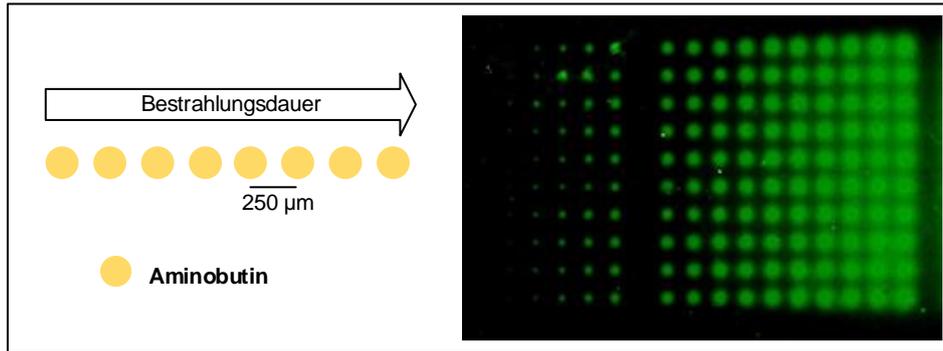
### 3.3.6. Bestimmung der idealen Bedingungen für den Laser-Prozess

Wie in Kapitel 3.2. beschrieben wurde, kann die Spotgröße durch die Laserleistung und Pulsdauer beeinflusst werden. Um die ideale Pulsdauer zu finden wurde aus diesem Grund die Pulsdauer bei gleichbleibender Laserleistung variiert. Wie in Kapitel 3.2.1. beschrieben wurde, ist die Spotgröße jedoch von vielen Faktoren abhängig und müsste im Prinzip jeder Chemikalie angepasst werden. Für den Aktivester der jeden Kupplungszyklus verwendet wurde, kann ein Wert ermittelt werden. Für die unterschiedlichen Amine, die unterschiedliche Eigenschaften besitzen, ist dies deutlich aufwendiger.

#### 3.3.6.1. Laserparameter für Bromessigsäure-dinitrophenolester

In vorherigen Experimenten wurde deutlich, dass bei einer Bestrahlungsdauer von 15 ms und einem *Pitch* von 1.00 mm, sehr große Spots durch die BrAc-ODNP (**40**) generiert wurde. Aus diesem Grund war zu erwarten, dass eine deutlich kleinere Bestrahlungsdauer notwendig ist, um bei kleineren *Pitches* getrennte Spots zu generieren.

Aus diesem Grund wurde ein Peptidarray generiert bei dem die Bestrahlungsdauer von 0.1 ms bis 10 ms variierte (Laser-Layout: 4, *Pitch* 250  $\mu\text{m}$ ). Für die Acylierung wurde BrAc-ODNP (**40**) verwendet und für die nucleophile Substitution Aminobutin (**187**). Der Nachweis erfolgte analog der in Schema 43 abgebildeten Methode. Dabei konnte festgestellt werden, dass BrAc-ODNP (**40**) ab einer Bestrahlungsdauer von größer 1.5 ms keine getrennten Spots bei einem *Pitch* von 250  $\mu\text{m}$  ermöglichte (Abbildung 72).



**Abbildung 72:** Peptidarray-Layout. (Layout 4, *Pitch* 250  $\mu\text{m}$ , 0.10 ms bis 10 ms) BrAc-ODNP (**40**) (< 3.0 ms), Aminobutin (**187**) (< 3.0 ms) und Fluoreszenzscan, nach einer TAMRA- $\text{N}_3$  Inkubation. Das Bild wurde in Helligkeit und Kontrast optimiert.

Größere Bestrahlungsdauern können jedoch eingesetzt werden, wenn die Oberfläche mit z.B. Fmoc-Gly-OPfp (**102**) vorstrukturiert wird. Dadurch wird die maximale Spotgröße begrenzt, da der Aktivester nur an die noch freien vorhandenen Amine kuppeln kann. Jedoch kann diese Methode nur durchgeführt werden, wenn reine Peptidarrays verwendet werden sollen, da die Nachbarspots durch den Aktivester bei einem kleineren *Pitch* definitiv kontaminiert werden.

### 3.3.6.2. Laserparameter für Amine

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Amine ist es nicht möglich eine genaue allgemeine Bestrahlungsdauer der Amin-Donor-Oberflächen anzugeben. Tobias Foertsch konnte bereits zeigen, dass bei der Peptidsynthese von 20 unterschiedlichen Aminosäuren extrem unterschiedliche Spotgrößen (bei gleicher Bestrahlungsdauer und Laserintensität) generiert wurden. Zudem wurde die Spotgröße durch viele Parameter, wie Luftfeuchtigkeit, Lösungsmittelgehalt der Donor-Oberflächen oder eine schwankende Laserleistung stark beeinflusst.

Bei den verwendeten Laser-transferierten Aminen wurden auch sehr unterschiedliche Spotgrößen detektiert. Für gute Kupplungsergebnisse ist es jedoch allgemein zu empfehlen, für das Amin eine hohe Bestrahlungsdauer zu verwenden, da mit steigender Bestrahlungsdauer deutlich bessere Intensitäten nach einer Fluoreszenzmarkierung erhalten werden konnten. Die aktuellen Ergebnisse lassen jedoch eher darauf schließen,

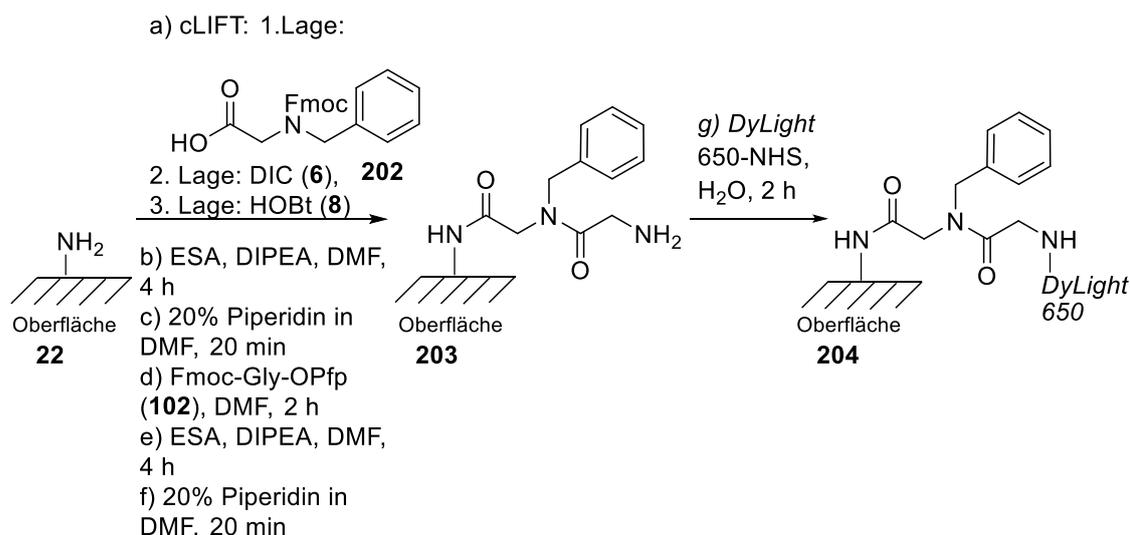
dass Arrays mit separaten Spots und guten Kupplungsausbeuten (Bestrahlungsdauer Amin: 10 ms) erst ab einem *Pitch* zwischen 250  $\mu\text{m}$  und 500  $\mu\text{m}$  realistisch sind.

### 3.3.7. Monomer-Methode

Bei der Submonomer-Methode mit dem cLIFT-Verfahren stellte sich heraus, dass die Bildung von kleinen *Pitches* kleiner 250  $\mu\text{m}$  schwer realisierbar ist. Bei der Verwendung von BrAc-ODNP (**40**) wurden sehr großer Spots generiert, die jedoch bei einem reinen Peptoidarray durch die Vorstrukturierung mit einer Aminosäure und abschließender Acetylierung vordefiniert werden kann. Für die Amine wurden jedoch sehr unterschiedliche Spotgrößen generiert.

Als einer Alternative zur Submonomer-Methode wurde deshalb die Monomer-Methode ausprobiert, die in Kombination mit der Aktivierungsreagenz DIC (**6**) als vielversprechend galt, um kleinere *Pitches* zu generieren. In Kap. 3.2.4. wurde gezeigt, dass durch die Verwendung von DIC (**6**) und HOBT (**8**), für die Kupplung einer Aminosäure keine größeren Spotgrößen wie die der OPfp-Aktivester, zu erwarten sind.

Für die Bildung eines Peptoidarrays wurde Fmoc-NPhe-OH auf eine  $\text{NH}_2$ - $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche Laser-transferiert. Anschließend wurden nacheinander DIC (**6**) und HOBT (**8**) transferiert.



**Schema 48:** Synthese des Peptoid **204** via Monomer-Methode.

Nach einer Kpplung wurde die Oberfläche nach einer Acetylierung mit ESA, DIPEA in DMF und einer Entschützung mit 20% Piperidin in DMF wurde Fmoc-Gly-OPfp (**102**) angeknüpft bevor die Fluoreszenzmarkierung mit *DyLight* 680 durchgeführt wurde. Das Produkt **204** konnte detektiert werden. Zusätzlich wurde das Uroniumsalz PyBOP (**15**) zur Aktivierung des Monomers **202** getestet. Jedoch wurden sehr inhomogene Spots generiert. Die Monomer-Methode wurde mittlerweile von Bettina Streit unter der Verwendung unterschiedlicher Monomerbausteine optimiert. Bei der Verwendung von DIC (**6**) konnten Dichten von 10 000 Spots/cm<sup>2</sup> erreicht werden. <sup>[134]</sup>

Zusammenfassend konnten mit der Submonomer-Methode Peptoidarrays via des cLIFT- Verfahrens mit einer Dichte größer 1600 Spots/cm<sup>2</sup> zugänglich gemacht werden. BrAc-ODNP (**40**) kann als eine gute Alternative zu BrAcOH (**37**) und DIC (**6**) genutzt werden. Dadurch wird eine schnellere und zuverlässigere cLIFT-Synthese ermöglicht. Ein besonderer Optimierungsbedarf besteht darin, die idealen Laserparameter der unterschiedlichen Amine zu definieren. Für die Erzeugung von kleineren *Pitches* sollte aktuell auf die Monomer-Methode zurückgegriffen werden, die jedoch im Vorfeld eine labor-intensive Synthese der Monomerbausteine erfordert.

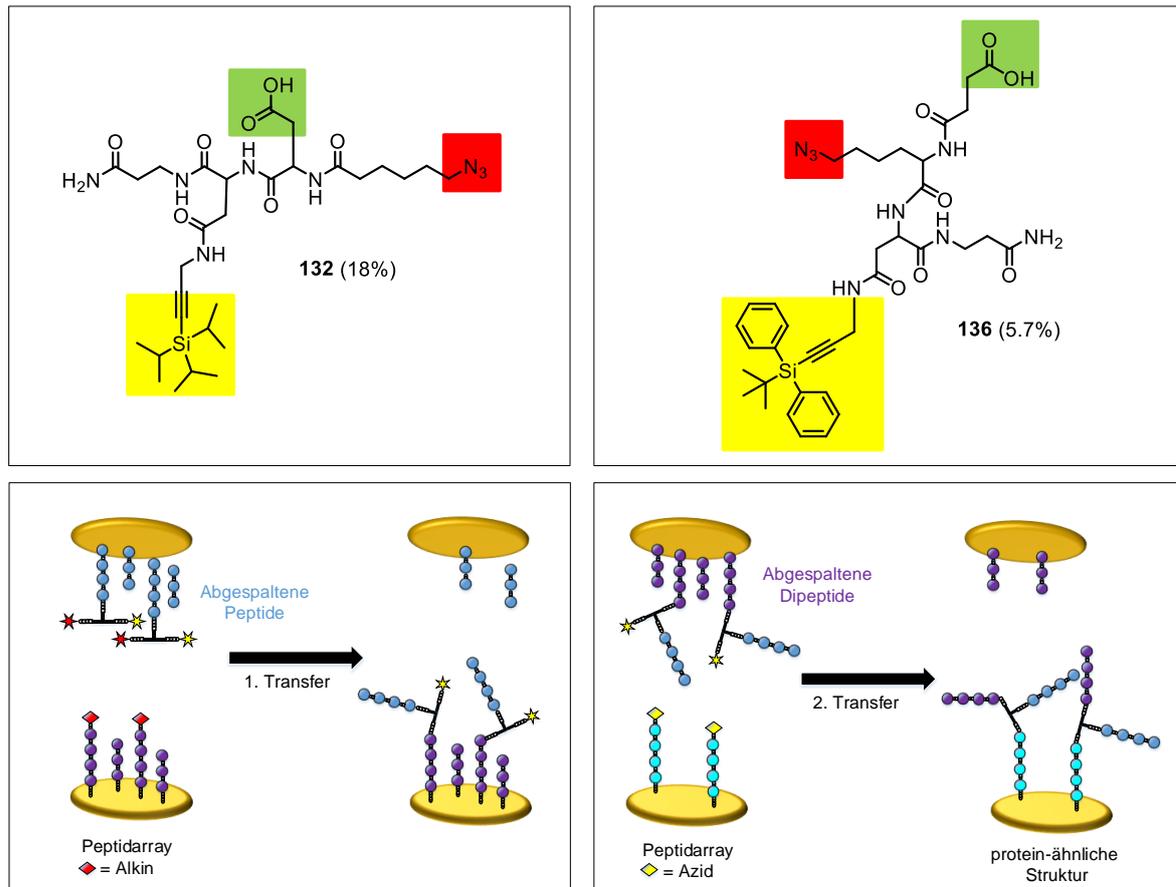
## 4. Zusammenfassung und Ausblick

Arrays mit vielen verschiedenen Peptiden oder Proteinen sind ein wichtiges Werkzeug, um Binder im Hochdurchsatzverfahren zu screenen oder Interaktionen zwischen Peptiden oder Proteinen auf dem Array mit z.B. Serumantikörpern zu untersuchen. Um diese Interaktionen der Proteine bzw. Peptide zu studieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene Methoden für die Generierung oder Modifizierung von Arrays entwickelt.

In dieser Arbeit sollten daher zuerst Arrays von Protein-ähnlichen Strukturen aus *in situ* generierten Peptidarrays hergestellt werden und abschließend die Generierung von Peptoidarrays und Peptidarrays mit Sonderbausteinen, die zur Modifikation der Seitenketten von Peptiden genutzt werden können, mit einer vorhandenen Laser-basierten Methode etabliert werden.

### 4.1. Arrays mit Protein-ähnlichen Strukturen

In der vorliegenden Arbeit konnten Protein-ähnliche Strukturen erfolgreich erzeugt werden. Dazu wurden trifunktionale Linker, die drei verschiedene funktionelle Gruppen (ein Azid, eine Carboxyl-Gruppe und ein geschütztes Alkin) tragen, synthetisiert. (Abbildung 73). Diese Linker ermöglichen es, dass bis zu drei verschiedene Peptide in räumliche Nähe gebracht werden, sodass diese miteinander interagieren können und somit Protein-ähnliche Strukturen nachahmen können. Diese Strukturen wurden erfolgreich an der festen Phase (am Rink-Amid-Harz (32) und an einer Fmoc-NH<sub>2</sub>-βAla-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche) erzeugt und massenspektrometrisch nachgewiesen. Mit Hilfe eines Transferprozesses, der es ermöglicht *in situ* generierte Arrays aufzureinigen, konnten aufgereinigte Arrays von Protein-ähnliche Strukturen durch einen wiederholten Transfer von Peptidarrays zugänglich gemacht werden (Abbildung 73). Durch die Verwendung einer Positionierungseinheit, die die Ausrichtung der Oberflächen bei einem Transfer präzise ermöglicht, sollten in Zukunft hochdichte aufgereinigte Arrays von Protein-ähnlichen Strukturen möglich sein.

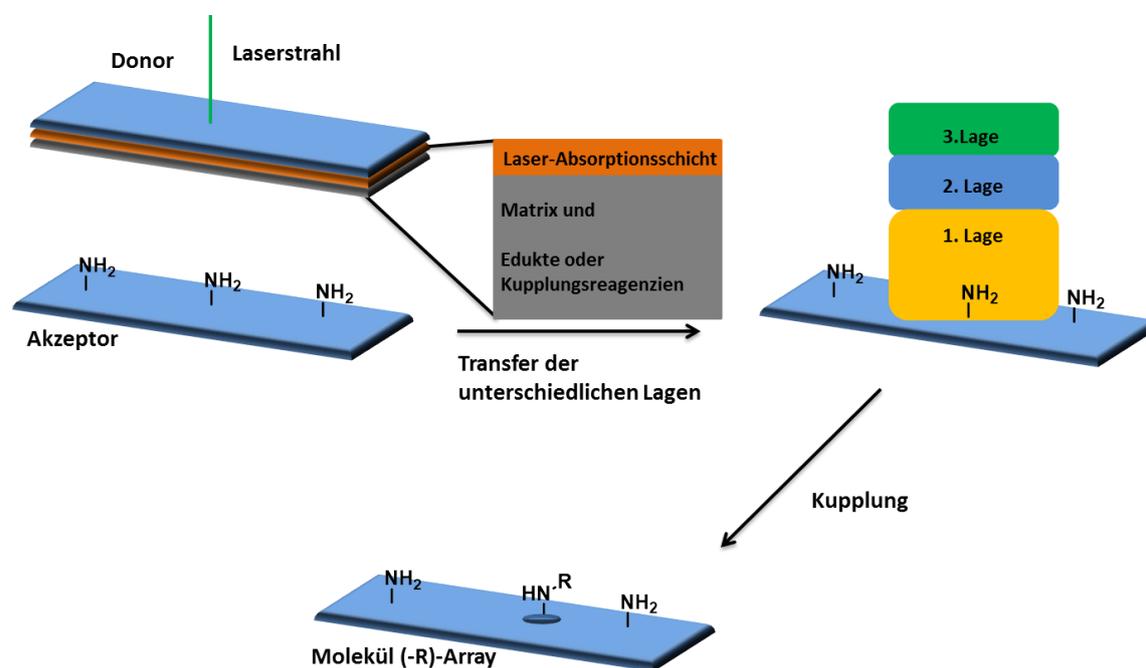


**Abbildung 73:** Dargestellte trifunktionale Linker, zur Erzeugung von aufgereinigten Protein-ähnlichen Strukturen aus *in situ* generierten Peptidarrays mittels eines mehrfachen Transfers.

## 4.2. Generierung von Peptidarrays mit Sonderbausteinen mit einer Laser-basierten Synthesemethode

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die cLIFT-Methode, bei der zuerst ein Aktivester einer Aminosäure, eingebettet in einer Polymermatrix, Laser-transferiert wird und anschließend in einem separaten hitze-induzierten Schritt an die Polymeroberfläche gekuppelt wird, für weitere chemische Reaktionen angewendet werden kann. Dabei ist es gelungen, zahlreiche chemische Stoffe, beispielsweise Monomere (nicht aktivierte Aminosäuren, modifizierte Aminosäuren), Aktivierungsreagenzien (DIC (**6**), PyBOP(**15**)), Basen (Piperidin, DIPEA), Fluorophore, etc., *via* Laserprozess zu

transferieren und abschließend, in einem hitzeinduzierten Schritt, eine Durchmischung der Substanzen und eine chemische Synthese zu ermöglichen (Abbildung 74).



**Abbildung 74:** cLIFT-Methode zur Generierung von Molekülarrays

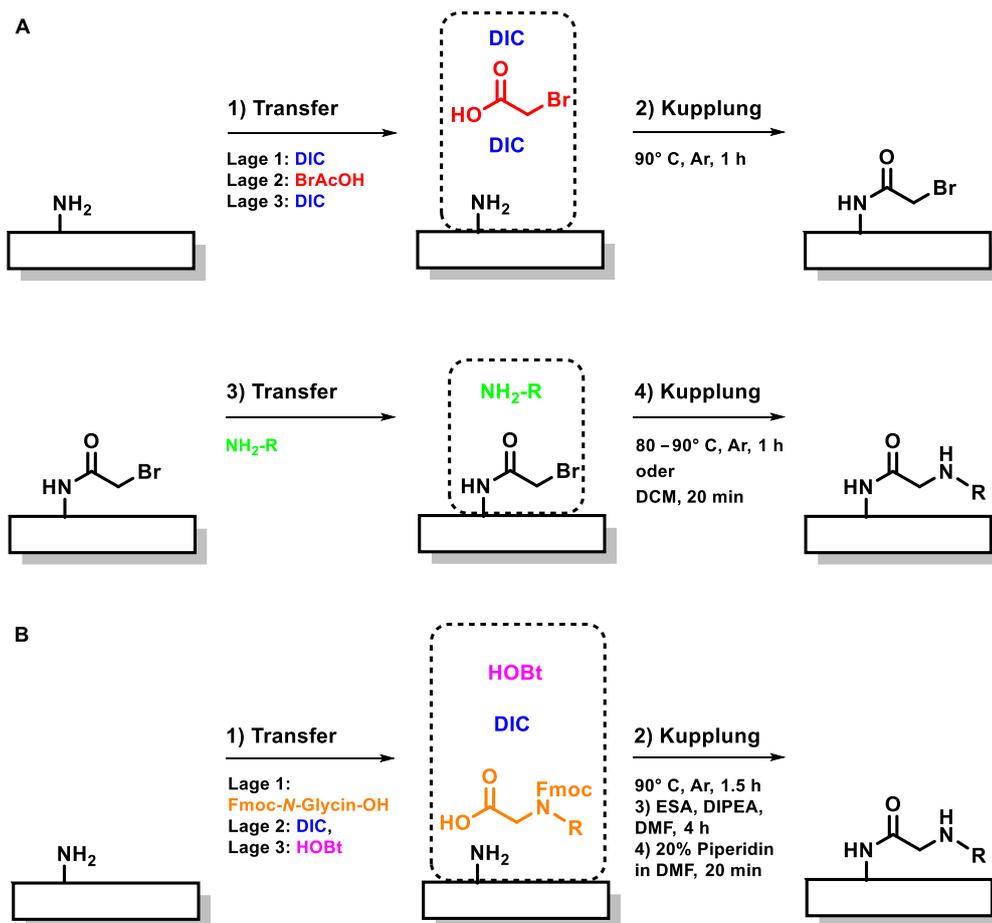
Der Einbau von Aminosäuren unter der Verwendung der Aktivierungsreagenzien PyBOP (**15**), DIC (**6**) und EDC  $\times$  HCl mit guten Kupplungsausbeuten konnte gezeigt werden. Durch die Verwendung von DIC (**6**) konnten sehr kleine Spots mit guten Kupplungsausbeuten generiert werden, sodass in Zukunft möglicherweise Spot-zu-Spot-Distanzen  $\ll 250 \mu\text{m}$  mit hohen Kupplungsausbeuten zugänglich werden. Zudem konnten weitere Reaktionstypen (Isomaleimid/NH<sub>2</sub>-Reaktion, nucleophile Substitution, Knoevenagel-Reaktion, Thiol-in Reaktion und die SPAAC-Reaktion) erfolgreich durchgeführt werden. Durch den Aufbau von Perylen- oder Cumarin-basierten Fluorophoren in einem Peptidarray, ist es nun möglich, Kontrollspots in einem Syntheseschritt gezielt zu detektieren, ohne dabei den Array zu zerstören. Als weitere Detektionsmöglichkeit kann die bildgebende MALDI-Spektrometrie durchgeführt werden. Der Lasertransfer der benötigten MALDI-Matrix ermöglichte ebenfalls den Nachweis einzelner Kontrollspots, die ortsangelöst von einem Photo-Linker abgespalten werden können, ohne den Array zu zerstören.

In Zukunft sollten zahlreiche weitere Reaktionstypen mit der cLIFT-Methode möglich werden. Jedoch ist hierbei die Herausforderung, neben Reaktionsgeschwindigkeiten und

geeigneten Polymermatrices als „festes“ Lösungsmittel, auch die ideale Bestrahlungsdauer und die dazugehörige Laserleistung für die unterschiedlichen Chemikalien zu finden, um hochdichte Arrays mit separaten Spots in guten Ausbeuten zu ermöglichen.

### **4.3. Generierung von Peptoidarrays mit einer Laser-basierten Methode**

Im dritten Teil dieser Arbeit konnte die Synthese von Peptoidarrays mit der Laser-basierten Methode „cLIFT“ etabliert werden. Durch die Verwendung der Submonomer-Methode von Zuckermann (Acylierung und nucleophile Substitution) konnten Peptoidarrays mit Spotdichten von bis zu 1 600 Spots/cm<sup>2</sup> generiert werden (Abbildung 75A). Zahlreiche Peptide wurden synthetisiert und konnten massenspektrometrisch, unter anderem durch die Verwendung von MALDI-MS-Imaging, nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Acylierung entweder durch den Lasertransfer von BrAcOH (**37**) und DIC (**6**) oder durch die Verwendung eines Aktivesters der Bromessigsäure möglich ist. Durch die Verwendung des Aktivesters konnte der cLIFT-Prozess verkürzt werden. Anstatt eines benötigten dreifachen Lasertransfers, ist der einmalige Transfer ausreichend. Zudem sind die beschichteten Donor-Oberflächen lagerfähig und können mehrmals genutzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Amine für die benötigte nucleophile Substitution verwendet werden können. Die Laserparameter und die Syntheseschritte wurden für die verwendeten Edukte optimiert, um Peptoidarrays mit separaten Spots zu generieren.



**Abbildung 75:** Generierung von Peptoidarrays mit der cLIFT-Methode. (A) Submonomer-Methode, (B) Monomer-Methode.

Des Weiteren wurde die Verwendung der Monomer-Methode getestet, um höhere Spotdichten zu ermöglichen, da die Submonomer-Methode auf Grund der verwendeten Edukte keinen kleineren Pitch als 250  $\mu\text{m}$  zuließ (Abbildung 75B).

Die Durchführung wurde hierbei analog zu der in Kapitel 5.3. etablierten Methode für nicht aktivierte Aminosäuren vollzogen. Hierbei konnte ein Fmoc-*N*-substituiertes Glycin durch die Verwendung der Kupplungsreagenzien PyBOP (**15**) oder DIC (**6**) in einen Array eingebaut werden. (Abbildung 75C). Die Optimierung der Methode und der Einbau weiterer Monomerbausteine zum Aufbau von Polypeptiden wurde bereits von Bettina Streit durchgeführt.<sup>[133]</sup> Dabei konnte gezeigt werden, dass Peptoidarrays mit Dichten von größer als 10 000 Spots/cm<sup>2</sup> erreicht werden können.

Letztendlich sind in der Zukunft solche hochdichten Peptoidarrays vielversprechend, um mögliche Binder für Zielproteine zu identifizieren, die eine bessere Löslichkeit oder

## 158 Zusammenfassung und Ausblick

Zellpermeabilität als Peptide besitzen und zudem resistent gegenüber einem enzymatischen Abbau sind. Jedoch ist hierbei die Herausforderung die ideale Bestrahlungsdauer und die dazugehörige Laserleistung für die Amine zu finden.

## 5. Experimenteller Teil

### 5.1. Allgemeines

#### 5.1.1. Analytik und Geräte

##### **Kernresonanzspektroskopie (NMR)**

Die NMR-Spektren wurden auf folgenden Geräten bei Raumtemperatur aufgenommen:  $^1\text{H}$ -NMR: Bruker Avance 500 (500 MHz) von Bruker Corporation (Billerica/USA),  $^{13}\text{C}$ -NMR: Bruker Avance 500 (126 MHz) von Bruker Corporation (Billerica/USA). Als deuterierte Lösungsmittel wurden Produkte der Firma Sigma Aldrich (Steinheim/Deutschland) oder Merck (Darmstadt/Deutschland) verwendet: Chloroform- $d_1$ , Dimethylsulfoxid- $d_6$  und Methanol- $d_4$ . Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  wurden in parts per million (ppm) angegeben. Als Referenz für die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie diente das jeweilige Restprotonensignal folgender Lösungsmittel: Chloroform ( $^1\text{H}$ :  $\delta = 7.26$  ppm,  $^{13}\text{C}$ :  $\delta = 77.16$  ppm), Methanol ( $^1\text{H}$ :  $\delta = 3.31$  ppm,  $^{13}\text{C}$ :  $\delta = 49.0$  ppm) und DMSO ( $^1\text{H}$ :  $\delta = 2.50$  ppm,  $^{13}\text{C}$ :  $\delta = 39.5$  ppm). Folgende Charakterisierung der Signalaufspaltung wurde gewählt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, bs = breites Singulett, m = Multiplett. Die Spektren wurden nach 1. Ordnung ausgewertet und die Kopplungskonstanten  $J$  als Betrag in Hertz (Hz) angegeben. Aromatische Kohlenstoffe wurden mit der Abkürzungen  $\text{C}_{\text{Ar}}$  = Kohlenstoff und Protonen mit  $\text{H}_{\text{Ar}}$  = Proton gekennzeichnet.

##### **Infrarotspektroskopie (IR)**

Die Messung der IR-Spektren wurde mit dem Gerät Bruker Alpha-T durchgeführt. Öle wurden als Film zwischen ATR-Platten und Feststoffe als Diamant-ATR gemessen. Die Bandenintensitäten wurden mit folgenden Abkürzungen charakterisiert: vs = sehr stark (0 – 10% Transmission), s = stark (11 – 40% Transmission), m = mittel

(41 – 70% Transmission), w = schwach (71 – 90% Transmission), vw = sehr schwach (91 – 100% Transmission).

### **High Pressure (Performance) Liquid Chromatography (HPLC)**

Die präparative Aufreinigung der Proben wurde an einem Jasco HPLC System durchgeführt, das mit zwei PU-2087 Pumpen, einem CO-2060 Säulenofen und einem MD-2010 UV-Detektor ausgestattet ist. Es wurde eine präparative C<sub>18</sub>-Säule (Grace Vydac C<sub>18</sub>, 10.0 µm, 250 mm × 20.0 mm von Grace Discovery Sciences) oder (VDSpher C<sub>18</sub>-M-SE, 10.0 µm, 250 mm × 20.0 mm von VDS OPTILAB) verwendet. Die Reinigung erfolgte mit einem Gradienten von A: 5% Acetonitril, 0.1% TFA in Wasser nach B: 95% Acetonitril, 0.1% TFA in Wasser bei einer Flussrate von 15 mL/min in 40 min.

Die Reinheit der Proben wurde an einem analytischen Agilent 1200 HPLC System überprüft, die mit einem G1322A-Entgaser, einer G1311A-Pumpe, G1313A-Autosampler, einem G1316A-Säulenofen und einem G1315B-Dioden-Array Detektor ausgestattet ist. Es wurde eine C<sub>18</sub> Säule (VDSpher C<sub>18</sub>-M-SE, 5.00 µm, 4.00 mm × 250 mm von VDS OPTILAB) oder (PerfectSil Target C<sub>18</sub> (5.00 µm, 4.00 mm × 250 mm von Mz-Analysentechnik) für die analytische HPLC bei Raumtemperatur verwendet. Die Reinigung erfolgte mit einem Gradienten von A: 5% Acetonitril, 0.1% TFA in Wasser nach B: 95% Acetonitril, 0.1% TFA in Wasser bei einer Flussrate von 1.00 mL/min in 30 min.

### **Massenspektrometrie (EI-MS)**

Die Proben wurden mittels EI-MS (Elektronenstoß-Ionisationsmassenspektrometrie) auf dem Gerät Finnigan MAT 90 mit 70.0 eV gemessen. Die Angabe der Molekülfragmente erfolgte als Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ). Relativ zur Intensität des Basissignals (100%) wurde die Intensität der Signale in Prozent angegeben.

### **Massenspektrometrie (ESI-MS)**

Die Proben wurden mittels ESI-MS (Elektronenspray-Ionisationsmassenspektrometrie) auf dem Gerät Agilent 1100 series gemessen. Das Gerät ist ausgestattet mit dem Diodenarray-Detektor (DAD: G1315A) und dem Massendetektor (MSD. G1946A). Die Angabe der Molekülfragmente erfolgte als Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ).

***Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight (MALDI-TOF)***

Die MALDI-Massenspektrometrie für die Synthese der bi- bzw. trifunktionalen Linker wurde auf einem Bruker Biflex IV Spektrometer mit einem Stickstoff-Laser ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ) und der Software FlexControl Version 1.1 und XMASS-XTOF Version 5.1.1 durchgeführt. Das 4800 MALDI-To/ToF Massenspektrometer (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Foster City/CA) des KIT (IFG) in Karlsruhe wurde für die Messung der Protein-ähnlichen Strukturen via Peptidarray-Transfer verwendet. Das Gerät war ausgestattet mit einem Nd:YAG gepulsten Laser (355 nm mit  $< 500 \text{ ps}$  Pulsen und 200 Hz Wiederholungsrate). Die Software 4000 Series Explorer (V 3.5.3) und Data Explorer (V 4.9) wurden genutzt. Das Gerät wurde im positiven Ionenreflektions-Modus betrieben.

Für alle anderen Messungen wurde das Ultraflex<sup>TM</sup> ToF I Instrument (Bruker Daltonik, Bremen/Deutschland) des DKFZ in Heidelberg verwendet, das mit einem Stickstofflaser ausgestattet ist. Die Software FlexControl Version 2.4 und FlexAnalysis Version 2.4 wurden für die Kontrolle des Instruments verwendet. Das Gerät wurde im positiven Ionenreflektions-Modus betrieben.

Als Matrix kam die Universalmatrix der Firma Sigma Aldrich bestehend aus Acetonitril/Wasser (1:1) und 0.1% TFA oder 2,4-Dihydroxybenzoesäure, Acetonitril/Wasser (3:7) und 0.1% TFA zum Einsatz. Die Kristallisation erfolgte an der Luft. Es wurden Bruker-Standard-Probeplatten (Targets) aus Aluminium (386 „spots“) verwendet. Für das protonierte Molekülion wurde die Abkürzung  $[(M+H)^+]$  verwendet.

Für die ortsangelöste MALDI-Spektrometrie wurde eine Ionenquelle (AP-SMALDI10, TransMIT GmbH (Giessen/Deutschland) mit einem Orbital-Trapping-Massenspektrometer (Q Exactive, Thermo Fisher Scientific GmbH Bremen/Deutschland) gekoppelt. Das Massenspektrometer wurde im positiven Ionenmodus bei einer Massenauflösung von 140.000 betrieben. Für die Desorption/Ionisation wurde ein Stickstofflaser ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ) mit einer Wiederholrate von 60 Hz verwendet. Eine Massengenauigkeit  $> 2.00 \text{ ppm}$  konnte erreicht werden.

### **UV Lampe**

Die UV-Lampe UVGL-58, 6.00 W der Firma UVP (Upland/USA) und die UV-Lampe VL-115.L, 15.0 W der Firma Vilber Lourmat GmbH (Eberhardzell/Deutschland) wurden verwendet.

### **Spin Coater**

Der K.L.M Spin Coater der Firma Schaefer (Langen/Deutschland) sowie eine Vakuumpumpe der Firma KNF Neuberger (Freiburg/Deutschland) wurden verwendet.

### **Schüttler**

Es wurden die Schüttler DOS 205 der Firma neoLab (Heidelberg/Deutschland) und Typ WS 10 der Firma Edmund Bühler GmbH (Hechingen/Deutschland) eingesetzt.

### **Analysenwaage**

Es wurde die Analysenwaage AE 240 der Firma Mettler Toledo (Greifensee/Schweiz) verwendet.

### **Ultraschallbad**

Das Ultraschallbad FB15061 der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts/USA) wurde verwendet.

### **Laseraufbau (cLIFT-Methode)<sup>[11]</sup>**

Der Laseraufbau wurde von Tobias Foertsch (IMT/Karlsruhe) konstruiert. Ein Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm (FSDL-532-1000T, 1.00 W; Frankfurt Laser Company, Friedrichsdorf/Deutschland), der mit einem Akustooptischen Modulator rangschiert wurde (1002AF1, Polytec GmbH/Deutschland), wurde verwendet. Zudem wurde ein Laserabtastungs-System (hurrySCAN 10, Scanlab AG, Deutschland), ein Mikroskopietisch (SCANplus 100 x 100, Maerzhaeuser/Germany) und eine Kamera (DCC1645C, Thorlabs Inc./Newton, NJ/USA) mit einer Mikroskopielinse (PLN 4XCY,

Olympus GmbH, Hamburg/Deutschland) verwendet. Laserparameter: Laserleistung: 340 mW (100%) Die Bestrahlungsdauer wurde variiert (0.10 bis 20.0 ms).

### **Transfermaschine** <sup>[57, 100]</sup>

Die verwendeten Transfermaschinen wurden von Sebastian Schillo (IMT/Karlsruhe) konstruiert. Die automatische Transfermaschine besitzt eine 4-dimensionale Verfahrenheit, die aus zwei Lineartischen M-414, einem Hubtisch M-501 und einem Rotationstisch M-060 der Firma Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG (Karlsruhe/Deutschland) besteht. Die pneumatische Linearachse MXQ-12 von SMC Pneumatik GmbH (Egelsbach/Deutschland) besteht aus einem Zylinder mit integrierter Linear-Kugelumlauführung und Schlitten und ermöglicht aufgrund der hohen Führungsgenauigkeit eine präzise Handhabung des eingespannten Peptidarrays.

Für die halb-automatisierte Prozessdurchführung wurde die Maschine mit LABview angesteuert. Diese steuert die pneumatischen und die elektrischen Achsen und die Vakuumgreifer. Für die Überträge wurde über den Zylinderdurchmesser die Kraft bestimmt und diese konstant gehalten. Dafür wurde die Fläche des anzupressenden Syntheseträgers durch wiegen bestimmt und der Druck so eingeregelt, dass bei 5.00 bar eine Kraft von 7.25 N/cm<sup>2</sup> wirkte.

### **Photometer**

Das Spektralphotometer Jenway 7305 der Firma Bibby Scientific Ltd (Staffordshire/UK) und die Küvetten „UV-Cuvette Micro“ der Brand GmbH & Co. KG (Wertheim/Deutschland) wurden verwendet.

### **Waschmaschine**

Für das Waschen, Acetylieren und die Entschützung der funktionalisierten Oberflächen, als Alternative zur Durchführung in einer Petrischale, wurde die Waschmaschine HD PepPASS, konstruiert von Martyna Sedlmayr (IMT/Karlsruhe)<sup>[135]</sup>, verwendet.

### **Fluoreszenzscanner**

Zur Fluoreszenzdetektion wurde der Scanner InnoScan 1100 AL der Firma Innopsys (Carbonne/Frankreich) genutzt. Es wurde mit einer Wellenlänge von 532 nm oder 635 nm und einer Auflösung von 5.00  $\mu\text{m}$  gescannt. Der GenePIX 4000B Microarray Scanner von Molecular Devices (Sunnyvale/USA) wurde für 532 nm und 635 nm verwendet. Die Oberflächen wurden mit einer Auflösung von 5.00  $\mu\text{m}$ , einem Photovervielfacher von 450, und einer Laserleistung von 33% gescannt. Der Odyssey Infrared Imager von LICOR Biosciences (Lincoln/USA) wurde für die Wellenlängen 700 nm bzw. 800 nm genutzt. Es wurde mit einer Auflösung von 21.0  $\mu\text{m}$  und einer Intensität von 3 – 7 gescannt. Die Bilder wurden abschließend mit Image J oder IrfanView bezüglich Kontrast und Helligkeit bearbeitet.

### **XPS-Messungen**

XPS-Charakterisierungen wurden mit einem K-Alpha XPS-Spektrometer von ThermoFisher Scientific (East Grinstead/UK) durchgeführt. Zur Anregung wurde mikrofokussierte, monochromatisierte Al-K $_{\alpha}$ -Röntgenstrahlung benutzt (400  $\mu\text{m}$  Anregungsfleckdurchmesser). Die Aufladung wurde mit Hilfe von Elektronen (8 eV) und niederenergetischen Argon-Ionen kompensiert. Die Datenerfassung und die Auswertung wurden mit der Thermo Advantage Software durchgeführt.<sup>[137]</sup> Die Peakanpassung erfolgte dabei mit einer oder mehreren Voigt-Funktionen. Zur Quantifizierung wurden die Transmissionsfunktion des Analysators, die mittleren freien Weglängen der Photoelektronen sowie die Wirkungsquerschnitte für die Photoionisation nach Scofield berücksichtigt.<sup>[137]</sup> Alle Spektren wurden auf die C1s = 285 eV (C-C, C-H) Photoelektronenlinie referenziert. Die Energieskala wurde über die bekannten Photoelektronenlinien von metallischem Gold, Silber und Kupfer kalibriert. Die experimentelle Unsicherheit beträgt  $\pm 0.20$  eV, der Fehler bei der quantitativen Auswertung liegt innerhalb 10% des Messwertes.

### **Ellipsometrie**

Für die ellipsometrische Schichtdickenbestimmung wurde ein Ellipsometer des Typs M44 von JA Woollam Co. Inc. (Lincoln/USA) verwendet. Der Wellenlängenbereich betrug 280 – 800 nm und als Lichtquelle diente eine polychromatische Xenonlampe. Zur

Berechnung der Schichtdicke wurde das Cauchy-Modell verwendet.<sup>[138]</sup> Zur Bestimmung wurden jeweils drei Messpunkte gemittelt, wobei die Standardabweichung als Fehler angegeben wurde.

### **Konfokale Mikroskopie**

Es wurde das Konfokalmikroskop SP5 von Leica (Wetzlar/Deutschland) verwendet, welches mit einem DMI6000 Mikroskop ausgestattet ist.

### **Reaktionskontrolle**

Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC). Es wurden DC-Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator der Firma Merck (Darmstadt/Deutschland) (Kieselgel 60, F<sub>254</sub>, Schichtdicke: 0.25 mm) verwendet. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlöschung unter UV-Licht bei  $\lambda = 254$  nm und 365 nm oder mit Ninhydrin-Reagenz (0.1% Ninhydrin, 44.9% Ethanol, 5% Essigsäure; Tauchlösung) und anschließender Erwärmung oder durch die Verwendung von 20%iger Kaliumpermanganatlösung in Wasser mit anschließender Erwärmung.

### **Säulenchromatographie**

Die Rohprodukte wurden mittels HPLC oder präparativer Säulenchromatographie in der Variante Flash-Chromatographie gereinigt. Die verwendeten Lösungsmittelgemische wurden volumetrisch abgemessen. Als Säulenmaterial (stationäre Phase) wurde Kieselgel 60 (0.040 × 0.063 mm, 230 – 400 mesh) der Firma Merck (Darmstadt/Deutschland) und Seesand von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim/Deutschland) verwendet.

## 5.1.2. Lösungsmittel, Reagenzien und Syntheseoberflächen

### 5.1.2.1. Komerziell erworbene Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien für die Synthesen wurden von den Firmen abcr (Karlsruhe/Deutschland), Alfa Aesar (Karlsruhe/Deutschland), VWR (Darmstadt/Karlsruhe), Roth (Karlsruhe/Deutschland), Merck (Darmstadt/Deutschland), Iris Biotech (Marktredwitz/Germany), Thermo Fisher Scientific (Schwerte/Deutschland) und Sigma Aldrich (Steinheim/Germany) bezogen und ohne Reinigung direkt zur Synthese eingesetzt. Der Ammoniak (99,99%) wurde von Air Liquide (Düsseldorf/Deutschland) bezogen.

Synthescharze: Es wurde Rink-Amid-Harz der Firma Rapp Polymere (Tübingen/ Deutschland) oder Sigma Aldrich (Steinheim/Germany) mit einer Beladung von 0.41 mmol/g und 0.67 mmol/g verwendet.

MALDI-Matrix: Die Universal-MALDI-Matrix von Honeywell (New Jersey/ USA) wurde verwendet.

Polymer-Matrix: Die Matrix (S-LEC-P LT 7552) wurde von der Firma Sekisui Chemical Co. Ltd. (Osaka/Japan) gekauft. Das Polymer FB1518 wurde von der Firma Dianal America, Inv. (Texas/USA) bezogen und wurde nur für die Thiol/in Chemie verwendet.

Blocking Puffer: Der Blocking Puffer-MB-070 wurde von Rockland (Gilbertsville/USA) gekauft.

Ultrapures Wasser: Ultrapures Wasser wurde mit einem Synergy® Water Purification System, ausgestattet mit einem Synergy Pak 2 von Merck (Darmstadt/Deutschland), generiert.

### 5.1.2.2. Bereitgestellte Chemikalien

Azidopropylamin, mono-Boc-diaminobutan, *tert*-Butyl-dimethylsilyl (TBDMS)-aminoethanol und *tert*-Butyl-Aminobutansäure wurden von Anne Schneider vom Institut für Organische Chemie (KIT, Karlsruhe/Deutschland), Fmoc-Propargylglycin-OPfp von Martin Schlageter vom Institut für Anorganische Chemie (KIT, Karlsruhe/Deutschland), Fmoc-NPhe-OH von Bettina Streit vom Institut für

Mikrostrukturtechnik (KIT, Karlsruhe/Deutschland), Fmoc-Lys(Ferrocen)-OPfp von Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte (Institut für bioanorganische Chemie, Universität Bochum) und die Styrylpyridinium/-pyrylium-Fluorophore wurden von Silviu Balaban vom Campus Scientifique de St Jérôme (Marseille/Frankreich) zur Verfügung gestellt.

#### 5.1.2.3. Antikörper

Der monoklonale Maus Anti-FLAG M2 Antikörper gelabelt mit *DyLight* 800 und Anti-HA Antikörper gelabelt mit *DyLight* 680 wurde von Sigma Aldrich (Steinheim/Deutschland) gekauft. Zudem wurde ungelabelter Anti-HA Antikörper von Sigma Aldrich (Steinheim/Deutschland) gekauft, der anschließend mit einem Lightning-Link® Rapid conjugation KIT von Dr. Ralf Bischoff vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ/Heidelberg) gelabelt wurde.

#### 5.1.2.4. Syntheseoberflächen

10:90 PEGMA-co-MMA Oberflächen, die bereits mit einem Fmoc- $\beta$ -Alanin verestert wurden, wurden von der Firma PEPperPRINT GmbH (Heidelberg/Germany) erworben. Die 100% PEGMA Oberflächen wurden selbst synthetisiert oder von Barbara Ridder (KIT, Karlsruhe/Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Peptidarrays wurden von der Firma PEPperPRINT GmbH (Heidelberg/Germany) gratis zur Verfügung gestellt.

Die Objektträger der Firma Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshafen/Deutschland) wurden verwendet.

### 5.1.3. Präparatives Arbeiten

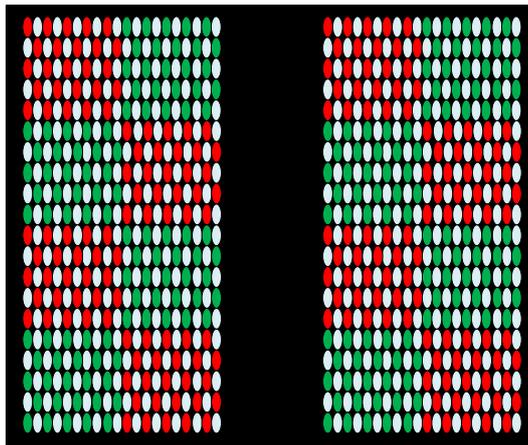
Die verwendeten Flüssigkeiten wurden mit Hilfe von Kunststoffspritzen mit Kanülen oder Pipetten überführt. Die Feststoffe mit Ausnahme des Rink-Amid-Harzes wurden in pulverisierter Form verwendet. Umsetzungen ohne Temperaturangabe wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Zur Reaktionsdurchführung bei 0 °C wurde die Kältemischung Eis/Wasser verwendet und zur Durchführung bei ~ -80 °C Isopropanol/Trockeneis.

### 5.1.4. Festphasenreaktionen

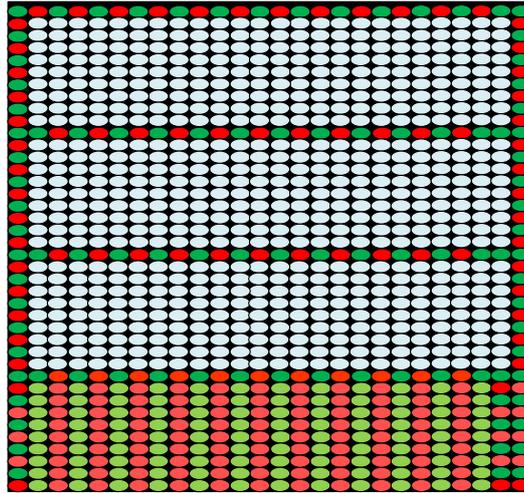
Die Reaktionen wurden in einer Spritze mit Fritte durchgeführt. Bei der Kupplung an Amino-Gruppen wurden noch vorhandene freie Amino-Gruppen mittels Kaiser-Test detektiert (jeweils 3 Tropfen einer Lösung von 40.0 g Phenol in 20.0 mL Ethanol, einer Lösung von 1.00 g Ninhydrin in 20.0 mL Ethanol und einer Lösung von 1.15 g KCN, 1.00 mL in H<sub>2</sub>O und 49.0 mL Pyridin) wurden auf 5 – 10 Beads gegeben, dann 5 min auf 120 °C erwärmt. Im Falle einer intensiven Blaufärbung, die durch die Reaktion von Ninhydrin und einem *N*-terminalen Amin entsteht, kann daraus geschlossen werden, dass die Reaktion nicht quantitativ verlaufen ist. Farblose Beads deklarieren hierbei eine vollständige Umsetzung. Zur Reaktionskontrolle der einzelnen Stufen am Harz wurde teilweise eine Testabspaltung mit wenigen Beads durchgeführt und anschließend massenspektrometrisch verifiziert.

## 5.2. Array-Design

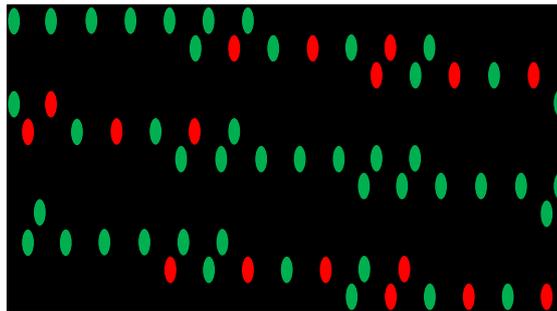
Es wurden fünf verschiedene Array Designs verwendet, die dann von der Firma PEPperPRINT<sup>[46]</sup> synthetisiert wurden. Die Ellipsen stellen hierbei die Spots (Größe: 127 µm × 338.7 µm) dar (Abbildungen 76 – 80).



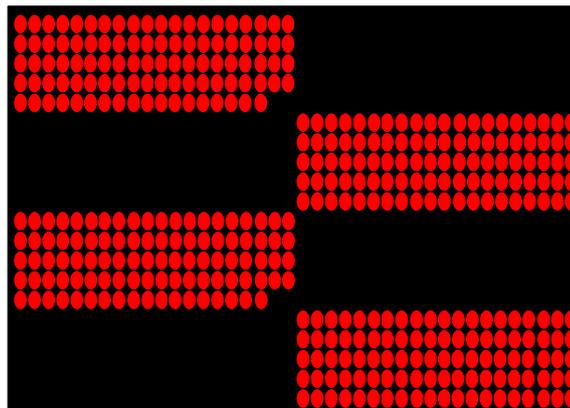
**Abbildung 76:** Design: Array-Layout 1, grün: Spots des FLAG-Epitops und rot: Spots des HA-Epitops; hellblau: Kontrollspots von *N*-terminal acetyliertem HA in den Zwischenräumen der HA-Blöcke und *N*-terminal acetyliertem FLAG in den Zwischenräumen der FLAG-Blöcke.



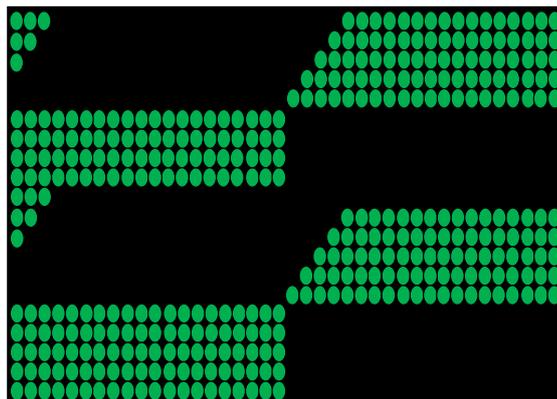
**Abbildung 77:** Design: Array-Layout 2, grün: Spots des FLAG-Epitops; hellgrün: FLAG-Mutation, rot: Spots des HA-Epitops und hellrot: Spots der HA-Mutationen, hellblau: verschiedene Peptidsequenzen (550) teilweise als Doppelspots.



**Abbildung 78:** Design: Array-Layout: 3, grün: Spots des FLAG-Epitops und rot: Spots des HA-Epitops.



**Abbildung 79:** Design: Array Layout 4, rot: Spots des HA-Epitops.



**Abbildung 80:** Design: Array Layout 5, grün: Spots des FLAG-Epitops.

### 5.3. Layouts für die cLIFT-Methode

Die verwendeten Layouts wurden mit Hilfe von MATLAB von Tobias Foertsch<sup>[123]</sup> (IMT) und Bettina Streit<sup>[133]</sup> (IMT) angefertigt (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Laser-Layout.

<b>Laser-Layout</b>	<i>Pitch</i> [mm]	Laserimpuls und Intensität	Reihen (R) und Spalten (C)	Positionen
<b>1</b>	0.100	5.00 ms, 100%	R: 271 C: 771 Blank R: 0 Blank C: 0	A (-38.5 -13.5)
<b>2</b>	1.00	15.0 ms, 100%	R: 17 C: 8 Blank R: 0 Blank C: 0	A und B: (-14.995 -7.334) C und D: (-3.227 -7.334) E und F: (8.379 -7.334)
<b>3</b>	1.00	15.0 ms, 100% 4 Schuss, Abstand 10.0 $\mu\text{m}$ )	R: 17 C: 8 Blank R: 0 Blank C: 0	A und B: (-14.995 -7.384) C und D: (-3.227 -7.384) E und F: (8.379 -7.384)

172 Experimenteller Teil

<b>4</b>	0.250	Gradient y- Achse: 10.0 bis 0.10 ms, 100%	R: 70 C: 10 Blank R: 10 Blank C: 0	A: (-11.625 -10.795) B: (-6.375 -10.795) C: (-1.125 -10.795) D: (4.125 -10.795) E: (9.375-10.795)
<b>5</b>	0.500	1.50 ms, 100%	R: 40 C: 10 Blank R: 0 Blank C: 0	A: (-25 -10) B: (-24.5 -10) C: (-5 -10) D: (-4.5 -10) E: (15 -10) F: (15.5 -10)
<b>6</b>	0.500	10.0 ms, 100%	R: 40 C: 10 Blank R: 0 Blank C: 0	A: (-25 -10) B: (-24.5 -10) C: (-5 -10) D: (-4.5 -10) E: (15 -10) F: (15.5 -10)
<b>7</b>	0.100	5.00 ms, 100%	10 Blöcke	3.80 mm × 20.0 mm.
<b>8</b>	0.500	15.0 ms, 100%	R: 271 C: 771 Blank R: 0 Blank C: 0	A (-25 -10) etc

## 5.4. Allgemeine Arbeitsvorschriften

### 5.4.1. Festphasenreaktionen am Harz

#### AAV 1: Fmoc-Entschützung

Es wurde 1.00 Äquiv. Harz in einer Einwegspritze mit Fritte in DMF (1.00 mL/100 mg Harz) vorgelegt und für 1 h gequollen. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und das Harz wurde  $3 \times 5$  mit 20% Piperidin in DMF (v/v) (1.00 mL/100 mg Harz) geschüttelt. Die Einwegsspritze wurde verschlossen und jeweils für 15 min bei RT geschüttelt. Im Anschluss wurde die Lösung über eine Fritte entfernt und das Harz nacheinander für  $3 \times 30$  s mit DMF und anschließend für  $3 \times 1$  min mit DMF gewaschen.

#### AAV 2: Acetylierung

Es wurde 1.00 Äquiv. Harz in einer Einwegspritze mit Fritte vorgelegt und 10% Essigsäureanhydrid (ESA) und 20% Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (v/v/v) (Gesamtvolumen: 1.00 mL/100 mg Harz) zugegeben und  $2 \times 15$  min bei RT geschüttelt. Im Anschluss wurde die Lösung entfernt und das Harz wurde nacheinander mit DMF/DCM/MeOH/DCM/MeOH/DCM/MeOH jeweils für  $3 \times 30$  s und anschließend  $1 \times 1$  min mit DMF gewaschen.

#### AAV 3: Amidierung

Es wurde 1.00 Äquiv. Harz in einer Einwegspritze mit Fritte in DMF (1.00 mL/100 mg Harz) vorgelegt und nacheinander 2.00 – 3.00 Äquiv. Aminosäure oder Carbonsäure; 6.00 Äquiv. *N*′, *N*′-Dicyclohexylcarbodiimid (DIC) (**6**) und nach 5 min 3.00 Äquiv. Hydroxybenzotriazol (HOBt (**8**)) zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und 4 h – 16 h bei RT geschüttelt. Im Anschluss wurde die Lösung entfernt und das Harz erst  $3 \times 30$  s mit DMF, dann nacheinander mit jeweils DCM/MeOH/DCM/MeOH/DCM/MeOH und anschließend  $1 \times 1$  min mit DMF gewaschen.

#### **AAV 4: Alloc-Entschützung**

Es wurde 1.00 Äquiv. Harz in einem Kolben in trockenem DMF (500 µL/100 mg Harz) vorgelegt und 10 mol% Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>), 3.00 Äquiv. 1,3-Dimethylbarbitursäure in trockenem Tetrahydrofuran (THF)/ DMF (500 µL/100 mg) gegeben und zwei Tage unter Argon bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung entfernt und mit einer Lösung aus 250 mg Diethyldithiocarbamatsäure und 250 µL DIPEA in 50 mL DMF bis zur Farblosigkeit des Filtrats gewaschen. Anschließend wurde 3 × 30 s mit DMF, dann nacheinander mit DCM/MeOH/DCM/MeOH/DCM/MeOH und schließlich 1 × 1 min mit DMF gewaschen.

#### **AAV 5: Click-Reaktion**

Es wurde 1.00 Äquiv. Harz in einer Einwegsspritze mit Fritte in DMF (750 µL/100 mg Harz) vorgelegt und eine Lösung aus 2.50 Äquiv. Kupfer(II)sulfat\*Pentahydrat, 6.00 Äquiv. Natriumascorbat in H<sub>2</sub>O (250 µL/100 mg Harz) und 1.00 Äquiv. Alkin oder Azid zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und bei RT für mind. 16 h geschüttelt. Im Anschluss wurde die Lösung entfernt und das Harz 3 × 30 s mit H<sub>2</sub>O, dann nacheinander mit DCM/MeOH/DCM/MeOH/DCM/MeOH und anschließend 1 × 1 min mit DMF gewaschen.

#### **AAV 6: Silylentschützung**

Es wurde 1.00 Äquiv. Harz in einer Einwegsspritze mit Fritte in THF (1.00 mL/100 mg Harz) für 30 min gequollen. Anschliessend wurde das Lösungsmittel entfernt und 1.00 M TBAF in THF (1.00 mL/100 mg Harz) zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und mind. 30 min bei RT geschüttelt. Im Anschluss wurde die Lösung entfernt und das Harz 3 × 30 s mit THF, dann nacheinander mit DCM/ MeOH/ DCM/ MeOH/ DCM/ MeOH und anschließend 1 min mit DMF gewaschen.

**AAV 7: Acylierung**

Es wurde 1.00 Äquiv. Harz in einer Einwegspritze mit Fritte in DMF (1.00 mL/100 mg Harz) vorgelegt und für 1 h gequollen. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und nacheinander 6.00 Äquiv. einer 1.00 M Lösung von Bromessigsäure (BrAcOH) in DMF und 6.00 Äquiv. DIC (**6**) zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und für 30 min bei RT geschüttelt. Im Anschluss wurde die Lösung entfernt und das Harz nacheinander je 1 min mit jeweils DMF/MeOH/DMF/MeOH/DCM/MeOH/DCM/MeOH und anschließend  $3 \times 1$  min mit DCM gewaschen.

**AAV 8: Nucleophile Substitution**

Es wurde 1.00 Äquiv. Harz in einem Vial oder einer Einwegspritze mit Fritte in DMF (1.00 mL/100 mg Harz) vorgelegt und 1 h gequollen. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und 6.00 Äquiv. einer 1.00 M Lösung des Amins in DMF dazugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und für 30 min bei RT geschüttelt. Im Anschluss wurde die Lösung entfernt und das Harz nacheinander je 1 min mit DMF/MeOH/DMF/MeOH/DCM/MeOH/DCM/MeOH und anschließend  $3 \times 1$  min mit DCM gewaschen.

**AAV 9: Abspaltung vom Harz**

Es wurde 1.00 Äquiv. Harz in einem Kolben in 50% Trifluoressigsäure (TFA), 2.5% (Triisobutylsilan (TIBS)) und 2.5% H<sub>2</sub>O in DCM (v/v/v/v) (1.00 mL/100 mg Harz) vorgelegt. Der Kolben wurde verschlossen und für 2 h, 4 h oder 16 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung mittels einer Einwegspritze mit Fritte entfernt und das Harz nacheinander je 1 min mit jeweils DCM/MeOH/DCM/MeOH/DCM/MeOH gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereint, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und das erhaltene Rohprodukt *via* HPLC gereinigt.

## 5.4.2. Festphasenreaktionen auf einem Objektträger

### AAV 10: Fmoc-Entschützung

#### a) Entschützung (ohne spektrometrische Untersuchung)

Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde in einer Petrischale für 10 min in DMF gequollen. Es wurde 20% Piperidin in DMF (v/v) zugegeben und die Petrischale für 20 min geschüttelt. Anschließend wurde die Oberfläche 3  $\times$  5 min mit DMF, 1  $\times$  2 min mit MeOH und 1  $\times$  1 min mit DCM gewaschen, mit Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon gelagert.

#### b) Entschützung mit dem HD PepPASS

Zunächst wurde die Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche mithilfe einer Halterung in die Synthesekammer des HD PepPASS gegeben. Dann wurde die Oberfläche mit 20% Piperidin in DMF (v/v) für 1 min unter Ultraschallbedingungen und dann 15 min ohne Ultraschall entschützt. Im Anschluss wurde die Oberfläche 1  $\times$  1 min mit Aceton unter Stickstoffbedingungen gewaschen und dann 2  $\times$  1 min unter Ultraschallbedingungen. Die Oberfläche wurde mit Druckluft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon gelagert.

### AAV 11: Acetylierung (Capping)

#### a) Acetylierung in einer Petrischale:

Eine R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde in einer Petrischale zunächst für 10 min in DMF gequollen. Anschließend wurde zu der Oberfläche eine Mischung aus 10% ESA, 20% DIPEA und 70% (v/v/v) DMF in einer Petrischale zugegeben und bei RT in einem Exsikkator für 2 – 16 h inkubiert. Anschließend wurde die Oberfläche 3  $\times$  5 min mit DMF, 1  $\times$  2 min mit MeOH und 1  $\times$  1 min mit DCM gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon gelagert.

#### b) Acetylierung mit dem HD PepPASS

Zunächst wird eine R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche mithilfe einer Halterung in die Synthesekammer des HD PepPASS gegeben. Anschließend wurde die Oberfläche

zuerst mit einer Lösung aus 10% ESA, 20% DIPEA und 70% (v/v/v) DMF für 3 min unter Ultraschallbedingungen acetyliert, die Lösung entfernt und dann unter Verwendung einer frischen Lösung für weitere 15 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Oberfläche  $1 \times 1$  min mit Aceton gewaschen und dann  $2 \times 1$  min mit Ultraschall unter Stickstoff-Atmosphäre. Die Oberfläche wurde mit Druckluft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon gelagert.

#### **AAV 12: Seitenkettenentschützung**

Eine R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde in einer Petrischale zunächst für 10 min in DCM gequollen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und mit einer Lösung aus 51% TFA, 2.5% TIBS, 2% ultrapurem Wasser und 44.5% DCM (v/v/v/v) bei RT hinzugegeben und die Petrischale für  $3 \times 30$  min geschüttelt. Im Anschluss wurde die Oberfläche  $1 \times 5$  min mit DCM,  $1 \times 5$  min mit DMF,  $1 \times 30$  min mit 5% DIPEA in DMF,  $3 \times 5$  min mit DMF,  $1 \times 2$  min mit MeOH und  $1 \times 1$  min mit DCM gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon gelagert.

#### **AAV 13: Bildung einer Amidbindung**

Eine R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde in einer Petrischale in einem Exsikkator unter Schutzgasatmosphäre mit einer 50.0 mM, 100 mM, oder 200 mM Lösung aus 1.00 Äquiv. Carbonsäure oder Aminosäure und 1.00 Äquiv. DIC (**6**) in DMF versetzt und nach 5 min mit 1.00 Äquiv. HOBt (**8**) versetzt und für 4 oder 16 h inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Oberfläche  $3 \times 5$  min mit DMF,  $1 \times 2$  min mit MeOH und  $1 \times 1$  min mit DCM gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon gelagert.

#### **AAV 14: Sandwichmethode**

Auf eine R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche, die in die Mitte einer Petrischale gelegt wurde, wurde 250  $\mu$ l der Reaktionslösung pipettiert und eine zweite R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche mit der funktionalisierten Seite vorsichtig daraufgelegt, sodass sich die Reaktionslösung ohne Luftblasen zwischen den beiden Oberflächen befindet. Nach der abgeschlossenen Reaktion wurden die Oberflächen

vorsichtig durch die Zugabe von etwas Lösungsmittel und der Hilfe einer Zange getrennt. Anschließend wurde  $3 \times 5$  min mit DMF,  $1 \times 2$  min mit MeOH und  $1 \times 1$  min mit DCM gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Argon gelagert.

#### **AAV15: Abspaltung einer Silyl-Schutzgruppe**

Auf eine R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde in einer Petrischale in einem Exsikkator unter Schutzgasatmosphäre 1.00 mL einer 1.00 M TBAF Lösung in THF pipettiert und 15 min inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Oberfläche  $1 \times 5$  min mit THF,  $3 \times 5$  min mit DMF,  $1 \times 2$  min mit MeOH und  $1 \times 1$  min mit DCM gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Argon gelagert.

#### **AAV 16: Click-Chemie**

Auf eine azidierte oder alkinierte R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche in einer Petrischale in einem Exsikkator unter Schutzgasatmosphäre wurden 250  $\mu\text{L}$  einer 50.0 mM Reaktionslösung aus: Azid oder Alkin (1.00 Äquiv.) oder TAMRA-Azid (2.00  $\mu\text{L}$  von 1.00 mg/mL in DMF), Natriumascorbat (3.00 Äquiv.),  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  (2.00 Äquiv.) in DMSO und  $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) pipettiert und ein zweiter Objektträger vorsichtig darauf plaziert. Der Exsikkator wurde verschlossen und unter Lichtausschluss für 16 h unter Argon stehen gelassen. Die Oberflächen wurden getrennt und  $1 \times 5$  min mit  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $3 \times 5$  min mit DMF,  $1 \times 2$  min mit MeOH und  $1 \times 1$  min mit DCM gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Argon gelagert.

#### **AAV 17: Fluorophor-Inkubation**

a) *Fluorophor*: Eine funktionalisierte R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde mit einer 200 mM TAMRA-NHS (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in DMF), *DyLight* 680-NHS (1.00 mg/mL in DMF) oder *DyLight* 650-NHS (1.00 mg/mL in DMF) Lösung in DMF mit einer Verdünnung von 1 : 10 000 oder 1 : 20 000 in PBS-T für 2 h auf dem Kippschüttler unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss wird  $1 \times 5$  min mit PBS-T,  $1 \times 2$  min  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $1 \times 5$  min DMF,  $2 \times 5$  min EE,  $1 \times 2$  min MeOH und 1 min mit DCM gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zum Fluoreszenzscan bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Argon gelagert.

*b) Fluorophor markierte Streptavidinfärbung:* Eine R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde für 10 min in PBS-T bei RT gequollen. Anschließend wurde mit Rockland Blocking-Puffer (RL) für 30 min inkubiert und 1 min mit PBS-T gewaschen. Eine R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde mit mit 1.00  $\mu$ L einer 1.00 mg/mL konzentrierten Streptavidin-*DyLight* 700 Lösung in 10.0 mL PBS-T und 10.0  $\mu$ L Rockland Puffer unter Lichtausschluss für 2h inkubiert. Dann wurde  $5 \times 5$  min mit PBS-T gewaschen, die Puffersalze vorsichtig mit Wasser entfernt und mit Argon getrocknet. Bis zur Analyse mit einem Fluoreszenzscanner wurden die Träger unter Argon und Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

### **AAV 18: Antikörper-Inkubation**

*a) Anti-HA and Anti-FLAG Inkubation:* Eine R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde für 10 min in PBS-T bei RT gequollen. Anschließend wurde mit Rockland Blocking-Puffer (RL) für 30 min inkubiert und 1 min mit PBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde die Oberfläche mit einer 1:1000 Verdünnung von einer 100  $\mu$ g/mL des Antikörpers (Monoklonaler Maus Anti-HA (12CA5) IgG Antikörper markiert mit *DyLight* 680 und Anti-FLAG M2 markiert mit *DyLight* 800) in einer 10% RL-Lösung in PBS-T (v/v) für 1 h inkubiert. Dann wurde  $5 \times 1$  min mit PBS-T gewaschen, mit dest. Wasser gespült, mit Argon getrocknet und bis zum Fluoreszenzscan bei 4 °C unter Argon gelagert.

*b) Serum-Inkubation<sup>[5c]</sup>:* Eine R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde für 10 min in PBS-T bei RT gequollen. Anschließend wurde mit Rockland Blocking-Puffer (RL) für 30 min inkubiert und 1 min mit PBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde die Oberfläche mit einer 1:500 Verdünnung von einer 1.00 mg/mL des Serums in einer 10% RL-Lösung in PBS-T (v/v) für 16 h inkubiert. Dann wurde  $2 \times 1$  min mit PBS-T gewaschen und mit einer 1:1000 Verdünnung von einer 100  $\mu$ g/ mL des Antikörpers (Ziege Anti-Human IgG (H+L) Antikörper gelabelt mit *DyLight* 680) für 1 h inkubiert. Anschließend wurde  $5 \times 1$  min mit PBS-T gewaschen, mit dest. Wasser gespült, mit Argon getrocknet und bis zum Fluoreszenzscan bei 4 °C unter Argon gelagert.

**AAV 19: Abspaltung von Peptiden mit NH<sub>3</sub><sup>[100]</sup>**

Die R-NH-βAla-PEGMA-co-MMA Oberfläche oder der Array wurden in einer Petrischale trocken in einen Exsikkator mit zwei Abgängen gelegt. An einem der Abgänge wurde eine Kautschukblase als Gasreservoir luftdicht angeschlossen. Die Blase und der Exsikkator wurden evakuiert und Ammoniakgas eingeleitet, sodass die Blase leicht gefüllt war. Die Träger wurden bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Exsikkator vorsichtig geöffnet, um das Ammoniakgas entweichen zu lassen. Dann wurde der Träger für 10 min unter Vakuum vom restlichen Ammoniak befreit und bis zur weiteren Verwendung unter Schutzgas bei 4 °C gelagert. (Bei der Verwendung von 100% PEGMA Arrays wurde die Oberfläche mit 1 × 1 min DMF gewaschen. Das DMF wurde durch anschließendes Waschen mit MeOH entfernt und der Träger unter Argon getrocknet).

**AAV 20: Abspaltung der Moleküle vom Rink-Amid-Linker**

a) *Lösung*: Eine R-NH-βAla-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde trocken in eine Petrischale gelegt und mit 1.00 mL DCM für 10 min gequollen. Dann wurde das DCM entfernt und 1.00 mL 92% TFA, 3% DCM, 2.5% TIBS, 2.5% H<sub>2</sub>O (v/v/v/v) darauf pipettiert und die Petrischale geschlossen. Nach 15 min wurden erneut ca. 500 μL der Mischung darauf pipettiert und solange die Petrischale offenstehen gelassen, bis die Oberfläche fast vollständig trocken war. Die Oberfläche wurde abwechselnd mit etwas Methanol und DCM gewaschen, indem das Lösungsmittel nur auf die Oberfläche pipettiert wurde und nicht in die Petrischale. Die Waschlösungen wurden gesammelt und die Lösungsmittel wurden unter reduziertem Druck vom Rohprodukt entfernt.

b) *Dampf*: Eine R-NH-βAla-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde trocken unter eine Glaskammer (Durchmesser = 10 cm) gelegt, in der sich eine kleine Petrischale (3.00 cm); gefüllt mit TFA befand. Nach 2 – 15 min wurde die Oberfläche in einen Exsikkator gelegt und für 2 min unter reduziertem Druck das TFA entfernt.

**AAV 21: Abspaltung der Moleküle vom Photo-Linker**

Eine R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde trocken in eine Petrischale gelegt und bei 365 nm mit einer 15.0 W UV-Lampe für 30 min belichtet (Abstand zur Lampe ca. 2.00 cm).

**AAV 22: Peptidarray-Transfer<sup>[57, 100]</sup>**

a) *via CuAAC*: Der R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Array (R = Alkin), der die abgespaltenen Peptide trägt, und die R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche (R = Azid) wurden in der Transfermaschine übereinander auf einer Silikondichtung positioniert. Anschließend wurde der obere Vakuumgreifer vorsichtig heruntergefahren und beide Vakuumgreifer eingeschaltet. Der Syntheseträger wurde angehoben und 250  $\mu$ L der gefilterten Lösung (25.0 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 30.0 mg Natriumascorbat in 1.00 mL DMSO und 1.00 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , wenn nicht anders angegeben) auf die Mitte der Oberfläche pipettiert. Die Oberflächen wurden in Kontakt gebracht und durch eine Kraft von 7.25 N für die Dauer des Übertrags (6 h bis 16 h) aufeinandergepresst. Danach wird der Druck entfernt und das System für 20 s relaxiert. Die Träger wurden pneumatisch mit einer Kraft von 1.50 N/cm<sup>2</sup> getrennt und der Zielträger entnommen. Der Zielträger wurde sofort gründlich hintereinander 3  $\times$  10 s gründlich mit  $\text{H}_2\text{O}$  und Methanol gespült. Der Zielträger und der Syntheseträger werden in getrennten Petrischalen für 1  $\times$  5min mit  $\text{H}_2\text{O}$  und mit 3  $\times$  5 min DMF, 1  $\times$  2 min MeOH und 1  $\times$  1 min DCM gewaschen, mit Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon gelagert.

b) *via SPACC*: Der R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Array (R = Cyclooctin), der die abgespaltenen Peptide trägt, und die R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche (R = Azid) wurden in der Transfermaschine übereinander auf einer Silikondichtung positioniert. Anschließend wurde der obere Vakuumgreifer vorsichtig heruntergefahren und beide Vakuumgreifer eingeschaltet. Der Syntheseträger wird angehoben und 250  $\mu$ L PBS-T auf die Mitte der Oberfläche pipettiert. Die Oberflächen werden in Kontakt gebracht und durch eine Kraft von 7.25 N für die Dauer des Übertrages (6 h) aufeinandergepresst. Danach wird der Druck entfernt und das System für 20 s relaxiert. Die Träger werden pneumatisch mit einer Kraft von 1.50 N/cm<sup>2</sup> getrennt und der Zielträger entnommen. Der Zielträger wird sofort gründlich nacheinander 3  $\times$  10 s mit  $\text{H}_2\text{O}$  und Methanol gespült. Der Zielträger und der Syntheseträger wurden in getrennten Petrischalen

für  $1 \times 5$  min mit  $\text{H}_2\text{O}$  und  $3 \times 5$  min mit DMF,  $1 \times 2$  min mit MeOH und  $1 \times 1$  min mit DCM gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  unter Argon gelagert.

c) *via Amidbindung mit voraktivierter Säure*: Der R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Array (R = Amin), der die abgespaltenen Peptide trägt, und die R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche (R = OPfp-aktivierte Säure) wurden in der Transfermaschine übereinander auf einer Silikondichtung positioniert. Anschließend wurde der obere Vakuumgreifer vorsichtig angefahren und beide Vakuumgreifer eingeschaltet. Der Syntheseträger wurde angehoben und  $250\ \mu\text{L}$  DMF auf die Mitte der Oberfläche pipettiert. Die Oberflächen wurden in Kontakt gebracht und durch eine Kraft von  $7.25\ \text{N}$  für die Dauer des Übertrages ( $2\ \text{h}$ ) aufeinandergepresst. Danach wurde der Druck entfernt und das System für  $20\ \text{s}$  relaxiert. Die Träger werden pneumatisch mit einer Kraft von  $1.50\ \text{N}/\text{cm}^2$  getrennt und der Zielträger entnommen. Der Zielträger wurde sofort nacheinander  $3 \times 10\ \text{s}$  gründlich mit  $\text{H}_2\text{O}$  und Methanol gespült. Der Zielträger und der Syntheseträger wurden in getrennten Petrischalen für  $1 \times 5$  min mit  $\text{H}_2\text{O}$  und  $3 \times 5$  min mit DMF,  $1 \times 2$  min mit MeOH und  $1 \times 1$  min mit DCM gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  unter Argon gelagert.

d) *via Amidbindung*: Der R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Array (R = Amin), der die abgespaltenen Peptide trägt, und die R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche (R = Carbonsäure) wurden in der Transfermaschine übereinander auf einer Silikondichtung positioniert. Anschließend wurde der obere Vakuumgreifer vorsichtig angefahren und beide Vakuumgreifer eingeschaltet. Der Syntheseträger wurde angehoben und  $250\ \mu\text{L}$  der Lösung (DIC (6) ( $25.2\ \text{mg}/\text{mL}$ ) in DMF) auf die Mitte der Oberfläche pipettiert. Die Oberflächen wurden in Kontakt gebracht und durch eine Kraft von  $7.25\ \text{N}$  für die Dauer des Übertrages ( $2\ \text{h}$ ) aufeinandergepresst. Danach wurde der Druck entfernt und das System für  $20\ \text{s}$  relaxiert. Die Träger werden pneumatisch mit einer Kraft von  $1.50\ \text{N}/\text{cm}^2$  getrennt und der Zielträger entnommen. Der Zielträger wurden sofort gründlich nacheinander  $3 \times 10\ \text{s}$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  und Methanol gespült. Der Zielträger und der Syntheseträger wurden in getrennten Petrischalen für  $1 \times 5$  min mit  $\text{H}_2\text{O}$  und  $3 \times 5$  min mit DMF,  $1 \times 2$  min mit MeOH und  $1 \times 1$  min mit DCM gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  unter Argon gelagert.

e) *via Thioetherbindung*: Der R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Array (R = Thiol), der die abgespaltenen Peptide trägt, und die R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche (R = Maleimid) in der Transfermaschine übereinander auf einer Silikondichtung positioniert. Anschließend wurde der obere Vakuumgreifer vorsichtig angefahren und beide Vakuumgreifer eingeschaltet. Der Syntheseträger wurde angehoben und 250  $\mu$ L PBS-T auf die Mitte der Oberfläche pipettiert. Die Oberflächen wurden in Kontakt gebracht und durch eine Kraft von 7.25 N für die Dauer des Übertrages (1 h) aufeinandergepresst. Danach wurde der Druck entfernt und das System 20 s relaxiert. Die Träger wurden pneumatisch mit einer Kraft von 1.50 N/cm<sup>2</sup> getrennt und der Zielträger entnommen. Der Zielträger wurde sofort gründlich nacheinander  $3 \times 10$  s gründlich mit H<sub>2</sub>O und Methanol gespült. Der Zielträger und der Syntheseträger wurden in getrennten Petrischalen für  $1 \times 5$  min mit H<sub>2</sub>O und  $3 \times 5$  min mit DMF,  $1 \times 2$  min mit MeOH und  $1 \times 1$  min mit DCM gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon gelagert.

### AAV 23: Bestimmung der Oberflächenbeladung spektrometrisch<sup>[10]</sup>

Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde trocken in eine Petrischale gelegt, 1.00 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) auf die Oberfläche pipettiert und die Petrischale geschlossen. Nach 20 min wurde die Lösung von der Oberfläche mit Hilfe einer Pipette in eine Küvette überführt (die Reaktionslösung durfte hierbei nicht in die Petrischale gelangen) und die Absorption gemessen. Die Absorption einer 20% Piperidin Lösung in DMF (v/v) wurde zuvor als Nullwert bestimmt. Mit Hilfe des Lambert Beerschen Gesetzes wurde die Beladung der Oberfläche bestimmt. Zuletzt wurde die Oberfläche  $3 \times 5$  min mit DMF,  $1 \times 2$  min mit MeOH und  $1 \times 1$  min mit DCM gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon gelagert.

$$\text{Beladung (nmol/cm}^2\text{)} = \frac{(EV \times 10^6)}{d\varepsilon A}$$

A = Fläche [cm<sup>2</sup>]: 19.76; V = Volumen [mL]; E = gemessene Extinktion;  $\varepsilon$  = molarer Absorptionskoeffizient [Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>]: 5129; d = Distanz [cm]: 1.00.

***cLIFT-Methode*****AAV 24: Vorbereitung der Donor-Oberflächen**

Zu Beginn wurden Standard-Mikroskopieobjektträger mit einer selbstklebenden Polyimid-Folie (Kapton, DuPont/USA; cmc Klebetechnik GmbH (Frankenthal/Germany) bevorzugt im Reinraum oder im Labor bei RT möglichst planar beklebt. Die Kapton-Oberflächen wurden mit Hilfe eines Spin Coaters mit einer Mischung aus einer Polymermatrix und ein beliebiges Reagenz beschichtet. Dazu wurde der Objektträger auf einem Drehteller (Chuck) befestigt und für 45 s bei einer Drehzahl von 80.0 rps beschichtet, indem eine Lösung aus Matrixmaterial und 1.00 – 4.00 Äquiv. Reagenz in 1.00 mL DCM zu Beginn auf die Mitte der Oberfläche pipettiert wurde. Hierbei entspricht 1.00 Äquiv. Reagenz einer Stoffmenge von  $n = 5.72 \times 10^{-5}$  mol. Die Menge der Matrix wurde so gewählt, dass die Massen der Aminosäure und des Matrixmaterials zusammen 150 mg ergeben. Bei der Verwendung von Aminosäure-Aktivester wurden 135 mg Matrix und 15.0 mg Aminosäure verwendet.<sup>[11]</sup> Reagenzien, die sich schlecht in DCM lösen, wurden mit 15.0  $\mu$ L – 50.0  $\mu$ L DMF gelöst und dann mit dem gelösten Matrixmaterial gemischt. Bei der Verwendung von flüssigen Reagenzien wurde der Donor für 15 – 20 min unter Vakuum getrocknet.

**AAV 25: cLIFT und Kupplung eines Moleküls**

Für den Transfer mittels cLIFT wurde die R-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit der funktionalisierten Seite nach oben zeigend in die dafür vorgesehene Vorrichtung des Aufbaus geklemmt. Die erste Donor-Oberfläche, die ein beliebiges Molekül (Moleküle), eingebettet in Matrixmaterial, trägt, wurde mit der beschichteten Seite nach unten zeigend auf die Akzeptor-Oberfläche gelegt und das gewünschte Muster per Computerbefehl gelasert. Als nächstes wird der Donor aus der Vorrichtung genommen, ohne dabei die Akzeptor-Oberfläche zu bewegen. Als eine Alternative kann der Akzeptor mit einem Laser markiert werden, um anschließend genau auf dieselbe Stelle das Material zu transferieren. Die Markierungen wurden wie in der Literatur beschrieben durchgeführt.<sup>[11]</sup> Der Vorgang kann für eine zweite Donor-Oberfläche bzw. zahlreiche Donor-Oberflächen wiederholt werden. Die Anknüpfung des Moleküls erfolgt bei ca. 90 °C – 140 °C für 30 min – 1 Tag im Ofen unter Argon. Anschließend wurde die Oberfläche im Ultraschallbad gewaschen. Wenn nicht anders beschrieben, wurde die Oberfläche kräftig mit einem Aceton-Strahl

gespült, um eine Kontamination zu vermeiden. Anschließend wurde die Oberfläche mit  $5 \times 30$  s Aceton im Ultraschallbad gewaschen, mit Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Argon gelagert. Als eine Alternative wurden die Oberflächen mit dem HD PepPASS gewaschen werden. Die Oberflächen wurden zunächst in einer Halterung in der Synthesekammer der HD PepPASS befestigt. Anschließend wurde die Oberfläche  $2 \times 2$  min mit Aceton unter Ultraschallbedingungen und  $1 \times 1$  min mit MeOH unter Ultraschallbedingungen unter Stickstoff gewaschen. Abschließend wurde die Oberfläche mit Druckluft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Argon gelagert.

### **AAV 26: Acylierung (Submonomer-Methode) mittels cLIFT**

1) Die zuvor entschützte und mit Markierungen<sup>[11]</sup> versehen,  $\text{NH}_2$ - $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurde mit der funktionalisierten Seite nach oben zeigend in die dafür vorgesehen Vorrichtung der cLIFT-Maschine gelegt.

a) *Aktivester*: Der Donor mit 1.00 Äquiv. Aktivester wurde mit der beschichteten Seite nach unten zeigend auf die Akzeptor-Oberfläche gelegt und das gewünschte Muster per Computerbefehl gelasert. Als nächstes wurde der Aminosäure-Donor aus der Vorrichtung genommen, ohne dabei die Akzeptor-Oberfläche zu bewegen. Anschließend wurde die Donor-Oberfläche durch DIC (**6**) ersetzt und erneut gelasert.

b) *DIC (6), BrAcOH (37), DIC (6)*: Der Donor mit DIC (**6**) wurde mit der beschichteten Seite nach unten zeigend auf die Akzeptor-Oberfläche gelegt und das gewünschte Muster per Computerbefehl gelasert. Die Donor-Oberfläche wurde aus der Vorrichtung genommen, ohne dabei die Akzeptor-Oberfläche zu bewegen. Anschließend wurde die Donor-Oberfläche erst durch den *BrAcOH (37)*-Donor und dann durch einen frischen DIC-Donor ersetzt und nacheinander gelasert.

oder c) *BrAcOH (37), DIC (6)*: Der Donor mit *BrAcOH (37)* wurde mit der beschichteten Seite nach unten zeigend auf die Akzeptor-Oberfläche gelegt und das gewünschte Muster per Computerbefehl gelasert. Der Donor-Oberfläche wurde aus der Vorrichtung genommen, ohne dabei die Akzeptor-Oberfläche zu bewegen. Anschließend wurde die Donor-Oberfläche durch einen DIC (**6**)-beschichteten Donor ersetzt und erneut gelasert.

2) Die Akzeptor-Oberfläche wurde in eine Kupplungskammer gelegt und unter Argon bei ca.  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 60 min im Ofen gekuppelt oder alternativ für 20 min in einer

DCM-Atmosphäre behandelt. Die Oberfläche wurde im Ultraschallbad gewaschen. Zuletzt wurde die Oberfläche kräftig mit einem DCM-Strahl gespült und abschließend mit  $3 \times 30$  s DCM,  $1 \times 30$  s mit DMA und  $2 \times 30$  s mit DCM im Ultraschallbad gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $4^\circ\text{C}$  unter Argon gelagert.

#### **AAV 27: Nucleophile Substitution (Submonomer-Methode)**

Die BrAc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde in die cLIFT Maschine gelegt. Der beschichtete Donor (Amin und Matrix) wurde mit der beschichteten Seite nach unten zeigend auf die Akzeptor-Oberfläche gelegt und das gewünschte Muster per Computerbefehl gelasert. Die Akzeptor-Oberfläche wurde in eine Kupplungskammer gelegt und unter Argon ca.  $80 - 90^\circ\text{C}$  für 60 min im Ofen gekuppelt oder als eine Alternative wurde in 20 min in einer DCM-Atmosphäre gekuppelt. Zuletzt wurde die Oberfläche im Ultraschallbad gewaschen. Die Oberfläche wurde kräftig mit einem DCM-Strahl gespült und anschließend  $3 \times 30$  s mit DCM,  $1 \times 30$  s mit DMA,  $2 \times 30$  s mit DCM im Ultraschallbad,  $3 \times 5$  min mit DMF,  $1 \times 2$  min mit MeOH und  $1 \times 1$  min mit DCM gewaschen, unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $4^\circ\text{C}$  unter Argon gelagert.

#### **AAV 28: Silanisierung mit APTES** [100, 102, 111]

Die Glasträger (Objektträger) wurde in einer Petrischale für 4 h in einer 1.00 M Lösung von Kaliumhydroxid in Isopropanol geschüttelt. Ein Siliziumwafer wurde in einer Petrischale mit 30% Wasserstoffperoxid in Schwefelsäure (v/v) (Caro'sche Säure) für 45 min geschüttelt. Die Oberflächen wurden dann gründlich mit destilliertem Wasser, entionisiertem Wasser und Ethanol gewaschen, im Luftstrom getrocknet und mit der entsprechenden Silanlösung direkt umgesetzt. Dazu wurden die Glasträger in einer Petrischale in einem Exsikkator unter Schutzgasatmosphäre mit einer Mischung aus 2.40 % Millipore-gefiltertem Wasser und 2.90 % Aminopropyl(triethoxy)silan (APTES) in Ethanol (v/v/v) übergossen und über Nacht inkubiert. Die Reaktionslösung wurde  $5 \times 1$  min in Ethanol in einem Ultraschallbad entfernt. Um die Kondensationsreaktion abzuschließen, wurden die Träger 45 min bei  $120^\circ\text{C}$  im Ofen erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die mit APTES funktionalisierten Oberflächen werden in einem Exsikkator unter Schutzgas vorgelegt.

Für die Funktionalisierung wurde Bromoisobutyrylbromid (100  $\mu\text{M}$ ) im Gegenstrom in eine Lösung von DIPEA (600  $\mu\text{M}$ ) und gekühltes DCM in einen Kolben bei 0 °C getropft und nach kurzem Rühren wurde die Lösung direkt auf die APTES-funktionalisierten Oberflächen gegeben und über Nacht inkubiert. Die Oberflächen wurden dann  $2 \times 3$  min mit DCM und  $2 \times 2$  min mit MeOH gewaschen, im Luftstrom getrocknet und bis zur weiteren Umsetzung bei 4 °C unter Argon gelagert.

### **AAV 29: Synthese von 100% PEGMA Oberflächen<sup>[100]</sup>**

Die silansierten Oberflächen wurden in einem Exsikkator unter Schutzgas vorgelegt. In einem Schlenkkolben wurden nach dreimaligem Evakuieren und Beschicken mit Argon je 10.0 mL PEGMA, 10.0 mL MilliPore-gefiltertes Wasser und 10.0 mL MeOH unter Gegenstrom zugegeben. Anschließend wurde im Gegenstrom 280 mg 2,2'-Bipyridin zugegeben und die Lösung gerührt, bis dieses vollständig gelöst war. Nun wurden 128 mg Kupferbromid, ebenfalls im Gegenstrom zugegeben. Nach 5 min Rühren wurde die Lösung ebenfalls im Gegenstrom auf die zu funktionalisierenden Oberflächen gegossen und über Nacht stehen gelassen. Auf diese Weise wurden Synthesefilme im Bereich von 70 – 120 nm erhalten.<sup>[100]</sup> Die Filmdicke lässt sich durch die Inkubationsdauer verringern oder erhöhen. Nach beendeter Reaktion wurden die Träger mit destilliertem Wasser abgespült,  $3 \times 5$  min mit Wasser und  $2 \times 3$  min mit MeOH gewaschen. Die Träger wurden anschließend im Luftstrom getrocknet und bei 4 °C über Schutzgas bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Reaktionskontrolle auf Glas wurde ein kleines Stück Siliziumwafer funktionalisiert. Der Farbumschlag von blau zu gelb kann dabei als zuverlässiger Indikator einer erfolgreichen Reaktion verwendet werden.

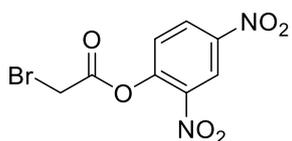
Abschließend wurden die freien Alkohole mit einem  $\beta$ -Alanin verestert. Dazu wurden die polymerisierten Oberflächen in einem Exsikkator unter Schutzgas vorgelegt. In einen Schlenkkolben wurde nach dreimaligem Evakuieren und Beschicken im Gegenstrom eine 200 mM, Lösung von Fmoc- $\beta$ -Alanin-OH (**116**) (1.00 Äquiv.) in DMF vorgelegt und dann DIC (**6**) (1.20 Äquiv) und NMI (2.00 Äquiv.) hinzugegeben. Nach 5 min Rühren wurde die Lösung ebenfalls im Gegenstrom auf die zu funktionalisierenden Oberflächen gegossen und über Nacht stehen gelassen. Nach beendeter Reaktion wurden die Oberflächen  $3 \times 5$  min mit Wasser und  $2 \times 3$  min mit DMF,  $1 \times 2$  min mit MeOH und  $1 \times 1$  min mit

DCM gewaschen. Die Träger wurden anschließend im Luftstrom getrocknet und bei 4 °C über Schutzgas bis zur weiteren Verwendung gelagert.

## 5.5. Versuchsbeschreibungen

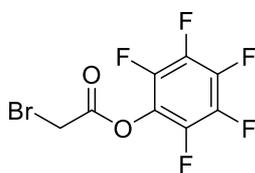
### 5.5.1. Synthesevorschriften und Charakterisierung der eingesetzten Edukte

*Bromessigsäure-dinitrophenolester (BrAc-ODNP)*<sup>[108]</sup> (**40**):



Eine Lösung von 3.99 g 2,4-Dinitrophenol (**198**) (21.7 mmol, 1.00 Äquiv.) und 3.76 mL DIPEA (21.7 mmol, 1.00 Äquiv.) in DCM (30.0 mL) wurde auf 0°C gekühlt. Anschließend wurde 1.80 mL Bromoacetyl bromid (**197**) (21.7 mmol, 1.00 Äquiv.) in DCM (30.0 mL) innerhalb von 30 min tropfenweise dazugegeben und danach das Eiswasser entfernt. Nach 2 h wurde die Lösung mit H<sub>2</sub>O (30.0 mL) und Zitronensäure (10% in H<sub>2</sub>O) (30.0 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, wodurch ein gelbes Öl erhalten wurde. Das Rohprodukt wurde bei -18 °C in Diethylether (50.0 mL) zur Kristallisation gebracht und 2.85 g BrAc-ODNP (**40**) als gelb-graue Kristalle (9.87 mmol) erhalten. Ausbeute: 45%.

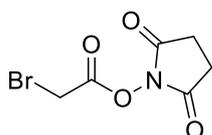
- <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 8.95 (d, *J* = 2.7 Hz, 1 H, Ar-*H*3), 8.51 (dd, *J* = 8.9 Hz, *J* = 2.7 Hz, 1 H, Ar-*H*5), 7.49 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, Ar-*H*6) 4.13 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>). - <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) = 164.3 (C<sub>quart</sub>, C=O), 148.3 (C<sub>quart</sub>, Ar-C-O), 147.2 (C<sub>Ar</sub>), 145.5 (C<sub>Ar</sub>), 129.3 (Ar-C-H). 126.4 (C<sub>Ar</sub>), 122.0 (C<sub>Ar</sub>), 24.3 (-, CH<sub>2</sub>).

*Bromessigsäurepentafluorophenolester (BrAc-OPfp)<sup>[108]</sup> (41):*

Zu einer Lösung von 1.39 g BrAcOH (**37**) (10.0 mmol, 1.00 Äquiv.) und 1.84 g Pentafluorophenol (**13**) (10.0 mmol, 1.00 Äquiv.) in 50.0 mL DCM wurde 2.06 g DCC (**12**) (10.0 mmol, 1.00 Äquiv.) in 3 Portionen unter starkem Rühren hinzugegeben und für 2 h gerührt.

Dann wurde der Niederschlag abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Ohne weitere Aufarbeitung wurden 1.41 g BrAc-OPfp (**41**) als leicht bräunliches Öl erhalten. (4.62 mmol). Ausbeute: 46%.

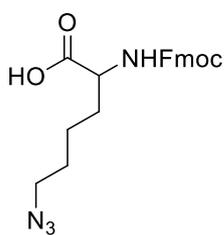
– <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 4.16 (s, 2 H, Br–CH<sub>2</sub>) ppm; – <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): = 163.7 (C<sub>quart</sub>, C=O), 124.6 – 125.1 (C<sub>quart</sub>, Ar–C–O), 137.2 – 142.2 (C<sub>quart</sub>, Ar–C–F), 23.9 (–, CH<sub>2</sub>) ppm. <sup>19</sup>F-NMR (471 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): = –161.11 – –162.24 (m, 2 F, m-F), –157.56 (t, 1 F, J = 22.0 Hz, p-F), –151.96 – –152.89 (m, 2 F, o-F).

*Bromessigsäure-succinimidester (BrAc-OSu)<sup>[108]</sup> (42):*

Zu einer Lösung von 1.39 g BrAcOH (**37**) (10.0 mmol, 1.00 Äquiv.) und 1.15 g *N*-Hydroxysuccinimid (**199**) (10.0 mmol, 1.00 Äquiv.) in 50.0 mL DCM wurde 2.06 g DCC (**12**) (10.0 mmol, 1.00 Äquiv.) in

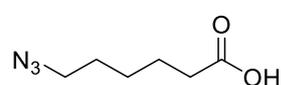
3 Portionen unter starkem Rühren zugegeben und für 2 h gerührt. Dann wurde der Niederschlag abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Ohne eine weitere Aufarbeitung wurden 1.83 g BrAc-OSu (**42**) als weißer Feststoff erhalten. (8.32 mmol). Ausbeute: 83%.

– <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 4.24 (s, 2 H, Br–CH<sub>2</sub>), 3.00 (br-s, 4 H, CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>). – <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): = 168.4 (C<sub>quart</sub>, Amid–C=O), 163.0 (C<sub>quart</sub>, Ester–C=O), 25.3 (–, CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 21.2 (–, Br–CH<sub>2</sub>).

*Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH*<sup>[113b]</sup> (**110**):

In einem Kolben werden 1.00 g Natriumazid (15.4 mmol, 6.00 Äquiv.) wurde in 3.00 mL H<sub>2</sub>O und 3.00 mL DCM gelöst, 1.30 mL Triflylanhydrid (7.73 mmol, 3.00 Äquiv.) tropfenweise unter Rühren bei 0 °C hinzugegeben und 2 h gerührt. Dann wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit DCM (2 × 5.00 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Natriumhydrogencarbonat (15.0 mL) gewaschen. Das Diazotransferreagenz wurde 946 mg Fmoc-Lys(NH<sub>2</sub>)-OH (2.57 mmol, 1.00 Äquiv.), 436 mg Natriumhydrogencarbonat (5.19 mmol, 2.00 Äquiv.) und 16.0 mg Kupfersulfatpentahydrat (64.0 μmol, 2.5 mol%) in 9.00 mL Methanol und H<sub>2</sub>O unter Rühren hinzugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht heftig gerührt. Nach Entfernung des organischen Lösungsmittels unter vermindertem Druck, wurde der Rückstand durch Zugabe von 1.00 M HCl auf pH = 3 bei 0 °C gebracht. Es wurde eine Filtration durchgeführt und der blaue Rückstand mit Essigsäureethylester (50.0 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und der Essigsäureethylester unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (DCM/MeOH (98:2) und 0.3% TFA) und 591 mg Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**) (1.75 mmol) wurde als weißer Feststoff erhalten. Ausbeute: 68%.

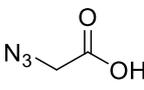
– <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>): δ (ppm) = 7.79 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H, Fmoc-CH), 7.67 (t, *J* = 7.6 Hz, 2 H, Fmoc CH), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH), 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Fmoc-CH), 4.35 (d, 1 H, *J* = 7.0 Hz, αH), 4.22 (t, 1 H, *J* = 7.0 Hz, Fmoc-CH), 4.17 – 4.12 (m, 2 H, FmocOCH<sub>2</sub>), 3.22 – 3.29 (m, 2 H, N<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>) 1.87 – 1.40 (m, 6 H, 3 × CH<sub>2</sub>). – <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>): δ = 175.8 (C<sub>quart</sub>, COOH), 158.7 (C<sub>quart</sub>, CONH), 145.35 (C<sub>quart</sub>, Fluorenyl), 145.17 (C<sub>quart</sub>, Fluorenyl), 142.58 (+, Fluorenyl), 128.77 (+, Fluorenyl), 128.15 (+, Fluorenyl), 126.3 (+, Fluorenyl), 120.9 (+, Fluorenyl), 67.9 (–, CH<sub>2</sub>O), 55.3 (+, CαH), 52.68 (–, CεH<sub>2</sub>), 48.4 (Fluorenyl), 32.2 (–, CH<sub>2</sub>), 29.4 (–, CH<sub>2</sub>), 24.21 (–CH<sub>2</sub>). – IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3314 (w), 2943 (w), 2091 (m), 1689 (m), 1531 (m), 1448 (m), 1232 (m), 1103 (w), 1084 (w), 1043 (m), 936 (vw), 757 (w), 736 (m) 620 (w), 541 (w), 426 (w), 382 (vw) cm<sup>-1</sup>. – HRMS (ESI), (C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>): ber. 394.1636, gef. 394.1635.

6-Azidohexansäure<sup>[113a]</sup> (**113**):

In einen Kolben wurden Natriumazid (15.4 mmol, 2.00 Äquiv.) in 3.00 mL H<sub>2</sub>O und 3.00 mL DCM gelöst und 1.30 mL Triflylanhydrid (7.73 mmol, 1.00 Äquiv.) tropfenweise unter Rühren bei 0 °C hinzugegeben. Nach 2 h wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit DCM (3 × 5 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Natriumhydrogencarbonat gewaschen. Das Diazotransferreagenz wurde zu Mischung von 845 mg 6-Aminohexansäure (6.44 mmol), 1.78 g Kaliumcarbonat (12.9 mmol) und 43.0 mg Kupfersulfatpentahydrat (2.7 mol%) in 25.0 mL Methanol, die gerührt wurde, gegeben und bei Raumtemperatur für 16 h heftig gerührt. Nach Entfernung des Methanols unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mit 50.0 mL Wasser aufgenommen und durch die Zugabe von 1.00 M HCl auf pH = 3 bei 0 °C gebracht. Die Lösung wurde dann mit Diethylether extrahiert (3 × 50.0 mL) und die vereinigten organischen Phasen mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und der Diethylether unter vermindertem Druck entfernt und 483 mg Azidohexansäure (**112**) wurden als rosa Öl erhalten (3.07 mmol). Ausbeute: 48%.

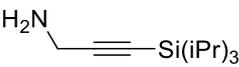
– <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 11.33 (bs, 1 H, COOH), 3.28 (t, 2 H, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>2</sub>-COOH), 2.38 (t, 2 H, *J* = 7.4 Hz, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.72 – 1.56 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.48 – 1.38 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) ppm. – <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): = 179.81 (C<sub>quart</sub>, COOH), 51.33 (–, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 33.93 (–, CH<sub>2</sub>), 28.67 (–, CH<sub>2</sub>), 26.29 (–, CH<sub>2</sub>), 24.28 (–, CH<sub>2</sub>) ppm. – IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2938 (w), 2865 (vw), 2090 (m), 1703 (m), 1409 (w), 1349 (vw), 1235 (m), 1193 (vw), 1152 (m), 1096 (vw), 930 (w), 736 (vw), 609 (w), 557 (vw), 495 (vw) cm<sup>-1</sup>.

Azidoessigsäure<sup>[139]</sup> (**113**):


 In einem Kolben wurden 1.95 g Natriumazid (30.0 mmol, 2.00 Äquiv.) in 18.0 mL Wasser gelöst, eine Lösung von 2.11 g BrAcOH (**37**) (15.0 mmol, 1.00 Äquiv.) in 3.00 mL Wasser vorsichtig hinzugegot und anschließend bei Raumtemperatur für 48 h gerührt. Die Lösung wurde vorsichtig mit 1.00 M HCl bei 0 °C angesäuert (pH = 1) und dann für weitere 10 Minuten gerührt. Es wurde mit Essigsäureethylester (3 × 50 mL) extrahiert und die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die erhaltene Flüssigkeit wurde im Hochvakuum getrocknet. Ohne weitere Aufreinigung wurden 1.24 g Azidoessigsäure (**113**) als farbloses Öl erhalten. (27.1 mmol) Ausbeute: 82%.

– <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11.01 (bs, 1 H, COOH), 3.98 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>) ppm. – <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 174.72 (C<sub>quart</sub>, C=O), 50.13 (–, CH<sub>2</sub>) ppm – IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2922 (w), 2229 (w), 2104 (s), 1718 (m), 1417 (m), 1277 (m), 1190 (m), 999 (w), 943 (w), 872 (w), 721 (w), 621 (w), 550 (w), 463 cm<sup>-1</sup> (vw). – MS (EI, 70 eV, 20 °C): *m/z* (%): 101.0 (100) [M<sup>+</sup>], 56.0 (8.95) [(CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>)<sup>+</sup>]. – HRMS (ESI), (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>) *m/z* = ber. 101.0221 [M<sup>+</sup>], gef. 101.0221.

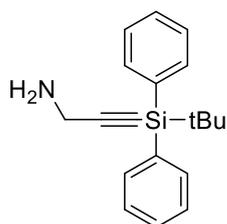
3-(Triisopropylsilyl)prop-2-in-1-amin<sup>[117]</sup> (**205**):


 In einen Kolben wurden unter Argon-Atmosphäre 864 mg Propargylamin (**114**) (15.7 mmol, 1.00 Äquiv.) in 50.0 mL THF gegeben und das Reaktionsgemisch auf –78 °C gekühlt. Dann wurden 9.40 mL *n*-Butyllithium in Hexan (23.6 mmol, 1.50 Äquiv.) tropfenweise hinzugegeben und für 15 min gerührt. Bei 0 °C wurden 4.00 mL Triisopropylsilylchlorid (18.8 mmol, 1.20 Äquiv.) tropfenweise zugegeben und für 2 h gerührt. Eine gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung (30.0 mL) wurde zum Quenchen der Lösung verwendet. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (3 × 20.0 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie

(Cyclohexan/Essigsäureethylester (1:1)) und 1% Triethylamin gereinigt. Es wurden 1.59 g (7.54 mmol) eines gelben Öles erhalten. Ausbeute: 48%.

–  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.40$  (s, 2 H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 1.41 (bs, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 0.98 – 1.04 (m, 21 H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_3$ ) ppm. –  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 109.20 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , SiC), 82.49 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , CCH<sub>2</sub>), 32.47 (–,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 18.62 (+, CHCH<sub>3</sub>), 11.25 (+, SiCH). – IR (ATR):  $\tilde{\nu} = 2940$  (w), 2863 (m), 2162 (w), 1595 (vw), 1461 (w), 1382 (vw), 1328 (vw), 1241 (w), 1070 (w), 995 (m), 918 (vw), 881 (m), 660 (m), 628 (vw), 517 (vw), 482 (w), 454 (vw), 413 (w)  $\text{cm}^{-1}$ . – MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 211 (21) [ $\text{M}^+$ ], 210 (58) [ $\text{M}^+ - \text{H}$ ], 196 (6) [ $\text{M}^+ - \text{CH}_3$ ], 182 (3) [ $\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3 - \text{CH}_3$ ], 168 (100) [ $\text{M} + i\text{Pr}$ ], 154 (4), 140 (22), 126 (14), 112 (18), 98 (20), 74 (23). – HRMS (ESI), ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NSi}$ ): ber. 211.1751; gef. 211.1752.

*3-(tert-Butyldiphenylsilyl)prop-2-in-1-amin*<sup>[118]</sup> (**206**):



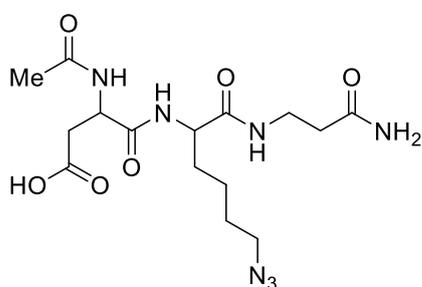
In einen Kolben wurden unter Argon-Atmosphäre 864 mg Propargylamin (**114**) (15.7 mmol, 1.00 Äquiv.) in 50.0 mL THF gegeben und das Reaktionsgemisch auf  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Dann wurden 9.40 mL *n*-Butyllithium in Hexan (23.6 mmol, 1.50 Äquiv.) tropfenweise hinzugegeben und für 15 min gerührt. Bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$  wurden 4.89 mL *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (18.8 mmol, 1.20 Äquiv.) tropfenweise zugegeben und für 2 h gerührt. Eine gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung (30.0 mL) wurde zum Quenchen der Lösung benutzt. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester ( $3 \times 20.0\text{ mL}$ ) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester (20:1)) und 1% Triethylamin gereinigt. Es wurden 828 mg (2.82 mmol) von einem gelben Feststoff erhalten. Ausbeute: 18%.

–  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.69 - 7.20$  (m, 10 H, Ph), 3.46 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 0.99 (s, 9 H, *t*Bu). –  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 135.8$  ( $\text{C}_{\text{quart}}$ ,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 133.4 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ ,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.5 (CH), 127.77 (CH), 111.4 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C), 81.9 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C), 32.68 (–,  $\text{CH}_2$ ), 26.97 (+,  $\text{CH}_3$ ), 18.53 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C). – IR (ATR):  $\tilde{\nu} = 3046$  (vw), 2928 (w), 2854 (m), 2165 (w), 1588 (vw), 1470 (w), 1427 (m), 1389 (vw), 1360 (w), 1325 (w), 1188 (vw),

1106 (m), 991 (m), 939 (vw), 856 (v), 820 (m), 743 (m), 694 (m), 632 (w), 616 (vw), 594 (m), 491 (m), 443 (vw), 422 (vw)  $\text{cm}^{-1}$ . – HRMS (ESI), ( $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NSi}$ ): ber. 293.1594; gef. 293.1595.

## 5.5.2. Synthese und Charakterisierung der bi- und trifunktionalen Linker

*3-Acetamido-4-((1-((3-amino-3-oxopropyl)amino)-6-azido-1-oxohexan-2-yl)amino)-4-oxobutansäure(BiF1) (121):*

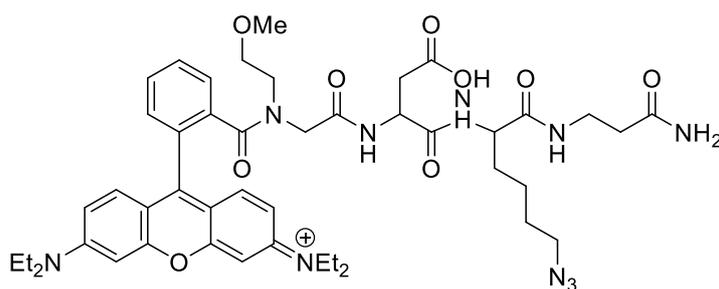


Nach **AAV 1** wurden 915 mg Fmoc-Rink-Amid-Harz (**36**) (375  $\mu\text{mol}$ ) wurden mit  $3 \times 9.00$  mL 20% Piperidin in DMF (v/v) für 15 min entschützt und gemäß **AAV 3** wurden 350 mg Fmoc- $\beta$ -Ala-OH (1.13 mmol), 223  $\mu\text{L}$  DIC (**6**) (182 mg, 1.13 mmol) in 9.00 mL DMF vorgelegt und nach 5 min 135 mg *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) (1.13 mmol) hinzugegeben und für 2 h geschüttelt. Die noch freien Amine wurden nach **AAV 2** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für  $2 \times 15$  min acetyliert. Danach wurde nach **AAV 1** das Harz mit 20% Piperidin in  $3 \times 9.00$  mL DMF (v/v) für 15 min entschützt und gemäß **AAV 3** wurden 296 mg Fmoc-Lys( $\text{N}_3$ )-OH (700  $\mu\text{mol}$ ), 223  $\mu\text{L}$  DIC (**6**) (182 mg, 1.13 mmol) und nach 5 min 135 mg *N*-Hydroxysuccinimid (1.13 mmol) in 9.00 mL DMF hinzugegeben und für 2 h umgesetzt. Die noch freien Amine wurden nach **AAV 2** mit 9.00 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für  $2 \times 15$  min acetyliert. Nach **AAV 1** wurde erneut mit 20% Piperidin in  $3 \times 9.00$  mL DMF (v/v) für 45 min entschützt und gemäß **AAV 3** wurden 483 mg Fmoc-Asp(*t*Butyl)-OH (1.13 mmol), 223  $\mu\text{L}$  DIC (**6**) (182 mg, 1.13 mmol) in 9.00 mL DMF vorgelegt und nach 5 min 135 mg *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) (1.13 mmol) hinzugegeben und für 2 h umgesetzt. Die noch freien Amine wurden nach **AAV 2** mit mit 9.00 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für  $2 \times 15$  min acetyliert. Abschließend wurde nach **AAV 1** das Harz mit 20% Piperidin in  $3 \times 9.00$  mL DMF (v/v) für 15 min geschüttelt. Alle Amine wurden nach **AAV 2** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für  $2 \times 15$  min acetyliert. Das Rohprodukt wurde nach **AAV 6**

mit 9.00 mL 50% TFA in DCM (v/v), jedoch ohne die Verwendung von TIBS und H<sub>2</sub>O, über Nacht abgespalten und nach einer Aufarbeitung wurden 79.5 mg des bifunktionalen Linkers **121** als weißer Feststoff (198 µmol, Reinheit: 98%) erhalten. Ausbeute: 53%.

– <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>): δ (ppm) = 8.42 (s, NH), 8.25 (s, NH), 7.89 (s, NH), 4.71 (t, *J* = 6.9 Hz, 1 H, CHCH<sub>2</sub>), 4.29 (dd, *J* = 9.5 Hz, 4.7 Hz, 1 H, CH), 3.46 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>NH), 3.37 – 3.29 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.93 – 2.71 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>COOH), 2.49 – 2.43 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>–CONH<sub>2</sub>), 2.01 (s, 9 H, CH<sub>3</sub>) 1.92 – 1.36 (m, 6 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). – <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>): δ = 176.5 (C<sub>quart</sub>, CO), 174.2 (C<sub>quart</sub>, CO), 174.0 (C<sub>quart</sub>, CO), 173.4 (C<sub>quart</sub>, CO), 173.3 (C<sub>quart</sub>, CO), 54.70(+, CH), 52.23 (+, CH), 51.40 (–, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 37.00 (–, CH<sub>2</sub>), 36.46 (–, CH<sub>2</sub>), 35.92 (–, CH<sub>2</sub>), 32.18 (–, CH<sub>2</sub>), 29.38 (–, CH<sub>2</sub>), 24.05 (–, CH<sub>2</sub>), 22.44 (+, CH<sub>3</sub>) – IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3294 (w), 2937 (vw), 2096 (m), 1647 (m), 1526 (w), 1434 (m), 1369 (w), 1296 (w), 1182 (vw), 1133 (w), 1102 (w), 897 (w), 837 (w), 800 (w), 720 (w), 596 (w), 519 (vw), 467 cm<sup>–1</sup>. – MS (FAB), (C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>) *m/z* = ber. 399.4; gef. 400.3 (M+H)<sup>+</sup>. – Analytische HPLC (5 – 95% Acetonitril + 0.1% TFA in 30 min, Detektion bei 218 nm): t<sub>Ret</sub> = 14.0 min.

*N*-(9-(2-((2-((1-((1-((3-amino-3-oxopropyl)amino)-6-azido-1-oxohexan-2-yl)amino)-3-carboxy-1-oxopropan-2-yl)amino)-2-oxoethyl)(2-methoxyethyl)carbamoyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminium (BiF2) (**107**):



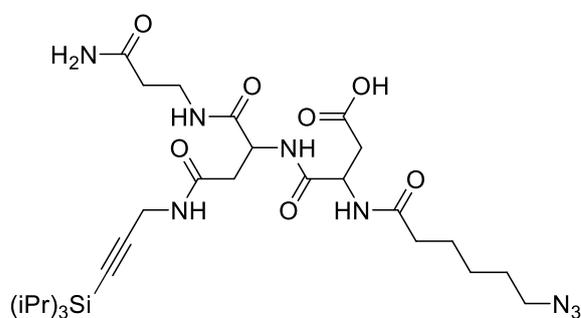
Nach **AAV 1** wurden 685 mg Fmoc-Rink-Amid-Harz (**36**) (281 µmol) mit 3 × 7.00 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) für 15 min geschüttelt und gemäß **AAV 3** wurden 263 mg

Fmoc-β-Ala-OH (843 µmol), 167 µL DIC (**6**) (137 mg, 843 µmol) in 7.00 mL DMF vorgelegt und nach 5 min 102 mg NHS (843 µmol) hinzugegeben und für 2 h geschüttelt. Die noch freien Amine wurden nach **AAV 2** mit 7.00 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 2 × 15 min acetyliert. Dann wurde nach **AAV 1** das Harz mit 20% Piperidin in 3 × 7.00 mL DMF für 45 min entschützt und gemäß **AAV 3** wurden 223 mg Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**) (562 µmol), 167 µL DIC (**6**) (137 mg, 843 µmol) und nach 5 min

102 mg NHS (843  $\mu\text{mol}$ ) in 15.0 mL DMF hinzugegeben und für 2 h geschüttelt. Die noch freien Amine wurden nach **AAV 2** mit 7.00 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für  $2 \times 15.0$  min acetyliert. Nach **AAV 1** wurde erneut mit 20% Piperidin in  $3 \times 7.00$  mL DMF (v/v) für 45 min entschützt und gemäß **AAV 3** wurden 363 mg Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH (843  $\mu\text{mol}$ ), 167  $\mu\text{L}$  DIC (**6**) (137 mg, 843  $\mu\text{mol}$ ) und nach 5 min 102 mg NHS (843  $\mu\text{mol}$ ) in 15.0 mL DMF hinzugegeben und für 2 h geschüttelt. Die noch freien Amine wurden nach **AAV 2** mit 7.00 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für  $2 \times 15$  min acetyliert. Dann wurde nach **AAV 1** das Harz mit 20% Piperidin in  $3 \times 7.00$  mL DMF (v/v) für 15 min geschüttelt. Dann wurde das Harz nach **AAV 7** mit 234 mg BrAcOH (**37**) (1.69 mmol) und 335  $\mu\text{L}$  DIC (**6**) (1.68 mmol) in 7.00 mL DMF für 30 min umgesetzt. Die nucleophile Substitution wurde nach **AAV 8** mit 146  $\mu\text{L}$  MEA (**123**) (1.69 mmol) in DMF für 30 min substituiert. Nach **AAV 3** wurden Rhodamin B (843  $\mu\text{mol}$ ) und 167  $\mu\text{L}$  DIC (**6**) (137 mg, 843  $\mu\text{mol}$ ) in 7.00 mL DMF vorgelegt und nach 5 min 113 mg HOBt **8** (843  $\mu\text{mol}$ ) hinzugegeben und für 16 h geschüttelt. Das Rohprodukt wurde nach **AAV 6** mit 7.00 mL 50% TFA in DCM (v/v), jedoch ohne die Verwendung von TIBS und  $\text{H}_2\text{O}$ , über Nacht (16 h) abgespalten und nach einer Aufarbeitung wurden 16.4 mg des bifunktionalen Linkers **107** als lila Feststoff (18.2  $\mu\text{mol}$ , 97% Reinheit) erhalten. Ausbeute: 6.5%

– MS (MALDI),  $m/z$  = ber. 898.04; gef. 898.4 (M+H)<sup>+</sup>. – Analytische HPLC (5 – 95% Acetonitril + 0.1% TFA in 30 min, Detektion bei 560 nm):  $t_{\text{Ret}}$  = 16.7 min.

4-((1-((3-Amino-3-oxopropyl)amino)-1,4-dioxo-4-((3-(triisopropylsilyl)prop-2-yn-1-yl)amino)butan-2-yl)amino)-3-(6-azidohexanamido)-4-oxobutansäure (TriL1)<sup>[112]</sup> (**132**):



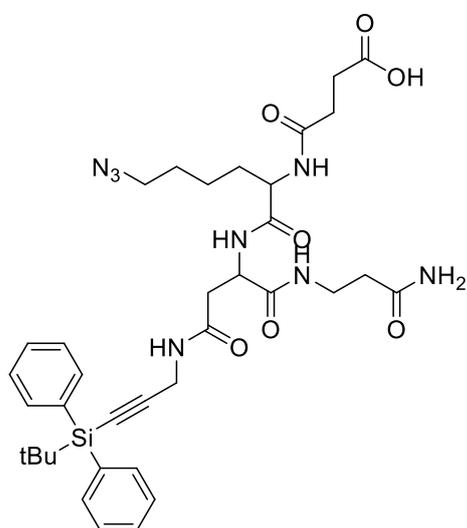
Nach **AAV 1** wurden 1.49 g Fmoc-Rink-Amid-Harz (**32**) (1.00 mmol) wurde mit  $3 \times 15$  mL 20% Piperidin in DMF für 45 min entschützt und gemäß **AAV 3** wurden 934 mg Fmoc- $\beta$ -Ala-OH (3.00 mmol), 929  $\mu\text{L}$  DIC (**6**) (757 mg, 6.00 mmol) und nach 5 min 405 mg

HOBt (**8**) (3.00 mmol in 15 mL DMF) hinzugegeben und für 16 h geschüttelt. Dann wurde nach **AAV 1** das Harz mit  $3 \times 15.0$  mL 20% Piperidin in DMF für 45 min entschützt und

gemäß **AAV 3** wurden 1.19 g Fmoc-Asp(Allyl)-OH (3.00 mmol), 929  $\mu$ L DIC (**6**) (757 mg, 6.00 mmol) und nach 5 min 405 mg HOBt (**8**) (3.00 mmol) in 15.0 mL DMF hinzugegeben und für 16 h umgesetzt. Nach **AAV 1** wurde erneut mit  $3 \times 15.0$  mL 20% Piperidin in DMF für 45 min entschützt und gemäß **AAV 3** wurden 1.23 g Fmoc-Asp(tBu)-OH (3.00 mmol), 929  $\mu$ L DIC (**6**) (757 mg, 6.00 mmol) und nach 5 min 405 mg HOBt (**8**) (3.00 mmol) in 15.0 mL DMF hinzugegeben und für 16 h geschüttelt. Die Allyl-Schutzgruppe wurde nach **AAV 4** mit 115 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (10.0 mol%), 369 mg 1,3-Dimethylbarbitursäure (3.00 mmol) entfernt, wobei in 14.0 mL THF/DMF (50%:50% (v/v)) für 2 d geschüttelt wurde. Das Harz wurde nach **AAV 3** mit 929  $\mu$ L DIC (**6**) (757 mg, 6.00 mmol), 405 mg HOBt (**8**) (3.00 mmol) in 15.0 mL DMF versetzt und nach 5 min 633 mg TIPS-Propargylamin (**205**) (3.00 mmol) hinzugegeben und für 16 h geschüttelt. Nach **AAV 1** wurde die Fmoc-Schutzgruppe der Asparaginsäure entschützt und nach **AAV 3** mit 471 mg 6-Azidohexansäure (3.00 mmol) und 929  $\mu$ L DIC (**6**) (757 mg, 6.00 mmol) und nach 5 min 405 mg HOBt (**8**) (3.00 mmol) in 15 min DMF für 16 h umgesetzt. Das Rohprodukt wurde nach **AAV 9** mit 15.0 mL 50% TFA, 2.5% TIBS, 2.5% H<sub>2</sub>O in DCM (v/v/v/v) in 2 h abgespalten und nach einer Aufarbeitung wurden 119 mg des trifunktionalen Linkers **132** als weißer Feststoff (183  $\mu$ mol, Reinheit: 96%) erhalten. Ausbeute: 18%.

– <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>):  $\delta$  (ppm) = 8.40 (s, NH), 7.93 (s, NH<sub>2</sub>), 4.66 (dd, 1 H,  $J = 7.0$  Hz, 5.3 Hz CHCH<sub>2</sub>COOH), 4.62 (dd, 1 H,  $J = 7.0$  Hz, 5.3 Hz, CH–CO–NH<sub>2</sub>), 4.07 – 3.95 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>–Alkin), 3.43 – 3.41 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>COOH), 3.29 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>–N<sub>3</sub>), 2.86 – 2.72 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>–CO–NH<sub>2</sub>, CHCH<sub>2</sub>), 2.43 – 2.37 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>–C=O), 2.34 – 2.25 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C=O), 1.63 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–N<sub>3</sub>), 1.44 – 1.35 (m, 2 H, –CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–N<sub>3</sub>), 1.11 – 0.93 (m, 21 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. – <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>):  $\delta = 175.1$  (C<sub>quart</sub>), 175.1 (C<sub>quart</sub>), 172.7 (C<sub>quart</sub>), 171.7 (C<sub>quart</sub>), 171.3 (C<sub>quart</sub>), 170.6 (C<sub>quart</sub>), 103.4 (C<sub>quart</sub>, C–Si), 82.7 (C<sub>quart</sub>, C-Alkin), 50.8 (–, CH<sub>2</sub>–N<sub>3</sub>), 50.3 (CH–C=O), 50.3 (CH–C=O), 35.9(–, CH<sub>2</sub>), 35.9(–, CH<sub>2</sub>), 35.1(–, CH<sub>2</sub>), 35.0 (–, CH<sub>2</sub>), 34.6 (–, CH<sub>2</sub>), 29.0 (–, CH<sub>2</sub>), 28.2 (–, CH<sub>2</sub>), 26.0 (–, CH<sub>2</sub>), 24.8 (–, CH<sub>2</sub>), 17.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 11.00 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). – IR (ATR):  $\tilde{\nu} = 3283$  (w), 2942 (vw), 2864 (vw), 2093 (vw), 1702 (vw), 1639 (w), 1543 (w), 1415 (m), 1341 (vw), 1296 (w), 1240 (vw), 1199 (vw), 1118(vw), 1069 (vw), 997 (w), 918 (vw), 883 (vw), 676 (w), 458 (vw), 411 (vw) cm<sup>–1</sup>. – MS (FAB), (C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>N<sub>8</sub>O<sub>7</sub>)  $m/z =$  ber. 650.8; gef. 651.4 [M+H]<sup>+</sup>. – Analytische HPLC (5 – 95% Acetonitril + 0.1% TFA in 30 min, Detektion bei 218 nm):  $t_{\text{Ret}} = 17.02$  min.

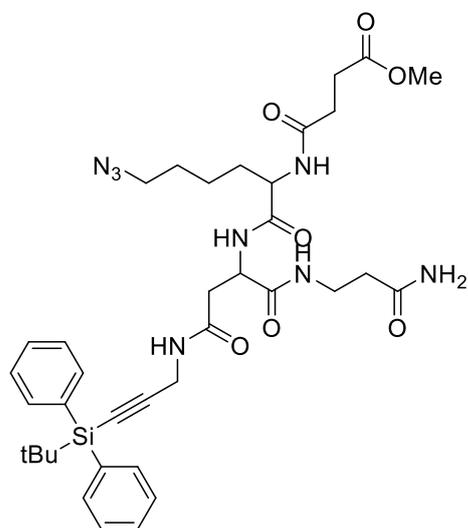
10-((3-Amino-3-oxopropyl)carbamoyl)-13-(4-azidobutyl)-2,2-dimethyl-8,12,15-trioxo-3,3-diphenyl-7,11,14-triaza-3-silaoctadec-4-in-18-säure (**136**):



Nach **AAV 1** wurden 1.34 g Fmoc-Rink-Amid-Harz (**32**) (0.55 mmol) mit  $3 \times 10.0$  mL 20% Piperidin in DMF für 45 min entschützt und gemäß **AAV 3** wurden 513 mg Fmoc- $\beta$ -Ala-OH (1.65 mmol), 858 mg PyBOP (**15**), (1.65 mmol); 286  $\mu$ L DIPEA (1.65 mmol) und 222 mg HOBt (**8**) (1.65 mmol) in 10.0 mL DMF hinzugegeben und für 16 h geschüttelt. Dann wurde nach **AAV 1** das Harz mit  $3 \times 10.0$  mL 20% Piperidin in DMF für 45 min entschützt und gemäß **AAV 3** wurden 789 mg Fmoc-Asp(Allyl)-OH (1.65 mmol), 858 mg PyBOP (**15**) (1.65 mmol), 286  $\mu$ L DIPEA (1.65 mmol) und 222 mg HOBt (**8**) (1.65 mmol) in 10 mL DMF hinzugegeben und für 16 h geschüttelt. Die Allyl-Schutzgruppe wurde nach **AAV 4** mit 31.7 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (5 mol%), 858 mg 1,3-Dimethylbarbitursäure (5.50 mmol) entfernt, wobei in 5.00 mL THF und 5.00 mL DMF für 3 d geschüttelt wurde. Die freie Carboxy-Gruppe wurde nach **AAV 3** mit 506  $\mu$ L DIC (**6**) (3.24 mmol), 222 mg HOBt (**8**) (1.65 mmol) in 10.0 mL DMF versetzt und nach 5 min 483 mg *tert*-Butyldiphenylsilylpropargylamin (**206**) (1.65 mmol) hinzugegeben und für 16 h umgesetzt. Nach **AAV 1** wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit  $3 \times 10.0$  mL 20% Piperidin in DMF (v/v) in 45 min entfernt und gemäß **AAV 3** wurden 433 mg Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**) (1.10 mmol), 506  $\mu$ L DIC (**6**) (3.24 mmol) und 222 mg HOBt (**8**) (1.65 mmol) in 10.0 mL DMF hinzugegeben und für 16 h geschüttelt. Nach **AAV 1** wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und nach **AAV 3** mit 287 mg mono-*tert*-Butylsuccinat (1.65 mmol) und 506  $\mu$ L DIC (3.24 mmol), 222 mg HOBt (**8**) (1.65 mmol) in 10.0 mL DMF versetzt und für 16 h geschüttelt. Das Rohprodukt wurde nach **AAV 9** mit 15.0 mL 50% TFA, 2.5% TIBS, 2.5% H<sub>2</sub>O in DCM (v/v/v/v) abgespalten und nach Aufarbeitung wurden 22.9 mg des trifunktionalen Linkers **132** als weißer Feststoff (41.0  $\mu$ mol, Reinheit: 94%) erhalten. Ausbeute: 5.7%.

–  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, Methanol- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.44 (s, NH), 8.43 (s, NH), 8.16 (s, NH), 8.14 (NH), 7.84 – 7.72 (m, 4 H, Ph), 7.48 – 7.37 (m, 6 H, Ph), 4.71 – 4.66 (m, 1 H, CH), 4.28 – 4.15 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ -alkin, CH), 3.50 – 3.38 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ -Amid), 3.29 (t, 2 H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ - $\text{N}_3$ ), 3.85 – 3.39 (m, 8 H,  $\text{CH}_2$ ), 1.87 – 1.39 (m, 6 H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$ ), 1.05 (s, 9 H, *t*Bu) ppm. –  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, Methanol- $d_4$ ):  $\delta = 176.9$  ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C=O), 176.5 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C=O), 175.9 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C=O), 174.4 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C=O), 172.8 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C=O), 172.0 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C=O), 136.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 134.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 130.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 107.4 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C-Si), 83.6 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C-Alkin), 55.7(+, CH-C=O), 52.2 (-,  $\text{CH}_2$ - $\text{N}_3$ ), 51.9 (+, CH-C=O), 37.8 (-,  $\text{CH}_2$ ), 37.3 (-,  $\text{CH}_2$ ), 35.9 (-  $\text{CH}_2$ ), 31.7 (-,  $\text{CH}_2$ ), 31.2 (-,  $\text{CH}_2$ ), 30.7 (-,  $\text{CH}_2$ ), 30.1 (-,  $\text{CH}_2$ ), 29.5 (-,  $\text{CH}_2$ ), 27.5 (+, *t*Bu), 24.1 (-,  $\text{CH}_2$ ), 19.2 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C). – IR (ATR):  $\tilde{\nu} = 3278$  (v), 2930 (vw), 2098(vw), 1635 (w), 1541 (w), 1427 (vw), 1251 (vw), 1187 (vw), 1109 (vw), 996 (vw), 820 (vw), 698 (w), 631 (vw), 503 (v), 426 (vw), 385 (vw)  $\text{cm}^{-1}$  – MS (FAB), ( $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_7\text{Si}$ ): ber. 732.9; gef. 733.4. Analytische HPLC (5 – 95% Acetonitril + 0.1% TFA in 30 min, Detektion bei 218 nm):  $t_{\text{Ret}} = 17.4$  min.

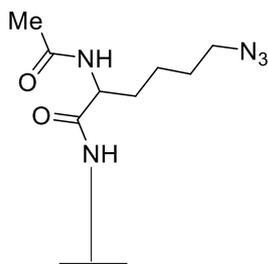
*Isoliertes Nebenprodukt:*



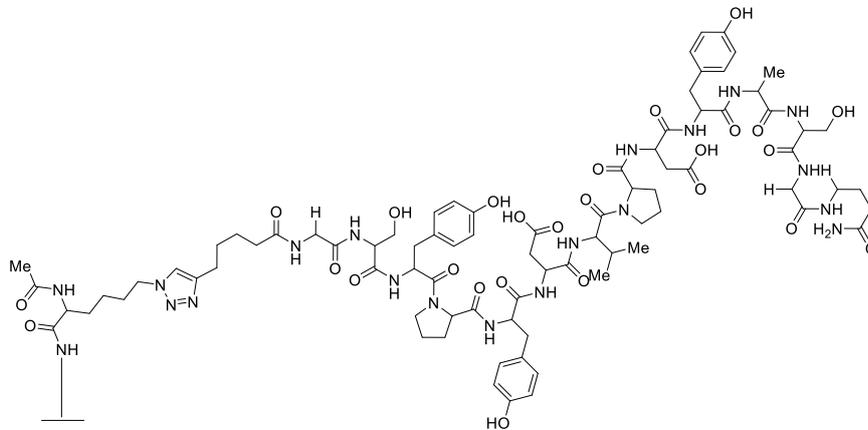
–  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, Methanol- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.83 – 7.74 (m, 4 H, Ph), 7.43 – 7.36 (m, 6 H, Ph), 4.69 – 4.36 (m, 1 H, CH), 4.24 – 4.14 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ -Alkin, CH), 3.65 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.47 – 3.37 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ -Amid), 3.27 (t, 2 H,  $\text{CH}_2$ - $\text{N}_3$ ), 3.49 – 3.33 (m, 6 H,  $\text{CH}_2$ ), 2.44 – 2.36 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{C}=\text{ONH}$ ) 1.85 – 1.37 (m, 6 H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$ ), 1.05 (s, 9 H, *t*Bu) ppm. –  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, Methanol- $d_4$ ):  $\delta = 176.4$  ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C=O), 175.5 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C=O), 175.4 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C=O), 174.3 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C=O), 172.8 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C=O), 172.0 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C=O), 136.7 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 134.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 130.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 107.4 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C-Si), 83.6 ( $\text{C}_{\text{quart}}$ , C-Alkin), 55.6 (+, CH-C=O), 52.4 (+,  $\text{OCH}_3$ ) 52.2 (-,  $\text{CH}_2$ - $\text{N}_3$ ), 51.9 (+, CH-C=O), 37.7 (-,  $\text{CH}_2$ ), 37.2 (-,  $\text{CH}_2$ ), 35.9 (-,  $\text{CH}_2$ ), 31.8 (-,  $\text{CH}_2$ ), 31.1 (-,  $\text{CH}_2$ ), 30.6 (-,  $\text{CH}_2$ ), 30.0 (-,  $\text{CH}_2$ ), 29.5 (-,  $\text{CH}_2$ ), 27.5 (*t*Bu), 24.1 ( $\text{CH}_2$ ), 19.2 (C). – MS (MALDI),  $m/z =$  ber. 746.93 ; gef. 769.11 ( $\text{M} + \text{Na}$ ) $^+$ , 785.15 [ $\text{M} + \text{K}$ ] $^+$ . Analytische HPLC (5 – 95% Acetonitril + 0.1% TFA in 30 min, Detektion bei 218 nm):  $t_{\text{Ret}} = 18.5$  min.

### 5.5.3. Synthese von gereinigten Peptidarrays via Transfermethode

*Ac-Lys(N<sub>3</sub>)-oberflächengebunden (76):*



Nach **AAV 10** wurde eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) in einer Petrischale entschützt und nach **AAV 13** und **AAV 14** mit 250  $\mu$ L einer 50.0 mM Lösung von Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**) (19.7 mg/mL), HBTU (**14**) (19.0 mg/mL), DIPEA (6.70 mg/mL), HOBt (**8**) (6.8 mg/mL) in DMF für 16 h geschüttelt. Die Oberfläche wurde gemäß **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v/v) für 4 h acetyliert und nach **AAV 10** mit 10.00 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt. Nach **AAV 23** wurde die Beladung der Oberfläche überprüft und die Homogenität eines Teils der Oberfläche via Fluoreszenz überprüft. Gemäß **AAV 17** wurde das Azid mit 5.00 mL einer Lösung von *Dye635* Phosphine (100  $\mu$ g/mL) in PBS-T (1:10 000) über Nacht zur Reaktion gebracht. Dann wurde die Oberfläche gemäß **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 4 h acetyliert.

*$\beta$ A-GSAYDPVDYPYSG-Heptinsäure-Ac-Lys-Array (79):*

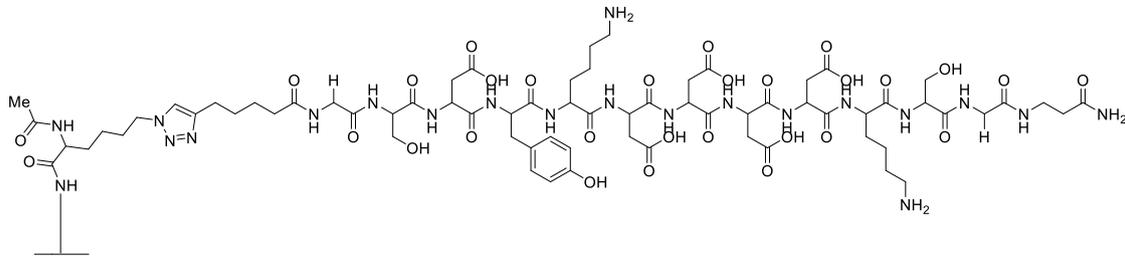
a) Nach **AAV 10** wurde ein (GSYPYDVPDYASG)<sub>p</sub>- $\beta$ A-PEGMA-Array (Laser-Layout: 1) mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) in einer Petrischale entschützt. Die freien Amine wurden nach **AAV 13** mit 1.00 mL einer 200 mM Lösung aus Heptinsäure (25.2 mg/mL), DIC (**6**) (25.2 mg/mL), HOBt (**8**) (26.8 mg/mL) in DMF für 16 h zur Reaktion gebracht. Nach **AAV 12** wurden die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten entfernt und nach **AAV 19** wurden die immobilisierten Peptide mit NH<sub>3</sub> über Nacht abgespalten (die Oberfläche wurde nach der Reaktion mit DMF und MeOH gewaschen) und nach **AAV 22** wurden die abgespaltenen HA-Peptide auf die die azidierte Oberfläche **76** innerhalb von 6 h oder 16 h transferiert und mit einer Lösung aus 250  $\mu$ L CuSO<sub>4</sub>  $\times$  5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat in H<sub>2</sub>O und DMSO an die Oberfläche immobilisiert. Gemäß **AAV 18** wurde in einer Petrischale eine Anti-HA-DyLight 680 Färbung durchgeführt und die transferierten Peptide via Fluoreszenz detektiert.

b) Nach **AAV 10** wurde ein (GSYPYDVPDYASG)<sub>p</sub>- $\beta$ A-10:90-PEGMA-co-MMA Array (Array-Layout: 3) mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) in einer Petrischale entschützt. Die freien Amine wurden nach **AAV 13** mit 1.00 mL einer 200 mM Lösung aus Heptinsäure (25.2 mg/mL), DIC (**6**) (25.2 mg/mL), HOBt (**8**) (26.8 mg/mL) in DMF für 16 h umgesetzt. Nach **AAV 12** wurden die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten entfernt und gemäß **AAV 19** wurden die immobilisierten HA-Peptide mit NH<sub>3</sub> über Nacht abgespalten und nach **AAV 22** wurden die abgespaltenen HA-Peptide auf die eine azidierte Oberfläche **76** innerhalb von 6 h oder 16 h transferiert und mit einer Lösung aus 250  $\mu$ L einer Lösung von CuSO<sub>4</sub>  $\times$  5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat in H<sub>2</sub>O und DMSO gekuppelt. Gemäß **AAV 18** wurde in

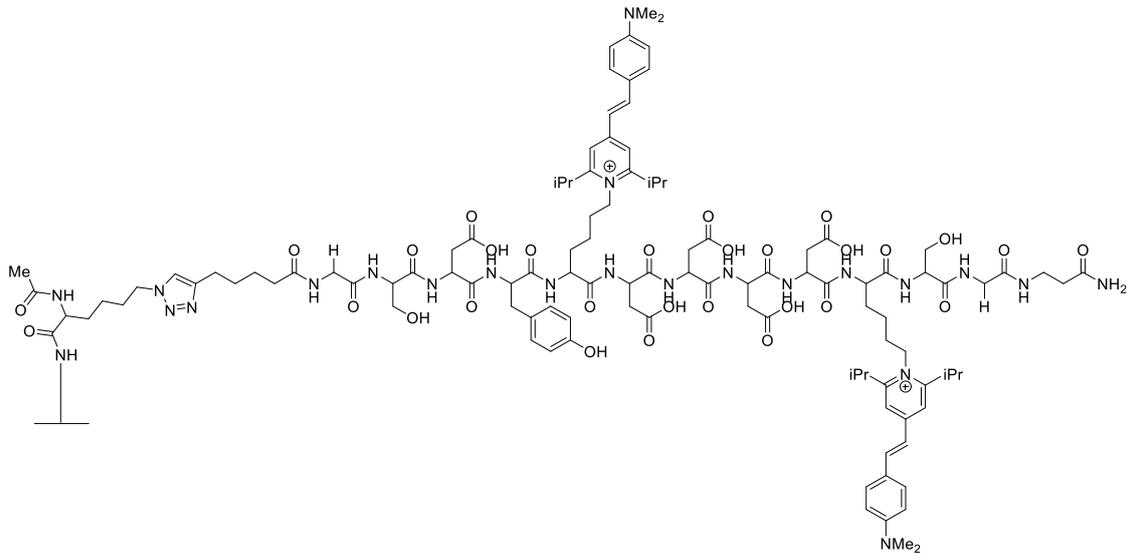
## 202 Experimenteller Teil

einer Petrischale eine Anti-HA-*DyLight* 680 Färbung durchgeführt und die transferierten Peptide via Fluoreszenz detektiert.

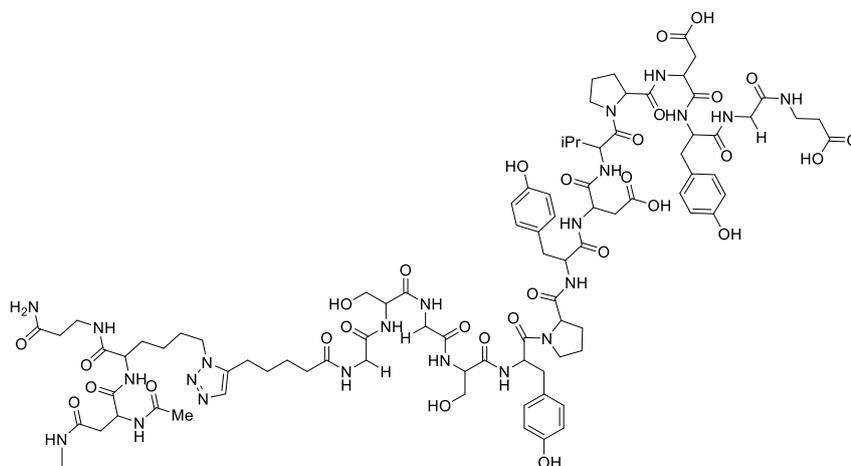
### $\beta$ A-GSKDDDDKYDGS-Heptinsäure-Ac-Lys-Array (**80**):



Nach **AAV 10** wurde ein (GSDYKDDDDKSG)<sub>p</sub>- $\beta$ A-PEGMA-Array (Array-Layout: 1) mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) in einer Petrischale entschützt. Die freien Amine wurden nach **AAV 13** mit 1.00 mL einer 200 mM Lösung aus Heptinsäure (25.2 mg/mL), DIC (25.2 mg/mL), HOBt (**8**) (26.8 mg/mL) in DMF für 16 h zur Reaktion gebracht. Nach **AAV 12** wurden die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten entfernt und nach **AAV 19** wurden die immobilisierten HA-Peptide mit NH<sub>3</sub> über Nacht abgespalten (die Oberfläche wurde nach der Reaktion mit DMF und MeOH gewaschen) und nach **AAV 22** wurden die abgespaltenen Peptide auf die eine azidierte Oberfläche **76** innerhalb von 6 h oder 16 h transferiert und mit einer Lösung aus 250  $\mu$ L CuSO<sub>4</sub>  $\times$  5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat in H<sub>2</sub>O und DMSO an die Oberfläche immobilisiert. Gemäß **AAV 18** wurde in einer Petrischale eine Anti-FLAG-*DyLight* 800 Färbung durchgeführt und die transferierten Peptide via Fluoreszenz detektiert.

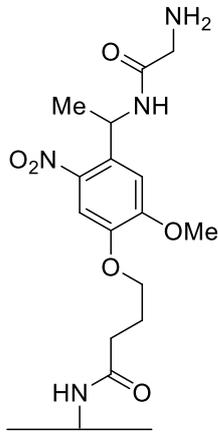
*βA-GSKDDDDKYDGS (SPyry)-Heptinsäure-Ac-Lys-Array (85):*

Nach **AAV 10** wurde ein *GSDYKDDDDKSG-βA-10:90-PEGMA-co-MMA-Array* (Array-Layout: 2) mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF in einer Petrischale entschützt. Die freien Amine wurden nach **AAV 13** mit 1.00 mL einer 200 mM Lösung aus Heptinsäure (25.2 mg/mL), DIC (**6**) (25.2 mg/mL), HOBt (**8**) (26.8 mg/mL) in DMF für 16 h zur Reaktion gebracht. Nach **AAV 12** wurden die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten entfernt und gemäß **AAV 17** wurde die Oberfläche mit 10.0 mL (*E*)-4-(4-(Dimethylamino)styryl)-2,6-diisopropylpyrylium-hexafluorophosphat (SPyry) in PBS-T (1:10 000) bei RT inkubiert. Nach **AAV 19** wurden die immobilisierten HA-Peptide über Nacht mit NH<sub>3</sub> abgespalten und nach **AAV 22** wurden die abgespaltenen HA-Peptide auf die eine azidierte Oberfläche **76** innerhalb von 6 h oder 16 h transferiert und mit einer Lösung aus 250 μL CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat in H<sub>2</sub>O und DMSO gekuppelt. Gemäß **AAV 18** wurde in einer Petrischale eine Anti-FLAG-DyLight 800 Färbung durchgeführt und die transferierten Peptide via Fluoreszenz detektiert.

*βA-GSAYDPVDYPYGS-Heptinsäure-BiFl*-oberflächengebunden (**137**):

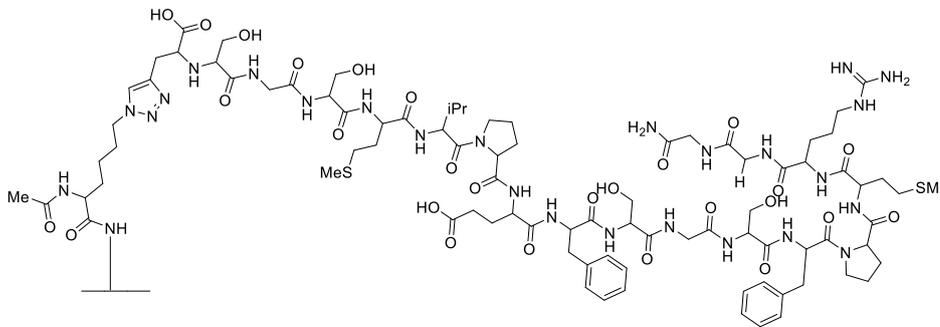
Nach **AAV 10** wurde ein (GSYPYDVPDYASG)<sub>p</sub>-βA-10:90-PEGMA-co-MMA-Array (Array-Layout 2) mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) in einer Petrischale entschützt. Die freien Amine wurden nach **AAV 13** mit 1.00 mL einer 200 mM Lösung aus Heptinsäure (25.2 mg/mL), DIC (25.2 mg/mL), HOBt (**8**) (26.8 mg/mL) in DMF für 16 h zur Reaktion gebracht. Nach **AAV 12** wurden die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten abgespalten und gemäß **AAV 19** wurden die immobilisierten HA-Peptide über Nacht mit NH<sub>3</sub> abgespalten und nach **AAV 22** wurden die abgespaltenen HA-Peptide auf eine Oberfläche, die nach **AAV 12** mit 250 μL einer 50.0 mM Lösung aus bifunktionalem Linker **121** (20.0 mg/mg), DIC (**6**) (6.30 mg/mg), HOBt (**8**) (6.70 mg/mg) in DMF umgesetzt wurde, innerhalb von 6 h oder 16 h transferiert und mit einer Lösung aus 250 μL CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat in H<sub>2</sub>O und DMSO gekuppelt. Gemäß **AAV 18** wurde in einer Petrischale eine Anti-HA-DyLight 680 Färbung durchgeführt und das transferierte Peptid **137** via Fluoreszenz detektiert.

(NH<sub>2</sub>-Gly-Photo-Linker)-oberflächengebunden (**207**):



Nach **AAV 10** wurde eine Fmoc-NH-βAla-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) in einer Petrischale entschützt und nach **AAV 13** und **AAV 14** mit 250 μL einer 50.00 mM Lösung von Fmoc-Photo-Linker (**36**) (54.0 mg/mL), HBTU (**14**) (19.0 mg/mL), DIPEA (6.70 mg/mL), HOBt (**8**) (6.80 mg/mL) in DMF für 16 h umgesetzt. Die Oberfläche wurde gemäß **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 4 h acetyliert und nach **AAV 10** mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF entschützt. Das freie Amin wurde nach **AAV 31** und **AAV 14** mit 250 μL einer 50.0 mM Lösung von Fmoc-Gly-OPfp (**102**) (46.3 mg/mL) in DMF für 4 h amidiert. Die noch freien Amine wurden nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach **AAV 10** mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF für 20 min entschützt und die erfolgreiche Anknüpfung nach **AAV 22** spektrometrisch überprüft.

GGRMPFSGFEPVMSGGS-PropargylGly-Ac-Lys-oberflächengebunden (**208**):

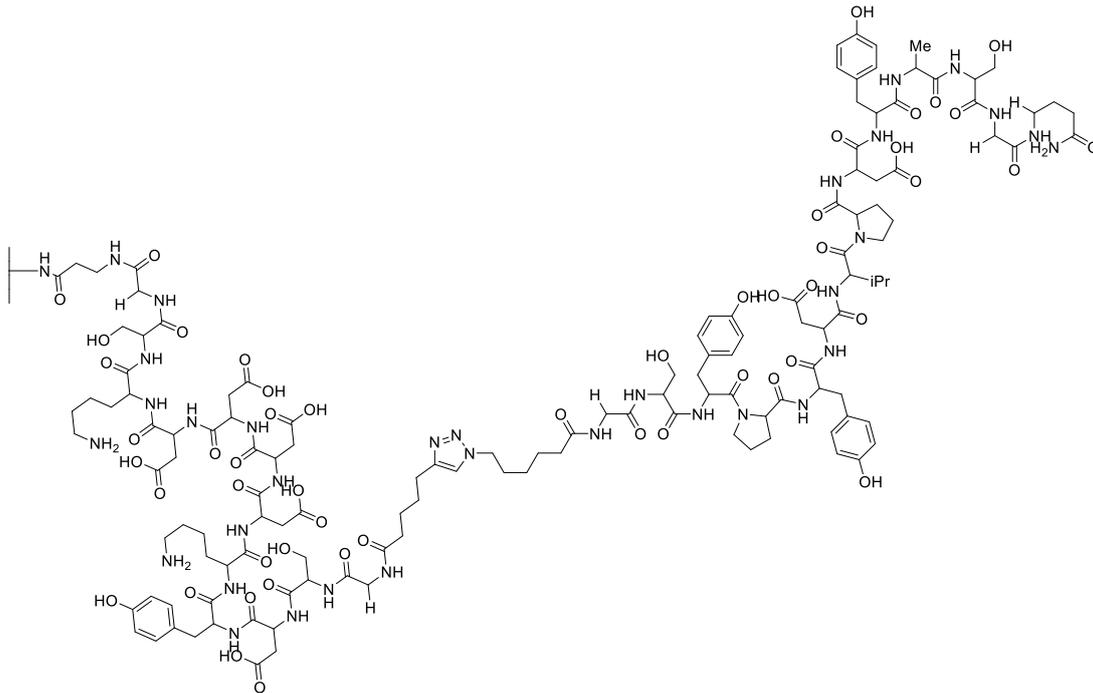


Ein NH<sub>2</sub>-Gly-Photo-Linker (**207**) wurde nach **AAV 24** und **25** mit Fmoc-Gly-OPfp (**102**) vorstrukturiert (Laser-Layout: 3; AB Schachbrettmuster, *Pitch* 1.00 mm), nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF für 4 h acetyliert und nach **AAV 10** mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF entschützt. Nach **AAV 13** und **AAV 14** wurde 2.50 mg Peptid 1 ((SGSMVPEFSGSFPMRG)<sub>p</sub>) mit 250 μL einer 50 mM Lösung aus HBTU (**14**) (19.0 mg/mL), DIPEA (6.70 mg/mL) und HOBt (**8**) (6.80 mg/mL) in DMF für 16 h umgesetzt. Die noch freien Amine wurden nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach **AAV 10** wurde die Fmoc-

Schutzgruppe mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF für 20 min entschützt. Nach **AAV 24** und **AAV 25** wurde auf Position A: Fmoc-Propargylglycin-OPfp und Spot B: Fmoc-Gly-OPfp (**102**) transferiert und gekuppelt. Die Oberfläche wurde gemäß **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 4 h acetyliert und nach **AAV 10** mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt. Gemäß **AAV 21** wurden die Peptide mit UV-Licht (365 nm) für 30 min abgespalten. Nach **AAV 22** wurde die angespaltenen Peptide auf eine *Ac-Ly*-10:90-PEGMA co-MMA Oberfläche (**76**) in 6 h transferiert und mit einer Lösung aus  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , Natriumascorbat in  $\text{H}_2\text{O}$  und DMSO an der Oberfläche immobilisiert. Nach **AAV 12** wurden die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten abgespalten und gemäß **AAV 18** wurde in einer Petrischale eine Seruminkubation durchgeführt und die transferierten Peptide via Fluoreszenz detektiert.

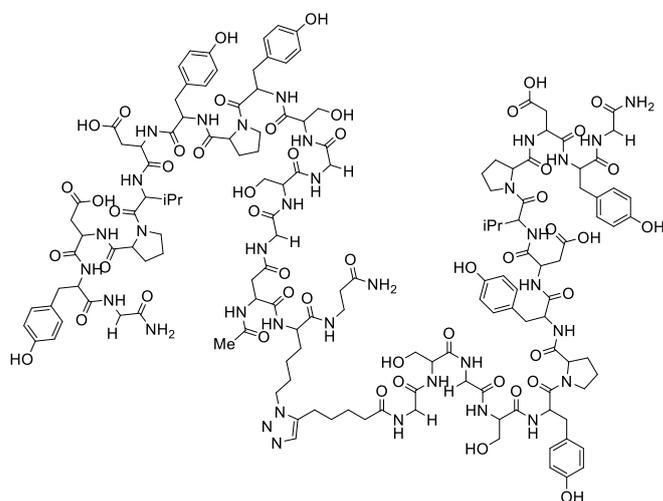
### 5.5.4. Synthese und Charakterisierung der Dipeptide *via* Transfermethode

$\beta$ A-GSAYDPVDYSG-Heptinsäure-Ac-Lys-GSDYKDDDDKSG- $\beta$ A-oberflächengebunden (209):



Nach **AAV 10** wurde ein (GSYPYDVPDYASG)<sub>p</sub>- $\beta$ A-10:90-PEGMA-co-MMA Array (Array 4) mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) in einer Petrischale entschützt. Die freien Amine wurden nach **AAV 13** mit 1.00 mL einer 200 mM Lösung aus Heptinsäure (25.2 mg/mL), DIC (**6**) (25.2 mg/mL) und HOBt (**8**) (26.8 mg/mL) in DMF für 16 h umgesetzt. Nach **AAV 12** wurden die säurelabilen Schutzgruppen abgespalten. Nach **AAV 19** wurden die immobilisierten HA-Peptide mit NH<sub>3</sub> über Nacht abgespalten. Nach **AAV 22** wurden die abgespaltenen Peptide auf einen Ac-Lys-GSDYKDDDDKSG- $\beta$ A-10:90-PEGMA-co-MMA Array (Array 5) innerhalb von 6 h oder 16 h transferiert und mit einer Lösung aus CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat in H<sub>2</sub>O und DMSO an der Oberfläche immobilisiert. Gemäß **AAV 18** wurde in einer Petrischale eine Anti-FLAG-DyLight 800 Färbung durchgeführt und die transferierten Peptide *via* Fluoreszenz detektiert.

*GAYDPVDYPYSGSG-Heptinsäure-BiLi-GSGSYPYDVPDYA-G*-oberflächengebunden  
(138):



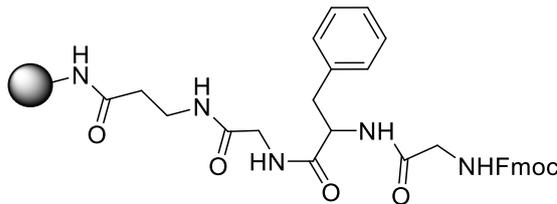
Ein  $\text{NH}_2$ -Gly-Rink-Linker- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde mit 2.50 mg Peptid ((GSGSYPYDVPDYA)<sub>p</sub>) nach **AAV 13** und **AAV 14** mit 250  $\mu\text{L}$  einer 50 mM Lösung aus HBTU (**14**) (19.0 mg/mL), DIPEA (6.70 mg/mL), HOBt (**8**) (6.80 mg/mL) in DMF für 16 h umgesetzt. Die noch freien Amine

wurden nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach **AAV 10** wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) für 20 min entschützt. Die freien Amine wurden nach **AAV 12** mit 1.00 mL einer 200 mM Lösung aus Heptinsäuresäure (25.2 mg/mL), DIC (**6**) (25.2 mg/mL), HOBt (**8**) (26.8 mg/mL) in DMF für 16 h umgesetzt. Nach **AAV 20** wurden die immobilisierten HA-Peptide mit TFA-Dampf für 10 min abgespalten und nach **AAV 22** wurden die abgespaltenen HA-Peptide auf die eine  $\text{NH}_2$ -Rink-Amid-GSGSYPYDVPDYA-Oberfläche, die zuvor nach **AAV 12** mit 250  $\mu\text{L}$  einer 50.0 mM Lösung aus bifunktionalem Linker **132** (20 mg/mg), DIC (**6**) (6.30 mg/mg) und HOBt (**8**) (6.70 mg/mg) in DMF umgesetzt wurde, innerhalb von 16 h transferiert und mit einer Lösung aus 250  $\mu\text{L}$   $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , Natriumascorbat in  $\text{H}_2\text{O}$  und DMSO an der Oberfläche immobilisiert. Gemäß **AAV 20A** wurde das Rohprodukt von der Oberfläche mit 1.00 mL einer Lösung aus 51% TFA, 2.5% TIBS, 2.5%  $\text{H}_2\text{O}$  in DCM (v/v/v/v) innerhalb von 30 min abgespalten. Die Protein-ähnliche Struktur wurde massenspektrometrisch nachgewiesen.

– MALDI,  $\text{C}_{146}\text{H}_{195}\text{N}_{37}\text{O}_{48}$   $m/z$  = ber.3238.38; gef. 3239.6  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

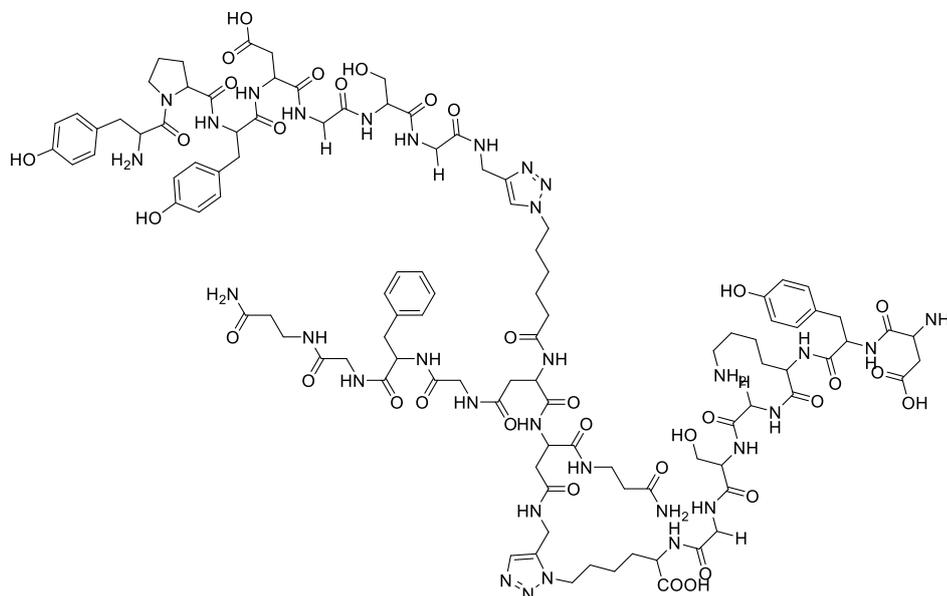
### 5.5.5. Synthese und Charakterisierung der an der festen Phase (Harz) erzeugten Protein-ähnlichen Strukturen

*GFGβA*-polymergebunden (**141**):



Nach *AAV 1* wurden 149 mg Fmoc-Rink-Amid-Harz (**32**) (100  $\mu\text{mol}$ ) in DMF für 1 h gequollen, mit  $3 \times 1.50$  mL 20% Piperidin in DMF (v/v) für 45 min entschützt und gemäß *AAV 3* wurden 93.4 mg Fmoc- $\beta$ -Ala-OH (300  $\mu\text{mol}$ ), 93.0  $\mu\text{L}$  DIC (600  $\mu\text{mol}$ ) und nach 5 min 40.5 mg HOBt (**8**) (300  $\mu\text{mol}$ ) in 1.50 mL DMA hinzugegeben und für 16 h umgesetzt. Nach *AAV 1* das Harz mit  $3 \times 1.50$  mL 20% Piperidin in DMF (v/v) in 45 min entschützt und gemäß *AAV 3* wurden 83.7 mg Fmoc-Gly-OH (300  $\mu\text{mol}$ ), 93.0  $\mu\text{L}$  DIC (**6**) (600  $\mu\text{mol}$ ) und nach 5 min 40.5 mg HOBt (**8**) (300  $\mu\text{mol}$ ) in 15.0 mL DMA hinzugegeben und für 16 h geschüttelt. Nach *AAV 1* wurde erneut mit 20% Piperidin in  $3 \times 1.50$  mL DMF für 45 min entschützt und gemäß *AAV 3* wurden 110 mg Fmoc-Phe-OPfp (200  $\mu\text{mol}$ ) in 1.50 mL DMA hinzugegeben und für 16 h umgesetzt. Nach *AAV 1* wurde erneut mit  $3 \times 1.50$  mL 20% Piperidin in DMF (v/v) in 45 min entschützt und gemäß *AAV 3* wurden 92.6 mg Fmoc-Gly-OPfp (**102**) (200  $\mu\text{mol}$ ) in 1.50 mL DMF hinzugegeben und für 16 h umgesetzt. Abschließend wurde nach *AAV 1* erneut mit  $3 \times 1.50$  mL 20% Piperidin in DMF (v/v) in 45 min entschützt.

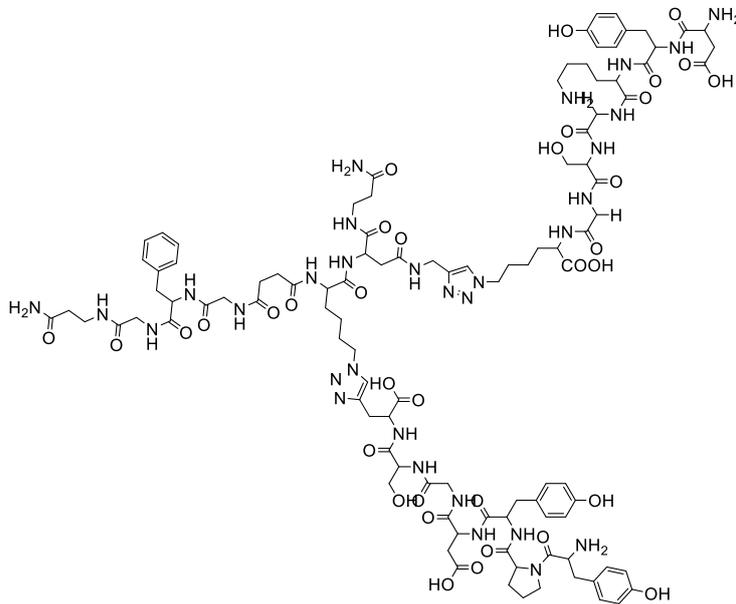
*Protein-ähnliche Struktur* ( $\beta$ AGFG-, DYKGSG-Lys(N<sub>3</sub>), YPYDGS-(Propargyl)Gly, TriL1) (**146**):



Nach **AAV 3** wurden 5.00 mg GFG $\beta$ A-Rink-Amid-Harz **141** (2.50  $\mu$ mol) in einer Einwegsspritze mit Fritte vorgelegt und 5.47 mg trifunktionaler Linker **121** (7.50  $\mu$ mol) gelöst in 250  $\mu$ L DMF hinzugegeben. Dann wurden 1.89 mg DIC (**6**) (15.0  $\mu$ mol) und 1.01 mg HOBt (**8**) (7.50  $\mu$ mol) nach 5 min hinzugefügt und für 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach **AAV 5** wurde das Harz mit 2.50 mg Peptid 2 (YPYDGS-Propargylglycin) mit 1.56 mg CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O (6.25  $\mu$ mol), 2.97 mg Natriumascorbat (15.0  $\mu$ mol) in 250  $\mu$ L H<sub>2</sub>O/DMF (1:3) für 16 h umgesetzt. Nach **AAV 6** wurde die Silyl-Schutzgruppe mit 1.00 mL Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) in THF für 5 h abgespalten. Dann wurde nach **AAV 5** Peptid 3 (DYKGSG-Lys(N<sub>3</sub>)) mit 1.56 mg CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O (6.25  $\mu$ mol), 2.97 mg Natriumascorbat (15.0  $\mu$ mol) in 250  $\mu$ L H<sub>2</sub>O/DMF (1:3) für 16 h an das Harz gekuppelt. Die Fmoc-Schutzgruppen wurde nach **AAV 1** mit 3 × 1.00 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) abgespalten. Abschließend wurde das Rohprodukt nach **AAV 9** vom Harz mit 1.00 mL einer Lösung von 51% TFA, 2.5% TIBS, 2.5% H<sub>2</sub>O in DCM (v/v/v/v) innerhalb von 2 h abgespalten. Die Protein-ähnliche Struktur wurde massenspektrometrisch verifiziert.

– MALDI, C<sub>105</sub>H<sub>146</sub>N<sub>32</sub>O<sub>34</sub>  $m/z$  = ber. 2400.1; gef. 2401.5 [M + H]<sup>+</sup>.

Protein-ähnliche Struktur ( $\beta$ AGFG-, DYKGS-G-Lys(N<sub>3</sub>), YPYDGS-Propargylglycin, TriL2) (**148**):

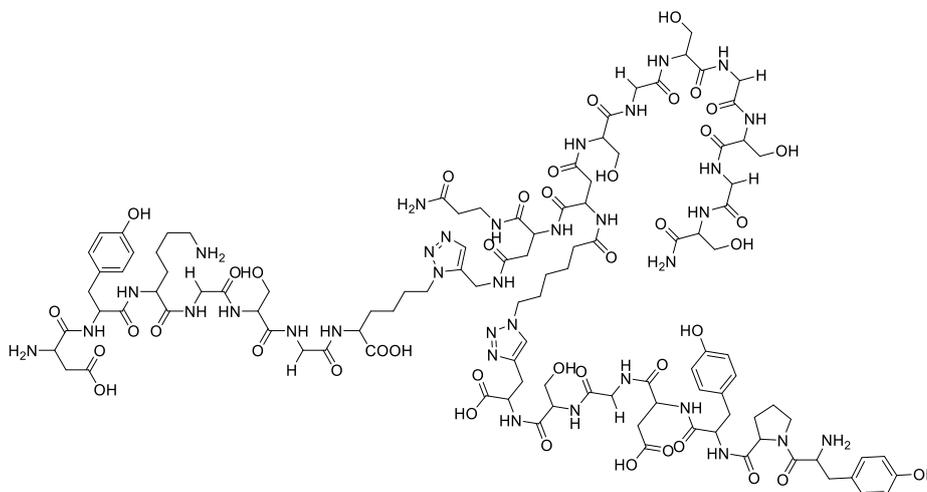


Nach **AAV 3** wurde 5.00 mg Peptid 1 (GFG $\beta$ A)-Rink-Amid Harz (**141**) (2.50  $\mu$ mol) in einer Einwegspritze mit Fritte vorgelegt und 4.89 mg trifunktionale Linker **121** (7.50  $\mu$ mol) gelöst in 250  $\mu$ L DMF hinzugegeben. Dann wurde 1.89 mg DIC (**6**) (15.0  $\mu$ mol) und nach 5 min 1.01 mg HOBt (**8**) (7.50  $\mu$ mol) hinzugefügt und für 16 h bei

Raumtemperatur geschüttelt. Nach **AAV 5** wurde das Harz mit 2.50 mg Peptid 2 (YPYDGS-Propargylglycin) mit 1.56 mg CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O (6.25  $\mu$ mol), 2.97 mg Natriumascorbat (15.0  $\mu$ mol) in 250  $\mu$ L H<sub>2</sub>O/DMF (1:3) für 16 h umgesetzt. Nach **AAV 6** wurde die Triisopropylsilyl-Schutzgruppe mit 1.00 mL TBAF in THF in 5 h abgespalten. Dann wurde nach **AAV 5** das Harz mit Peptid 3 (DYKGS-G-Lys(N<sub>3</sub>)), 1.56 mg CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O (6.25  $\mu$ mol), 2.97 mg Natriumascorbat (15.0  $\mu$ mol) in 62  $\mu$ L H<sub>2</sub>O und 187  $\mu$ L DMF (1:3) für 16 h geschüttelt. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde nach **AAV 1** mit 3 × 1.00 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) abgespalten. Abschließend wurde das Rohprodukt nach **AAV 9** vom Harz mit 1.00 mL einer Lösung aus 51% TFA, 2.5% TIBS, 2.5% H<sub>2</sub>O in DCM (v/v/v/v) innerhalb von 2 h abgespalten. Die Protein-ähnliche Struktur **148** wurde massenspektrometrisch verifiziert.

– MALDI, C<sub>105</sub>H<sub>145</sub>N<sub>31</sub>O<sub>35</sub>  $m/z$  = ber. 2401.5; gef. 2402.0 [M + H]<sup>+</sup>.

*Protein-ähnliche Struktur* (SGSGSGS, DYKGS<sub>3</sub>G-Lys (N<sub>3</sub>), YPYDGS-Propargylglycin, TriL1) (**149**):

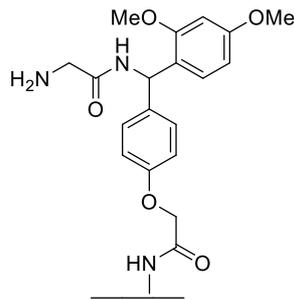


In einer Spritze mit Fritte wurden 5.00 mg Rink-Amid-Harz (**32**) (2.50  $\mu$ mol) nach **AAV 1** mit  $3 \times 1.00$  mL 20% Piperidin in DMF (v/v) für jeweils 15 min entschützt. Nach **AAV 3** wurde 2.50 mg Peptid 1 (SGSGSGS) in 250  $\mu$ L DMF gelöst und 1.89 mg DIC (**6**) (15.0  $\mu$ mol) und nach 5 min 1.01 mg HOBt (**8**) (7.50  $\mu$ mol) hinzugegeben und für 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach **AAV 3** wurden 4.89 mg trifunktionaler Linker **121** (7.50  $\mu$ mol) in 250  $\mu$ L DMF gelöst und 1.89 mg DIC (**6**) (15.0  $\mu$ mol) und nach 5 min 1.01 mg HOBt (**8**) (7.50  $\mu$ mol) hinzugegeben und für 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach **AAV 5** wurde das Harz mit 2.50 mg Peptid 2 (YPYDGS-Propargylglycin) mit 1.56 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  (6.25  $\mu$ mol), 2.97 mg Natriumascorbat (15.0  $\mu$ mol) in 250  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}$  und DMF (1:3) für 16 h umgesetzt. Nach **AAV 6** wurde die Triisopropylsilyl-Schutzgruppe mit 1.00 mL TBAF in THF für 30 min entfernt. Dann wurde nach **AAV 5** das Harz mit dem Peptid 3 (DYKGS<sub>3</sub>G-Lys(N<sub>3</sub>)), 1.56 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  (6.25  $\mu$ mol), 2.97 mg Natriumascorbat (15.0  $\mu$ mol) in 250  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}$  und DMF (1:3) für 16 h geschüttelt. Das Harz wurde nach **AAV 1** mit  $3 \times 1.00$  mL 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt. Anschließend wurde das Rohprodukt nach **AAV 9** vom Harz mit 1.00 mL einer Lösung von 51% TFA, 2.5% TIBS, 2.5%  $\text{H}_2\text{O}$  in DCM (v/v/v/v) innerhalb von 2 h abgespalten. Die Protein-ähnliche Struktur wurde massenspektrometrisch verifiziert.

– MALDI,  $\text{C}_{107}\text{H}_{154}\text{N}_{34}\text{O}_{42}$   $m/z = [\text{M} + \text{H}]^+$  ber. 2588.5; gef. 2588.0.

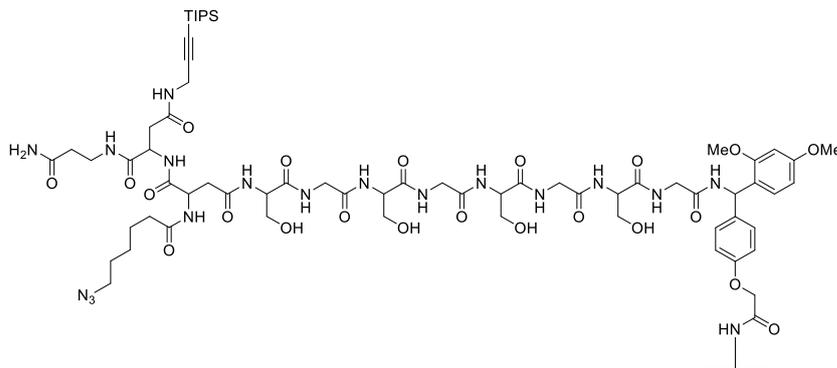
### 5.5.6. Synthese und Charakterisierung der an der festen Phase synthetisierten Protein-ähnlichen Strukturen (Oberfläche)

(NH<sub>2</sub>-Gly-Rink-Linker)-oberflächengebunden (**210**):



Nach **AAV 10** wurde eine 10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) in einer Petrischale entschützt und nach **AAV 13** und **AAV 14** mit 250 µL einer 100 mM Lösung von Fmoc-Rink-Amid-Linker (**37**) (54.0 mg/mL), Pentafluorophenol (**13**) (18.4 mg/mL) und DIC (**6**) (12.6 mg/mL) in DMF für 16 h umgesetzt. Die Oberfläche wurde gemäß **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 4 h acetyliert und nach **AAV 10** mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) entschützt. Das freie Amin wurde nach **AAV 13** und **AAV 12** mit 250 µL einer 50.0 mM Lösung von Fmoc-Gly-OPfp (**102**) (46.3 mg/mL) in DMF für 4 h amidiert. Die noch freien Amine wurden nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach **AAV 10** mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF für 20 min entschützt und die erfolgreiche Anknüpfung nach **AAV 22** spektrometrisch überprüft.

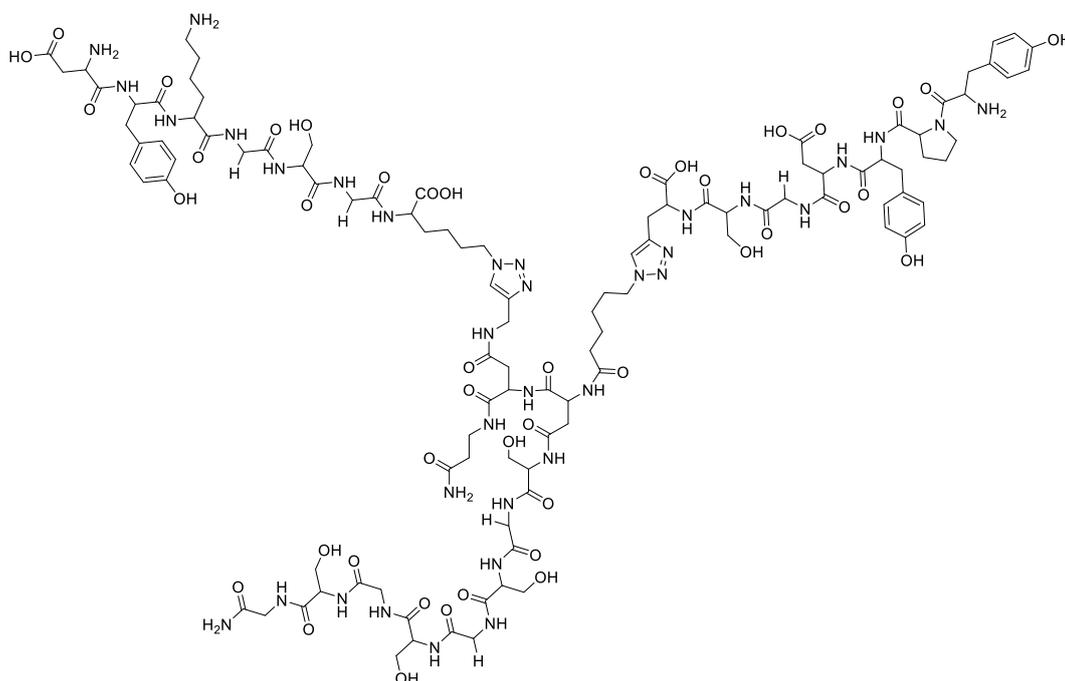
TriL1-SGSGSGS-G-Rink-Linker-oberflächengebunden (**211**):



Ein NH<sub>2</sub>-Gly-Rink-Linker (**210**) wurde mit 2.50 mg Peptid 1 (SGSGSGS)<sub>p</sub> nach **AAV 13** und **AAV 14** mit 250 µL einer 50 mM Lösung aus HBTU (**14**) (19.0 mg/mL), DIPEA (6.70 mg/mL) und HOBt (**8**) (6.80 mg/mL) für 16 h in DMF umgesetzt. Die noch freien

Amine wurden nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach **AAV 10** wurde die Oberfläche mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) für 20 min entschützt. Die freien Amine wurden nach **AAV 12** mit 250  $\mu$ L einer 50.0 mM Lösung aus trifunktionalem Linker **132** (32.5 mg/mL), DIC (**6**) (6.30 mg/mL), HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF umgesetzt.

*Protein-ähnliche Struktur (SGSGSGS; TriL1; YPYDGS-Propargylglycin; DYKGSGLys(N<sub>3</sub>),) (156):*

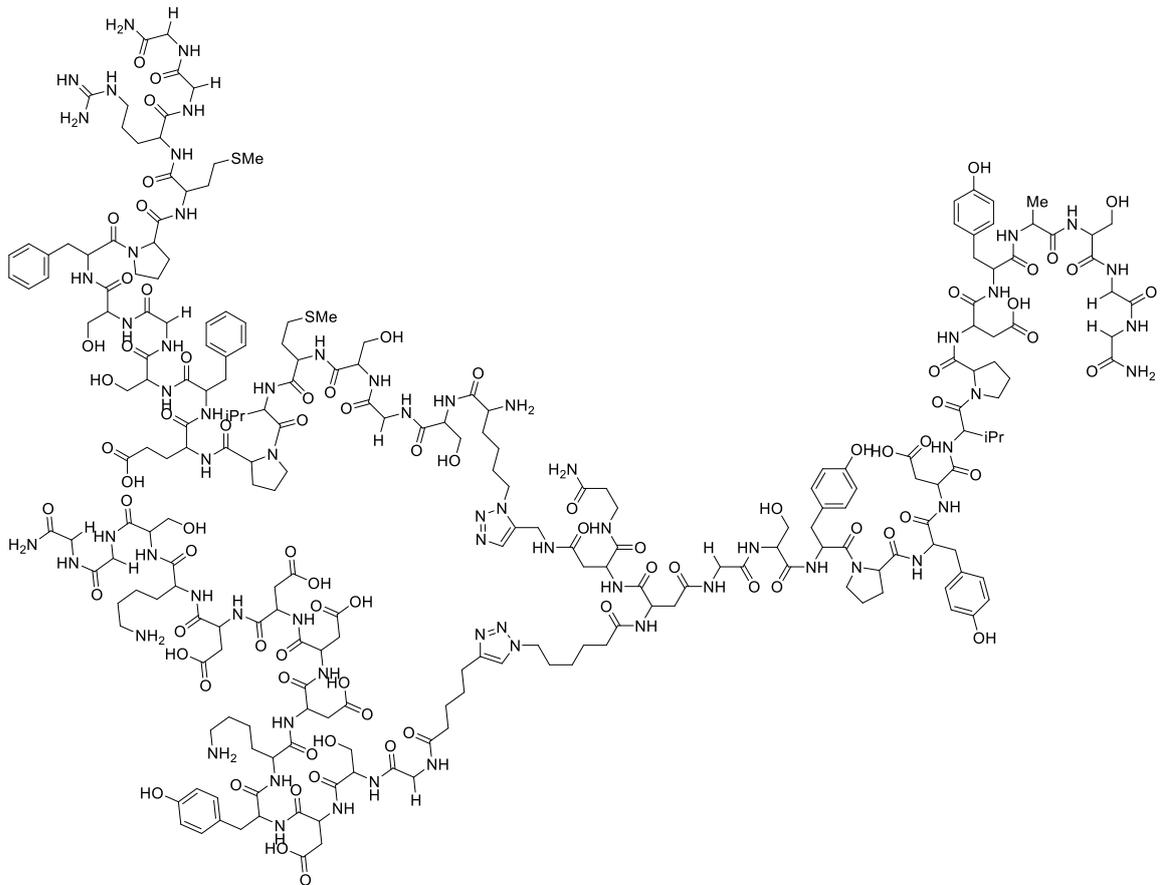


Nach **AAV 16** wurde die azidierte Oberfläche **211** mit 2.50 mg Peptid 2 (YPYDGS-Propargylglycin) mit 250  $\mu$ L einer Lösung aus  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  und Natriumascorbat in 50%  $\text{H}_2\text{O}$  und 50% DMSO (v/v) für 16 h umgesetzt. Nach **AAV 15** wurde die Triisopropylsilyl-Schutzgruppe mit 1.00 mL TBAF in THF für 15 min abgespalten. Dann wurde nach **AAV 16** Peptid 3 (DYKGSGLys(N<sub>3</sub>)) mit 250  $\mu$ L einer Lösung von  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , Natriumascorbat in 50%  $\text{H}_2\text{O}$  und 50% DMSO (v/v) für 16 h umgesetzt. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde nach **AAV 10** mit 10.0 mL einer Lösung aus 20% Piperidin in DMF(v/v) abgespalten. Gemäß **AAV 20A** wurde das Rohprodukt nach **AAV 20A** mit 1.00 mL einer Lösung von 51% TFA, 2.5% TIBS, 2.5%  $\text{H}_2\text{O}$  in DCM

(v/v/v/v) innerhalb von 30 min von der Oberfläche abgespalten. Die Protein-ähnliche Struktur **157** wurde massenspektrometrisch verifiziert.

– MALDI,  $C_{109}H_{157}N_{35}O_{43}$   $m/z = [M + H]^+$  ber. 2645.45; gef. 2645.8.

*Protein-ähnliche Struktur (GSYPYDVPDYAGS; TriL1; NH<sub>2</sub>-Propargylglycin-GSDYKDDDDKAGS; NH<sub>2</sub>-Lys(N<sub>3</sub>)-SGSMVPEFSGSFPMRG) (157):*



Eine NH<sub>2</sub>-Gly-Rink-Linker-βAla-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 13** und **14** mit 250 μL einer 50.0 mM Lösung aus Peptid (2.50 mg HA (GSYPYDVPDYAGS)<sub>p</sub>), HBTU (**14**) (19.0 mg/mL), DIPEA (6.80 mg/mL) und HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF für 16 h inkubiert. Die noch vorhandenen Amine wurden nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach **AAV 10** wurde das Harz mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF für 20 min entschützt. Die freien Amine wurden nach **AAV 12** mit 250 μL einer 50.0 mM Lösung aus trifunktionalem Linker **132** (32.5 mg/mL), DIC (**6**) (6.30 mg/mL) und HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF umgesetzt.

Eine zweite Oberfläche wurde vorbereitet, indem eine NH<sub>2</sub>-Photo-Linker-Gly-PEGMA-co-MMA Oberfläche nach *AAV 13* und *14* mit 250 µL einer 50.0 mM Lösung aus Peptid (2.5 mg, FLAG (GSDYKDDDDKAGS)<sub>p</sub>), HBTU (**14**) (19.0 mg/mL), DIPEA (6.80 mg/mL) und HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF für 16 h inkubiert wurde. Die noch vorhandenen Amine wurden nach *AAV 11* mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach *AAV 10* wurde das Harz mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF für 20 min entschützt. Die freien Amine wurden nach *AAV 13* mit 1.00 mL einer 200 mM Lösung aus Heptinsäure (26.0 mg/mL), DIC (25.2 mg/mL) und HOBt (**8**) (26.8 mg/mL) in DMF für 16 h umgesetzt.

Nach *AAV 20* wurden die immobilisierten HA-Peptide mit TFA-Dampf für 5 min abgespalten und nach *AAV 22* wurden die abgespaltenen HA-Peptide innerhalb von 6 h auf die FLAG-Oberfläche transferiert und mit 250 µL einer Lösung von CuSO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat in 50% H<sub>2</sub>O und 50% DMSO (v/v) gekuppelt. Die noch freien Alkine wurden nach *AAV 16* mit Azidoessigsäure (**113**) (22.0 mg/mL), CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat in 62.0 µL H<sub>2</sub>O und 187 µL DMF in 16 h umgesetzt. Nach *AAV 15* wurde die Triisopropylsilyl-Schutzgruppe mit 1.00 mL TBAF (1.00 M in THF) in 15 min abgespalten.

Eine dritte Oberfläche wurde vorbereitet. Dazu wurde eine NH<sub>2</sub>-Gly-Rink-Linker-βAla-PEGMA-co-MMA Oberfläche nach *AAV 13* und *14* mit 250 µL einer 50.0 mM Lösung aus Peptid 3 (2.50 mg (SGSMVPEFSGSFPMRG)), HBTU (**14**) (19.0 mg/mL), DIPEA (6.80 mg/mL) und HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF für 16 h inkubiert. Die noch vorhandenen Amine wurden nach *AAV 11* mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach *AAV 10* wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) für 20 min abgespalten. Die freien Amine wurden nach *AAV 12* und *13* mit 250 µL einer 50.0 mM Lösung aus Fmoc-Lys-N<sub>3</sub>OH (**110**) (19.7 mg/mL), DIC (6.30 mg/mL), HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF umgesetzt. Die noch vorhandenen Amine wurden nach *AAV 11* mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach *AAV 10* wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF für 20 min abgespalten.

Nach *AAV 21* wurden die immobilisierten Dipeptide mit UV-Licht bei 365 nm in 30 min abgespalten. Gemäß *AAV 22* wurden die abgespaltenen Dipeptide innerhalb von 6 h auf

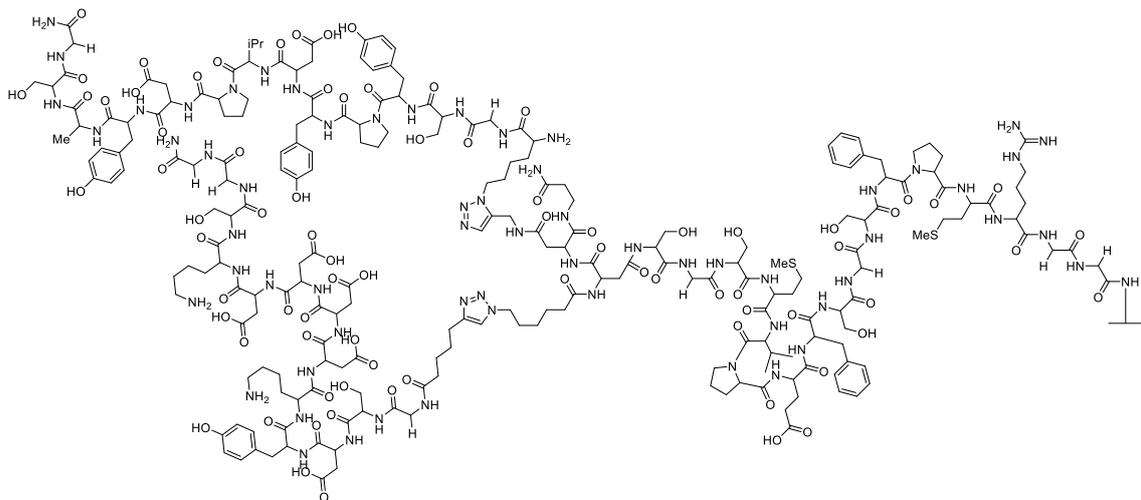
die Peptid-3-Oberfläche transferiert und mit 250  $\mu\text{L}$  einer Lösung von  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , Natriumascorbat in  $\text{H}_2\text{O}$  und DMSO an der Oberfläche immobilisiert.

Gemäß **AAV 20A** wurde das Rohprodukt mit 1.00 mL einer Lösung von 51% TFA, 2.5% TIBS, 2.5%  $\text{H}_2\text{O}$  in DCM (v/v/v/v) innerhalb 30 min von der Oberfläche abgespalten. Die Protein-ähnliche Struktur **157** wurde massenspektrometrisch verifiziert.

– MALDI,  $\text{C}_{225}\text{H}_{326}\text{N}_{64}\text{O}_{80}\text{S}_2$   $m/z$  = ber. 5271.5; gef. 5294.1 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ .

### 5.5.7. Synthese der synthetisierten Protein-ähnlichen Strukturen an der festen Phase im Arrayformat

*Protein-ähnliche Struktur* (SGSMVPEFSGSFPMRG; TriL1;  $\text{NH}_2$ -Propargylglycine-GSYPYDVPDYAGS;  $\text{NH}_2$ -Lys( $\text{N}_3$ )-GSDYKDDDDKAGS) (**212**):



Nach **AAV 10** wurde eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF in einer Petrischale entschützt und nach **AAV 22** und **23** mit Fmoc-Gly-OPfp (**102**) vorstrukturiert (Kreise). Die noch vorhandenen Amine wurden nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach **AAV 10** wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF für 20 min entfernt. Nach **AAV 13** und **14** wurde die Oberfläche mit 250  $\mu\text{L}$  einer 50.0 mM Lösung aus Peptid 1 (2.50 mg (SGSMVPEFSGSFPMRG) $_p$ ), HBTU (**14**) (19.0 mg/L), DIPEA (6.80 mg/mL) und HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF für 16 h inkubiert. Die noch vorhandenen Amine wurden nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20%

DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert. Nach **AAV 10** wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) für 20 min entfernt, und die Oberfläche nach **AAV 12** mit 250  $\mu$ L einer 50.0 mM Lösung aus trifunktionalem Linker **132** (32.5 mg/mL), DIC (**6**) (6.30 mg/mL), und HOBt (**8**) (6.70 mg/mg) in DMF umgesetzt.

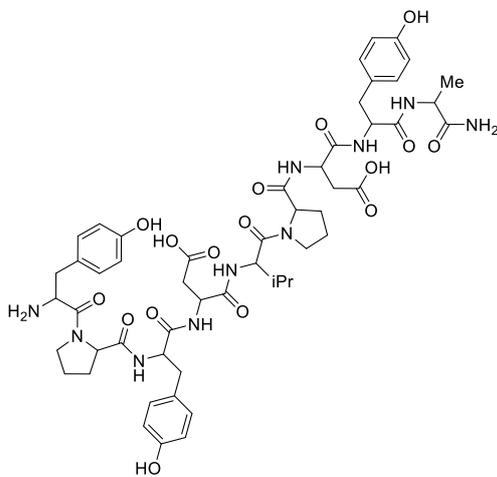
Eine zweite NH<sub>2</sub>-Photo-Linker-Gly-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 13** und **14** mit 250  $\mu$ L einer 50.0 mM Lösung aus Peptid 2 (2.5 mg (HA (GSYPYDVPDYAGS)<sub>p</sub>), HBTU (**14**) (19 mg/mL), DIPEA (6.80 mg/mL) und HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF für 16 h inkubiert. Die noch vorhandenen Amine wurden nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach **AAV 10** wurde die Oberfläche mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) für 20 min entschützt. Die freien Amine wurden nach **AAV 12** mit 1.00 mL einer 20 mM Lösung aus Heptinsäure (26.0 mg/mL), DIC (**6**) (25.2 mg/mL) und HOBt (**8**) (26.8 mg/mL) in DMF für 16 h umgesetzt. Nach **AAV 21** wurden die immobilisierten HA-Peptide mit UV-Licht bei 365 nm für 30 min abgespalten. Gemäß **AAV 22** wurden die abgespaltenen Peptide auf die Peptid-1-Oberfläche innerhalb von 6 h transferiert und mit 250  $\mu$ L einer Lösung von CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat in H<sub>2</sub>O und DMSO an der Oberfläche immobilisiert.

Eine dritte NH<sub>2</sub>-Gly-Photo-Linker-PEGMA-co-MMA Oberfläche **207** wurde nach **AAV 13** und **14** mit 250  $\mu$ L einer 50.0 mM Lösung aus Peptid 3 (2.50 mg, FLAG (GSDYKDDDDKAGS)<sub>p</sub>), HBTU (**14**) (19.0 mg/mL), DIPEA (6.80 mg/mL) und HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF für 16 h inkubiert. Die noch vorhandenen Amine wurden nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach **AAV 10** wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) für 20 min entschützt. Die freien Amine wurden nach **AAV 12** und **13** mit 250  $\mu$ L einer 50.0 mM Lösung aus Fmoc-Lys-N<sub>3</sub>-OH (**110**) (19.7 mg/mL), DIC (**6**) (6.30 mg/mL) und HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF umgesetzt. Die noch vorhandenen Amine wurden nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach **AAV 10** wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF für 20 min entfernt. Nach **AAV 21** wurden die immobilisierten FLAG-Peptide mit UV-Licht bei 365 nm in 30 min abgespalten und nach **AAV 22** auf die Dimer-Oberfläche innerhalb von 6 h transferiert und mit 250  $\mu$ L einer Lösung von CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat in H<sub>2</sub>O und DMSO gekuppelt. Nach **AAV 12** wurden die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten abgespalten und gemäß **AAV 18** wurde in einer Petrischale eine

Anti-FLAG-DyLight 800 Färbung und Anti-HA-DyLight 680 Färbung durchgeführt und die transferierten Peptide via Fluoreszenzscanner detektiert.

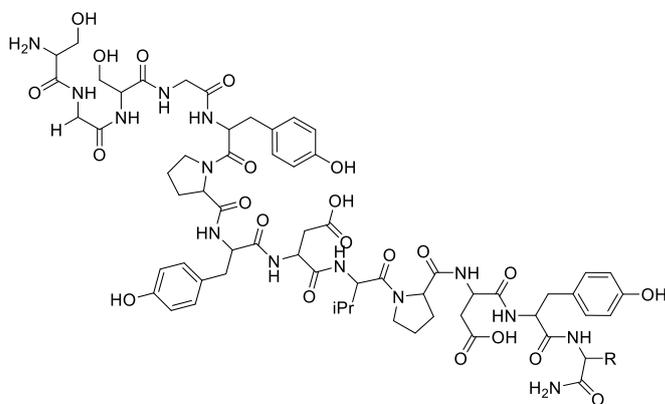
### 5.5.8. Laser-basierte Synthese und Charakterisierung von Peptidarrays

*Ac-YPYDVPDYA-G-Amid (159)*:



Für die Funktionalisierung einer (NH<sub>2</sub>-Rink-Linker)-PEGMA-co-MMA-Oberfläche wurden nach **AAV 24** die Donor-Oberflächen vorbereitet. Dazu wurden je 15.0 mg Fmoc-(Aminosäure)-(Tyr, Pro, Asp, Val oder Ala)-OPfp und 135 mg Matrix gelöst in 1.00 mL DCM verwendet. Nach **AAV 25** wurde der Lasertransfer mit Fmoc-Ala-OPfp (**90**) durchgeführt (Laser-Layout: 1; Bestrahlungsdauer: 5.00 ms; *Pitch*: 100 µm), bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen gekuppelt. Dann wurde nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) acetyliert und nach **AAV 10** wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 1.00 mL 20% Piperidin (v/v) in DMF für 20 min abgespalten und die Beladung spektrometrisch geprüft. Transfer, Kupplung, Acetylierung und Fmoc-Entschützung wurden nacheinander mit Fmoc-(Tyr, Asp, Pro, Val, Asp, Tyr, Pro oder Tyr)<sub>p</sub>-OH wiederholt. Zum Schluss wurde das Rohprodukt nach **AAV 20A** mit 1.00 mL einer Lösung von 51% TFA, 2.5% TIBS, 2.5% H<sub>2</sub>O in DCM (v/v/v/v) innerhalb 30 min von der Oberfläche abgespalten.

– MALDI: C<sub>53</sub>H<sub>68</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub> *m/z* = ber. 1001.4; gef., 1101.7 [M + H]<sup>+</sup>, 1123.5 [M + Na]<sup>+</sup> und 1139.5 [M + K]<sup>+</sup>.

*GSGSYPYDVPDY-Gly-Amid (163):*

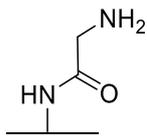
Für eine Vorstrukturierung einer (NH<sub>2</sub>-Rink) – βAla – PEGMA – co – MMA-Oberfläche wurden nach **AAV 24** die Donor-Oberflächen vorbereitet. Dazu wurde 15.0 mg Fmoc-Gly-OPfp (**102**) und 135 mg Matrix gelöst in 1.00 mL DCM verwendet. Nach **AAV 25** wurde der

Lasertransfer mit Fmoc-Gly-OPfp durchgeführt (Laser-Layout: 2, Bestrahlungsdauer: 15.0 ms, *Pitch* 1.00 mm), bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen zur Reaktion gebracht, und gewaschen. Dann wurde nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) acetyliert und nach **AAV 10** wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 1.00 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) für 20 min entfernt. Nach **AAV 13** und **14** wurde mit 250 μL einer 50.0 mM Lösung aus Peptid (2.50 mg, HA (GSGSYPYDVPDY)<sub>p</sub>), HBTU (**14**) (19.0 mg/mL), DIPEA (6.80 mg/mL), HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF für 16 h inkubiert. Die noch vorhandenen Amine wurden nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach **AAV 10** wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) für 20 min entfernt. Nach **AAV 12** wurden die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten entfernt. Zum Schluss wurde das Rohprodukt nach **AAV 21** von der Oberfläche mit UV-Bestrahlung (365 nm) in 40 min abgespalten. Gemäß **AAV 24** wurden 75.0 mg MALDI-Universal-Matrix in 1.00 mL gelöst und auf eine Oberfläche, die mit einer Kaptonfolie beschichtet wurde mittels Spin Coater aufgetragen. Nach **AAV 25** wurde die Matrix (Laser-Layout 2: *Pitch*: 1.00 mm, Bestrahlungsdauer: 15.0 ms) transferiert. Das Produkt konnte mit ortsaufgelöster MALDI-Massenspektrometrie verifiziert werden.

Glycin: –MALDI: C<sub>62</sub>H<sub>82</sub>N<sub>14</sub>O<sub>22</sub> *m/z* = ber. 1375.4; gef. 1398.5 [M + Na]<sup>+</sup> und 1414.5 [M + K]<sup>+</sup>.

### 5.5.9. Laser-basierte Synthese von Peptidarrays mit Sonderbausteinen auf einer PEGMA-co-MMA Oberfläche

*NH<sub>2</sub>-Gly*-oberflächengebunden (**103**):



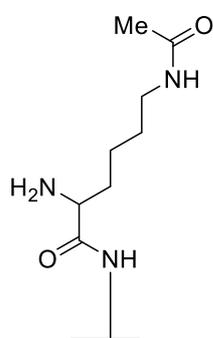
1) Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 10** entschützt.

2) Methode:

- a) Anschließend wurde nach **AAV 25** Fmoc-Gly-OPfp Laser-transferiert.
  - b) Anschließend wurde nach **AAV 25** Fmoc-Gly-OH (**164**), DIC (**6**) und HOBt (**8**) oder Oxyma Pure in der gewünschten Lagenreihenfolge Laser-transferiert.
  - c) Anschließend wurde nach **AAV 25** Fmoc-Gly-OH (**164**), DIC (**6**), PyBOP (**15**), DIPEA und HOBt (**8**) oder Oxyma Pure in der gewünschten Lagenreihenfolge Laser-transferiert.
  - d) Anschließend wurde nach **AAV 25** Fmoc-Gly-OH (**164**), DIC (**6**), EDC  $\times$  HCl und HOBt (**8**) oder Oxyma Pure in der gewünschten Lagenreihenfolge Laser-transferiert.
  - oder e) Anschließend wurde nach **AAV 25** Fmoc-Gly-OH (**164**), DIC (**6**), HBTU (**14**), DIPEA und HOBt (**8**) oder Oxyma Pure in der gewünschten Lagenreihenfolge Laser-transferiert.
- 3) Die Kupplung wurde bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen durchgeführt und anschließend wurden die Akzeptor-Oberfläche nach **AAV 11** acetyliert und nach **AAV 10** die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten.

Die Produkte wurden *via* Fluoreszenzmarkierung detektiert. Dazu wurde nach **AAV 17** die Oberfläche mit 10.0 mL TAMRA-NHS in PBS-T (1:10 000) bei RT inkubiert.

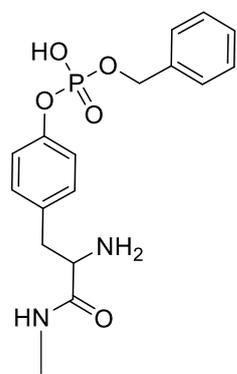
Die Donor-Oberflächen wurden nach **AAV 24** hergestellt. Die benötigten Reagenzienmengen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

*NH<sub>2</sub>*-(*Lys*(*Ac*))-oberflächengebunden (**165**):

Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 10** entschützt. Dann wurde nach **AAV 25** die Aminosäure (1. Lage), DIC (2. Lage) und HOBt (**8**) (3. Lage) Laser-transferiert (Laser-Layout: 4) und bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen mit den freien Aminen der Akzeptor-Oberfläche zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden die Akzeptor-Oberfläche nach **AAV 11** acetyliert und nach **AAV 10** die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten.

Das Produkt **165** wurde *via* Fluoreszenzmarkierung detektiert. Dazu wurde nach **AAV 17** die Oberfläche mit 10.0 mL TAMRA-NHS in PBS-T (1:10 000) bei RT inkubiert.

Die Donor-Oberflächen wurden nach **AAV 24** hergestellt. Die benötigten Reagenzienmengen sind in Tabelle 9 und 10 zusammengefasst.

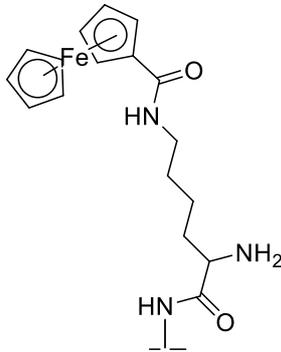
*NH<sub>2</sub>*-Fmoc-Tyr(*PO*(*OBZL*)-*OH*)-oberflächengebunden (**166**):

Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 10** entschützt. Anschließend wurde nach **AAV 25** die Aminosäure (1. Lage), DIC (**6**) (2. Lage) und HOBt (**8**) (3. Lage) Laser-transferiert (Laser-Layout: 4) und die Kupplung bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen durchgeführt. Anschließend wurden die Akzeptor-Oberfläche nach **AAV 11** acetyliert und nach **AAV 10** die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten.

Das Produkt **166** wurde *via* Fluoreszenzmarkierung detektiert. Dazu wurde nach **AAV 17** die Oberfläche mit 10.0 mL TAMRA-NHS in PBS-T (1:10 000) bei RT inkubiert.

Die Donor-Oberflächen wurden nach **AAV 24** hergestellt. Die benötigten Reagenzienmengen sind in Tabelle 9 und 10 zusammengefasst.

*NH<sub>2</sub>*-(*Lys*(*Ferrocen*))-oberflächengebunden (**167**):



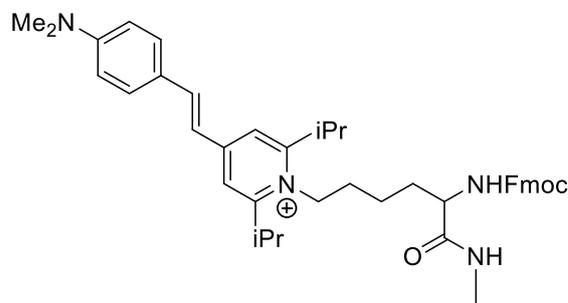
Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach *AAV 10* entschützt. Nach dem Transfer wurde die Akzeptor-Oberfläche nach *AAV 11* acetyliert und nach *AAV 10* die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Anschließend wurde nach *AAV 25* Fmoc-Lys(*Ferrocen*)-OPfp Laser-transferiert (Laser-Layout: 4) und die Kupplung bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen durchgeführt.

Das Produkt **167** wurde *via* Fluoreszenzmarkierung verifiziert. Dazu wurde nach *AAV 17* die Oberfläche mit 10.0 mL *DyLight 680* in PBS-T (1:10 000) bei RT inkubiert. Als eine Alternative wurde nach *AAV 13* und *AAV 14* Biotin-OPfp in DMF in 2 h angeknüpft und nach *AAV 17* wurde die Oberfläche mit 10.0 mL Streptavidin-*DyLight 800* in PBS-T (1:10 000) bei RT inkubiert.

Die Donor-Oberfläche wurde nach *AAV 24* hergestellt.

### 5.5.10. Laser-basierter Transfer und Kupplung von Fluorophoren mit auf einer PEGMA-co-MMA Oberfläche

*Fmoc-NH-Lys*(*SPyri*)-oberflächengebunden (**168**):



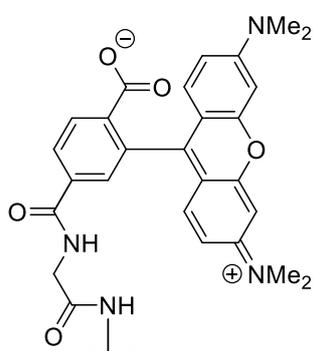
Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach *AAV 10* entschützt. Die Donor-Oberflächen wurden nach *AAV 24* mittels Spin Coater vorbereitet. Dazu wurden 5.00 mg Fmoc-NH-Lys- (4-(4-(Dimethylamino)

styryl)-2,6-diisopropylpyridinium(*SPyri*))-OPfp 20.0  $\mu$ L DMF und 145 mg Matrix 1.00 mL DCM verwendet.

Dann wurde nach **AAV 25** das Fluorophor (Fmoc-NH-Lys(SPyr)-OPfp) (1. Lage) Laser-transferiert (Laser-Layout: 4) und die Kupplung bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen durchgeführt.

Anschließend wurde die Akzeptor-Oberfläche nach **AAV II** acetyliert und die erfolgreiche Synthese *via* Fluoreszenz detektiert.

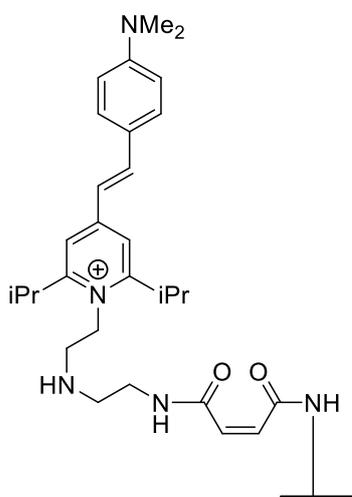
#### TAMRA-oberflächengebunden (**169**):



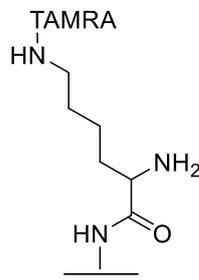
Eine Fmoc-Gly- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 10** entschützt. Die Donor-Oberfläche wurde nach **AAV 24** mittels Spin Coater vorbereitet. Dazu wurden 5.00 mg TAMRA-NHS in 20.0  $\mu$ L DMF und 145 mg Matrix 1.00 mL DCM verwendet.

Dann wurde nach **AAV 25** das Fluorophor (1. Lage) Laser-transferiert (Laser-Layout: 4) und die Kupplung bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen durchgeführt. Anschließend wurde die Akzeptor-Oberfläche nach **AAV II** acetyliert und die erfolgreiche Kupplung *via* Fluoreszenz verifiziert.

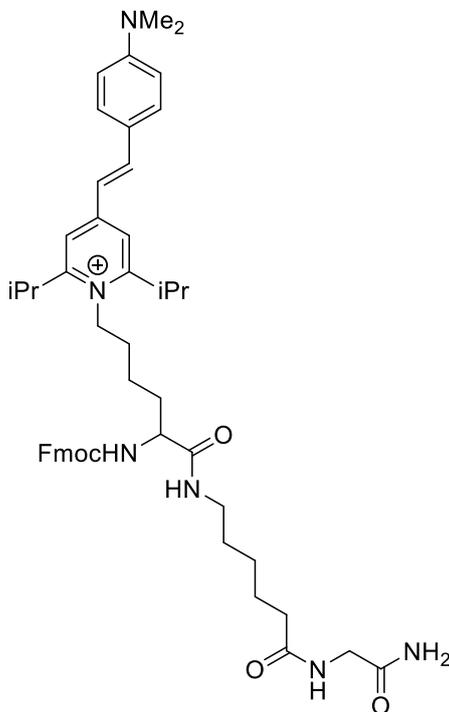
#### Spyri(ethylamin)-ethylisomaleimid-oberflächengebunden (**170**):



Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 10** entschützt. Die Donor-Oberflächen wurden nach **AAV 24** mittels Spin Coater vorbereitet. Dazu wurden 5.00 mg (Spyri(ethylamin)-ethylisomaleimid) in 20.0  $\mu$ L DMF und 145 mg Matrix 1.00 mL DCM verwendet. Dann wurde nach **AAV 25** das Fluorophor (Lage 1) Laser-transferiert (Laser-Layout: 4) und die Kupplung bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen durchgeführt. Anschließend wurde die Akzeptor-Oberfläche nach **AAV II** acetyliert und die erfolgreiche Kupplung *via* Fluoreszenz verifiziert.

*NH<sub>2</sub>*-(Lys(TAMRA))-oberflächengebunden (**171**):

Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 10** entschützt. Die Donor-Oberflächen wurden nach **AAV 24** mittels Spin Coater vorbereitet. Dazu wurden jeweils 15.0 mg Fmoc-Lys(TAMRA)-OH und 135 mg Matrix, 9.35  $\mu$ L DIC (**6**) (1.00 Äquiv.) und 142 mg Matrix oder 8.00 mg HOBt (**8**) gelöst in 20.0  $\mu$ L DMF und 142 mg Matrix, in 1.00 mL DCM verwendet. Dann wurde nach **AAV 25** Aminosäure (1. Lage), DIC (**6**) (2. Lage) und HOBt (**8**) (3. Lage) Laser-transferiert und die Kupplung bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen durchgeführt. Anschließend wurden die Akzeptor-Oberfläche nach **AAV 11** acetyliert und nach **AAV 10** die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Die erfolgreiche Synthese wurde *via* Fluoreszenz verifiziert.

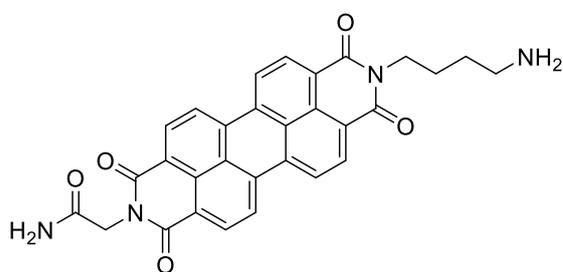
*Fmoc-NH<sub>2</sub>*-Lys(SP<sub>Yri</sub>)-Gly-Amid (**213**):

Eine (NH<sub>2</sub>-Gly-Rink)-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 13** mit einer 50.0 mM Lösung von Fmoc-Aminohexansäure (17.6 mg/mL), DIC (**6**) (6.30 mg/mL), HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF umgesetzt. Die noch vorhandenen Amine wurden nach **AAV 11** mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF (v/v/v) für 16 h acetyliert und nach **AAV 10** wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) für 20 min abgespalten. Die Donor-Oberflächen wurden nach **AAV 24** mittels Spin Coater vorbereitet. Dazu wurden 5.00 mg Fmoc-NH-Lys(SP<sub>Yri</sub>)-OPfp in 20.0  $\mu$ L DMF gelöst und 145 mg Matrix in 1.00 mL DCM verwendet. Dann wurde nach **AAV 25** das Fluorophor (Fmoc-NH-Lys(SP<sub>Yri</sub>)-OPfp) (Lage 1) Laser-transferiert (Laser-Layout: 1) und die Kupplung bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen durchgeführt. Anschließend wurde die

Akzeptor-Oberfläche nach **AAV II** acetyliert und die erfolgreiche Synthese mittels Fluoreszenz detektiert. Abschließend wurde das Rohprodukt nach **AAV 20A** mit 1.00 mL einer Lösung von 51% TFA, 2.5% TIBS, 2.5% H<sub>2</sub>O in DCM (v/v/v/v) von der Oberfläche innerhalb 30 min abgespalten. Das Produkt wurde massenspektrometrisch verifiziert.

– MALDI, C<sub>50</sub>H<sub>65</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> *m/z* = ber. 830.1; gef. 829.3 [M + H]<sup>+</sup>.

*2-(9-(4-aminobutyl)-1,3,8,10-tetraoxo-3,8,9,10-tetrahydroanthra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f']diisoquinolin-2(1H)-yl)acetamid (175):*

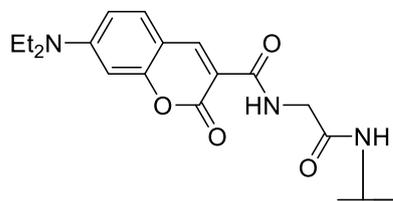


Eine (NH<sub>2</sub>-Gly-Rink)-  
βAla-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde  
nach **AAV 24** die Donor-Oberflächen  
vorbereitet. Dazu wurde 10.0 mg  
Perylen-3,4,9,10-tetracarboxylicdianhydrid  
(**173**) mit 100 μL DMF versetzt und 140 mg

Matrix gelöst in 900 μL DCM verwendet. Nach **AAV 25** wurde der Lasertransfer mit der vorbereiteten Donor-Oberfläche durchgeführt (Laser Layout: 1, Bestrahlungsdauer: 5.00 ms, *Pitch*: 100 μm). Die Kupplung wurde bei ca. 130 °C für 4 h durchgeführt. Dann wurde mono-Boc-diaminobutan (**174**) Laser-transferiert und die Kupplung bei 90 °C für 30 min durchgeführt. Zum Schluss wurde das Rohprodukt nach **AAV 20A** mit 1.00 mL einer Lösung von 51% TFA, 2.5% TIBS, 2.5% H<sub>2</sub>O in DCM (v/v/v/v) innerhalb 30 min von der Oberfläche abgespalten. Das bläuliche Produkt **175** konnte massenspektrometrisch verifiziert werden.

– MALDI: C<sub>30</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> *m/z* = ber. 518.5; gef. 519.2, [M + H]<sup>+</sup>, 541.3[M + Na]<sup>+</sup>.

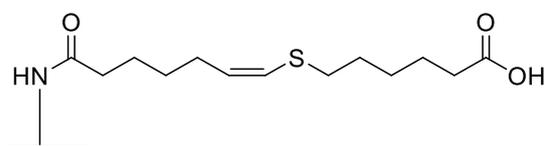
*N*-(2-amino-2-oxoethyl)-7-(diethylamino)-2*H*-chromene-3-carboxamid-  
oberflächengebunden (**182**):



Eine (NH<sub>2</sub>-Gly-Rink)-βAla-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 13** mit einer 200 mM Lösung von Oxmya Pure (28.4 mg/mL), DIC (**6**) (25.2 μL/mL) und mono-Ethyl-malonat (26.4 mg/mL) 1.00 mL DMF für 16 h umgesetzt. Dann wurden nach **AAV 24** die Donor-Oberflächen vorbereitet. Dazu wurde 44.2 mg 4-Diethylaminosalicylaldehyd (4.00 Äquiv.), 37.0 μL Pyridin (8.00 Äquiv.) oder 17.0 mg Piperidin (3.00 Äquiv.) in Matrixmaterial gelöst in 1.00 mL DCM verwendet. Nach **AAV 25** wurde der Lasertransfer mit 4-Diethylaminosalicylaldehyd (1. Lage), Pyridin (2. Lage), Piperidin (3. Lage) durchgeführt (Bestrahlungsdauer: 5 ms, *Pitch*: 100 μm). Anschließend wurde die Kupplung bei ca. 90 °C für 21 h durchgeführt und für 3 × 30 s Aceton, 1 × 30 s DMSO, 1 × 30 s DMF und 1 × 30 sec Aceton im Ultraschallbad gewaschen. Das Produkt **182** wurde *via* Fluoreszenz nachgewiesen.

### 5.5.11. Laser-basierte Synthese von Sonderbausteinen auf einer PEGMA-co-MMA Oberfläche

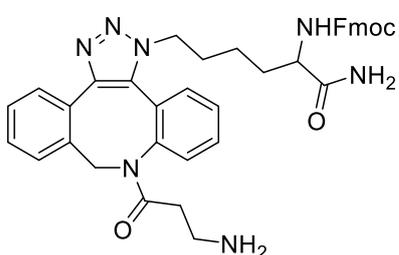
(*Z*)-6-((7-Amino-7-oxohept-1-en-1-yl)thio)hexansäure (**184**):



Eine Fmoc-NH-βAla-10:90-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 10** entschützt. Die freien Amine wurde nach **AAV 13** mit 1.00 mL einer 200 mM Lösung aus Heptinsäure (25.2 mg/mL), DIC (**6**) (25.2 mg/mL) und HOBt (**8**) (26.8 mg/mL) in DMF für 16 h umgesetzt. Dann wurde die Donor-Oberfläche nach **AAV 24** mittels Spin Coater vorbereitet. Dazu wurden 8.46 mg Mercaptohexansäure und 141 mg F1518-Matrix in 1.00 mL DCM verwendet. Dann wurde nach **AAV 25** das Thiol (1. Lage) Laser-transferiert. Die Kupplung wurde bei ca. 60 °C und UV-Bestrahlung (365 nm) für 1 h durchgeführt.

Das Produkt **184** wurde durch eine Fluoreszenzmarkierung detektiert. Dazu wurde nach *AAV 17* die Oberfläche mit 10.0 mL Styrylpyridinium-Dye-NH<sub>2</sub> (1:10 000) und einer 50.0 mM Lösung von DIC (**6**) (6.00 µL/mL) und HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF bei RT inkubiert.

*(9H-Fluoren-9-yl)methyl(1-amino-6-(8-(3-aminopropanoyl)-8,9-dihydro-3H-dibenzo[b,f][1,2,3]triazolo[4,5-d]azocin-3-yl)-1-oxohexan-2-yl)carbamate* (**186**):

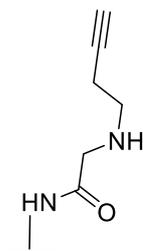


Eine (NH<sub>2</sub>-Rink)-βAla-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach *AAV 13* und *AAV 14* mit 250 µL einer 50.0 mM Lösung von Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH (**110**) (19.7 mg/mL), HBTU (**14**) (19.0 mg/mL), DIPEA (6.70 mg/mL), HOBt (**8**) (6.80 mg/mL) in DMF für 16 h umgesetzt. Die Oberfläche wurde gemäß *AAV 11* mit 10.0 mL 10% ESA, 20% DIPEA in DMF für 4 h acetyliert. Die Donor-Oberfläche wurde nach *AAV 24* mittels Spin Coater vorbereitet. Dazu wurden 5.00 mg Dibenzocyclooctin-amin und 145 mg Matrix in 1.00 mL DCM verwendet. Dann wurde nach *AAV 25* das Alkin (1. Lage) Laser-transferiert. Die Kupplung wurde bei 90 °C für 90 min im Ofen durchgeführt. Abschließend wurde das Rohprodukt nach *AAV 20A* mit 1.00 mL einer Lösung von 51% TFA, 2.5% TIBS, 2.5% H<sub>2</sub>O in DCM (v/v/v/v) innerhalb 30 min von der Oberfläche abgespalten. Das Produkt **186** wurde massenspektrometrisch verifiziert.

– MALDI, C<sub>39</sub>H<sub>39</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub> *m/z* = ber. 669.3; gef. 670.3 [M + H]<sup>+</sup>, 692.3 [M + Na]<sup>+</sup>.

### 5.5.12. Laser-basierte Darstellung von Peptoidarrays auf einer PEGMA-co-MMA Oberfläche mittels Submonomer Methode

2-(But-3-in-1-ylamino)acetamid-oberflächengebunden (**189**):



a) Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 10** entschützt. Im ersten Schritt wurden nach **AAV 26** DIC (**6**), dann BrAcOH (**37**) und dann erneut DIC (**6**) Laser-transferiert und bei 90 °C im Ofen für 60 min zur Reaktion gebracht. Dann wurde das Aminobutin (**187**) nach **AAV 27** transferiert, und im Ofen bei 90 °C für 60 min gekuppelt.

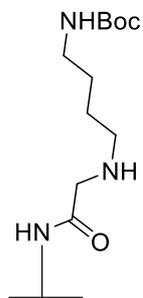
b) Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 10** entschützt. Im ersten Schritt wurden nach **AAV 26** BrAcOH (**37**) und dann das DIC (**6**) auf die Oberfläche Laser-transferiert und dann bei 90 °C im Ofen für 90 min mit den freien Aminen zur Reaktion gebracht. Dann wurde das Aminobutin (**187**) nach **AAV 27** Laser-transferiert und im Ofen bei 90 °C für 60 min, in einer DCM-Atmosphäre für 20 – 30 min oder in einer DMF-Atmosphäre für 20 – 30 min unter einer Glaskammer bei Raumtemperatur in einer nucleophilen Reaktion umgesetzt.

c) Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 10** entschützt. Im ersten Schritt wird nach **AAV 26** die aktivierte Bromessigsäure Laser-transferiert bei 90 °C im Ofen für 90 min zur Reaktion gebracht. Dann wurde das Aminobutin (**187**) nach **AAV 27** Laser-transferiert und im Ofen bei 90 °C für 60 min, in einer DCM-Atmosphäre für 10 – 20 min oder in einer DMF-Atmosphäre für 20 – 30 min unter einer Glaskammer bei Raumtemperatur in einer nucleophilen Reaktion umgesetzt.

Die Produkte wurden durch eine Fluoreszenzmarkierung verifiziert. Dazu wurde nach **AAV 17** die Oberfläche mit 250  $\mu$ L einer Reaktionslösung aus 2.00  $\mu$ L TAMRA-Azid, 3.80 mg Natriumascorbat, 3.10 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  in 125  $\mu$ L DMSO und 125  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}$ , bei RT über Nacht inkubiert.

Die Donor-Oberflächen wurden nach **AAV 24** hergestellt. Die benötigten Reagenzienmengen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

*tert*-Butyl(4-((2-amino-2-oxoethyl)amino)butyl)carbammat (**190**):

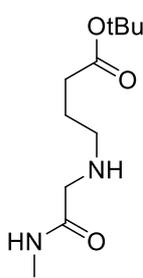


Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach *AAV 10* entschützt. Im ersten Schritt wurde nach *AAV 26* die aktivierte BrAcOH (**37**) Laser-transferiert und bei 90 °C im Ofen für 90 min zur Reaktion gebracht. Dann wurde das mono-Boc-diaminobutan (**174**) nach *AAV 27* Laser-transferiert, und im Ofen bei 90 °C für 60 min in einer nucleophilen Reaktion umgesetzt.

Anschließend wurden die Akzeptor-Oberfläche nach *AAV 11* acetyliert und nach *AAV 12* die säurenlabile Schutzgruppe entfernt. Das Produkt wurde durch eine Fluoreszenzmarkierung detektiert. Dazu wurde nach *AAV 17* die Oberfläche mit TAMRA-NHS oder *DyLight 680*-NHS (1:10 000) in PBS-T, bei RT inkubiert.

Die Donor-Oberflächen wurden nach *AAV 24* hergestellt. Die benötigten Reagenzienmengen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

*tert*-Butyl-4-((2-amino-2-oxoethyl)amino)butanoat (**214**):



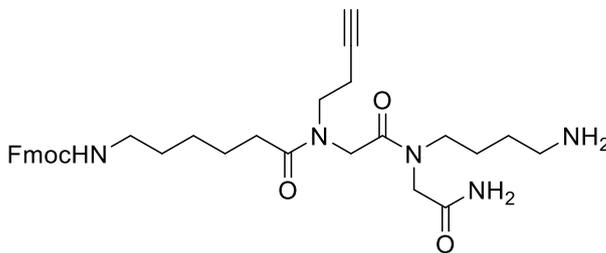
Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach *AAV 10* entschützt. Im ersten Schritt wurde nach *AAV 26* die aktivierte BrAcOH (**37**) Laser-transferiert bei 90 °C im Ofen für 90 min zur Reaktion gebracht. Dann wurde das mono-Boc-diaminobutan (**174**) nach *AAV 27* Laser-transferiert, und im Ofen bei 90 °C für 60 min zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden die Akzeptor-Oberfläche nach *AAV 11* acetyliert und nach *AAV 12*

die säurenlabile Schutzgruppen entfernt. Nach *AAV 13* wurde die Oberfläche mit mono-Boc-diaminobutan (**174**) für 2 h inkubiert. Nach *AAV 11* wurde acetyliert und nach *AAV 12* die säurenlabile Schutzgruppen abgespalten. Das Produkt wurde mittels Fluoreszenzmarkierung detektiert. Dazu wurde nach *AAV 17* die Oberfläche mit TAMRA-NHS oder *DyLight 680*-NHS (1:10 000) in PBS-T, bei RT inkubiert.

Die Donor-Oberflächen wurden nach *AAV 24* hergestellt. Die benötigten Reagenzienmengen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

### 5.5.13. Laser-basierte Darstellung und Charakterisierung von Peptoiden auf einer PEGMA-co-MMA Oberfläche

(9H-Fluoren-9-yl)methyl (6-((2-((2-amino-2-oxoethyl)(4-aminobutyl)amino)-2-oxoethyl)(but-3-in-1-yl)amino)-6-oxohexyl)carbamate (**195**):



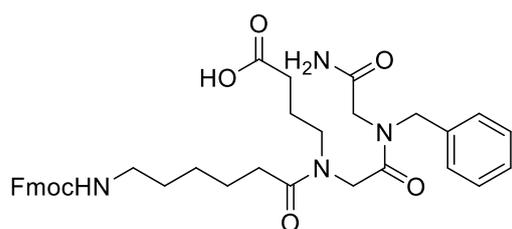
Auf eine NH<sub>2</sub>-Rink-βAla-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurden im ersten Kupplungsschritt nach **AAV 26** BrAcOH (**37**) und dann DIC (**6**) transferiert (Layout 1: *Pitch*: 100 μm;

Bestrahlungsdauer: 5.00 ms) und bei 90 °C im Ofen für 90 min mit den freien Aminen der Oberfläche umgesetzt. Dann wurde das mono-Boc-diaminobutan (**174**) nach **AAV 27** transferiert und im Ofen bei 90 °C für 90 min gekuppelt. Im zweiten Kupplungsschritt wurden nach **AAV 26** erneut BrAcOH (**37**) und dann DIC (**6**) transferiert und bei 90 °C im Ofen für 90 min zur Reaktion gebracht. Das Aminobutin (**187**) wurde nach **AAV 27** transferiert, und im Ofen bei 90 °C für 60 min zur Reaktion gebracht. Im dritten Kupplungsschritt wurde die Oberfläche nach **AAV 13** mit einer 1.00 mL einer 50.0 mM Lösung von Fmoc-Aminohexansäure (17.6 mg/mL), DIC (**6**) (6.30 mg/mL) und HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF über Nacht umgesetzt. Zum Schluss wurde das Rohprodukt nach **AAV 20A** von der Oberfläche mit 1.00 mL einer Lösung von 51% TFA, 2.5% TIBS, 2.5% H<sub>2</sub>O in DCM (v/v/v/v) innerhalb 30 min abgespalten und massenspektrometrisch analysiert.

– MALDI: C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> *m/z* = ber. 589.7; gef. 590.3 [M + H]<sup>+</sup>, 612.3 [M + Na]<sup>+</sup>.

Die Donor-Oberflächen wurden nach **AAV 24** hergestellt. Die benötigten Reagenzienmengen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

4-(6-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-N-(2-((2-amino-2-oxoethyl)(benzyl)amino)-2-oxoethyl)hexanamido)butanosäure (**194**):



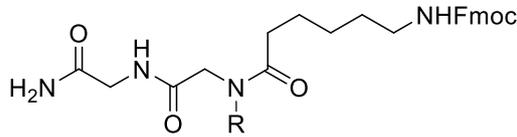
Auf eine  $\text{NH}_2$ -Rink- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurden im ersten Kupplungsschritt nach **AAV 26** BrAcOH (**37**) und dann DIC (**6**) Laser-transferiert (Layout 1; *Pitch*: 100  $\mu\text{m}$ , Bestrahlungsdauer: 5 ms) und bei 90 °C im Ofen

für 90 min mit den freien Aminen der Oberfläche umgesetzt. Dann wurde das Benzylamin nach **AAV 27** Laser-transferiert und im Ofen bei 90 °C für 90 min zur Reaktion gebracht. Im zweiten Kupplungsschritt wurden nach **AAV 26** erneut BrAcOH (**37**) und dann DIC (**6**) transferiert und bei 90 °C im Ofen für 90 min zur Reaktion gebracht. Die *tert*-Butyl-Aminobutansäure wurde nach **AAV 27** transferiert, und im Ofen bei 90 °C für 60 min gekuppelt. Im dritten Kupplungsschritt wurde die Oberfläche nach **AAV 13** mit einer 1.00 mL einer 50.0 mM Lösung von Fmoc-Aminohexansäure (17.6 mg/mL), DIC (6.30 mg/mL) und HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF über Nacht umgesetzt. Zum Schluss wurde das Rohprodukt nach **AAV 20A** mit 1.00 mL einer Lösung von 51% TFA, 2.5% TIBS, 2.5%  $\text{H}_2\text{O}$  in DCM (v/v/v/v) innerhalb 30 min von der Oberfläche abgespalten und massenspektrometrisch analysiert.

– MALDI:  $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_7$   $m/z$  = ber. 642.4; gef. 665.3  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 681.2  $[\text{M} + \text{K}]^+$ .

Die Donor-Oberflächen wurden nach **AAV 24** hergestellt. Die benötigten Reagenzienmengen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

(9H-Fluoren-9-yl)methyl(6-((2-((2-amino-2-oxoethyl)amino)-2-oxoethyl)(R)amino)-6-oxohexyl)carbamate (**196**):



R = Methoxyethyl-  
 R = Aminobutyl-  
 R = Carboxybutyl-  
 R = Propargyl-  
 R = Butinyl-  
 R = Fmoc-Aminopropyl-  
 R = Ethyl-naphtyl-  
 R = Azidopropyl-

Auf eine (NH<sub>2</sub>-Gly-Photo)-βAla-PEGMA-co-MMA Oberfläche **207** wurde im ersten Kupplungsschritt nach **AAV 26** BrAcOH (**37**) und dann DIC (**6**) Laser-transferiert (Laser-Layout: 7, *Pitch*: 100 μm, Bestrahlungsdauer: 5 ms, 10 Blöcke mit 1.00 cm<sup>2</sup>) und bei 90 °C im Ofen für 90 min mit den freien Aminen der Oberfläche umgesetzt. Dann wurden die Amine

(Aminobutin (**187**), Azidopropylamin, *tert*-Butyl-diaminobutansäure, mono-Boc-diaminobutan (**174**), MEA (**123**), Propargylamin (**114**), Naphtylethylamin oder *N*-Fmoc-1,3-Propyldiamin nach **AAV 27** transferiert und unter einer Glaskammer für 30 min in einer DCM-Atmosphäre zur Reaktion gebracht. Zum Schluss wurde das Rohprodukt nach **AAV 20** von der Oberfläche mit UV-Bestrahlung 365 nm in 30 min abgespalten. Die Oberfläche wurde nach **AAV 20** für 2 min mit TFA-Dampf inkubiert. Gemäß **AAV 24** wurde 75.0 mg MALDI-Universalmatrix in 1.00 mL gelöst und eine Kapton-Oberfläche mittels Spin Coater beschichtet. Nach **AAV 25** wurde die Matrix (Laser-Layout: 7; *Pitch*: 100 μm, Bestrahlungsdauer: 5.00 ms, 10 Blöcke mit 1.00 cm<sup>2</sup>) transferiert. Die Produkte konnten mit orts aufgelöster MALDI-Spektrometrie in einem Linienscan verifiziert werden.

-MALDI: C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> *m/z* = ber. 524.21; gef. 525.29 [M+H]<sup>+</sup>, 547.26 [M+Na]<sup>+</sup>, 563.23 [M+K]<sup>+</sup>.

-MALDI: C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> *m/z* = ber. 504.58; gef. 505.24 [M+H]<sup>+</sup>, 527.23 [M+Na]<sup>+</sup>, 543.19 [M+K]<sup>+</sup>. – MALDI: C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> *m/z* = ber. 537.66; gef. 538.30 [M+H]<sup>+</sup>, 560.28 [M+Na]<sup>+</sup>, 576.26 [M+K]<sup>+</sup>.

-MALDI: C<sub>39</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> *m/z* = ber. 552.52; gef. 553.27 [M+H]<sup>+</sup>, 575.25 [M+Na]<sup>+</sup>, 591.22 [M+K]<sup>+</sup>.

-MALDI: C<sub>29</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> *m/z* = ber. 518.60; gef. 519.22 [M+H]<sup>+</sup>, 541.24 [M+Na]<sup>+</sup>, 557.21 [M+K]<sup>+</sup>.

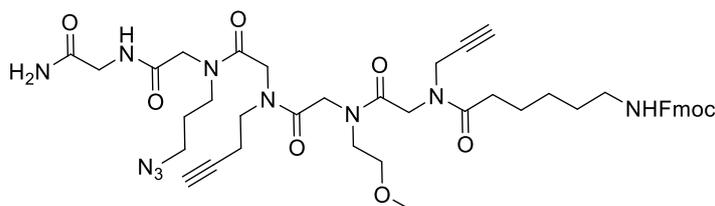
-MALDI:  $C_{43}H_{47}N_4O_5$   $m/z$  = ber. 745.86; gef. 745.35  $[M+H]^+$ , 768.33  $[M+Na]^+$ , 784.31  $[M+K]^+$ .

-MALDI:  $C_{37}H_{40}N_4O_5$   $m/z$  = ber. 620.74; gef. 621.21  $[M+H]^+$ , 643.328  $[M+Na]^+$ .

-MALDI:  $C_{28}H_{35}N_7O_5$   $m/z$  = ber. 549.62; gef. 550.28  $[M+H]^+$ , 572.26  $[M+Na]^+$ , 588.25  $[M+K]^+$ .

Die Donor-Oberflächen wurden nach **AAV 24** hergestellt. Die benötigten Reagenzienmengen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

(9H-Fluoren-9-yl)methyl (1-amino-6-(3-azidopropyl)-9-(but-3-yn-1-yl)-12-(2-methoxyethyl)-1,4,7,10,13,16-hexaoxo-15-(prop-2-yn-1-yl)-3,6,9,12,15-pentaazahenicosan-21-yl) carbamat (**200**):



Auf eine  $NH_2$ -Gly-Rink- $\beta$ Ala PEGMA-co-MMA Oberfläche wurden im ersten Kupplungsschritt nach **AAV 26** BrAc-ODNP (**40**) und dann DIC

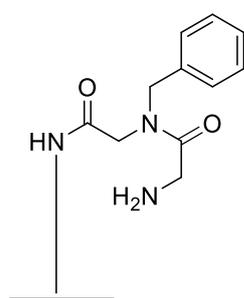
(**6**) transferiert (Layout 1; *Pitch*: 100  $\mu$ m, Bestrahlungsdauer: 5 ms) und bei 90 °C im Ofen für 90 min mit den freien Aminen der Oberfläche umgesetzt. Dann wurde das Azidopropylamin nach **AAV 27** transferiert und im Ofen bei 80 °C für 90 min zur Reaktion gebracht. Der zweite bis vierte Kupplungsschritt (Acylierung und nucleophile Substitution) wurde mit Aminobutin (**187**), MEA (**123**) und Propargylamin (**114**) durchgeführt. Im fünften Kupplungsschritt wurde die Oberfläche nach **AAV 13** mit 1.00 mL einer 50.0 mM Lösung von Fmoc-Aminohexansäure (17.6 mg/mL), DIC (**6**) (6.30 mg/mL), und HOBt (**8**) (6.70 mg/mL) in DMF über Nacht umgesetzt. Zum Schluss wurde das Rohprodukt nach **AAV 20A** mit 1.00 mL einer Lösung von 51% TFA, 2.5% TIBS, 2.5%  $H_2O$  in DCM (v/v/v/v) innerhalb 30 min von der Oberfläche abgespalten und massenspektrometrisch analysiert.

- MALDI:  $C_{44}H_{56}N_{10}O_9$   $m/z$  = ber. 868; gef. 907  $[M + K]^+$ .

Die Donor-Oberflächen wurden nach **AAV 24** hergestellt. Die benötigten Reagenzienmengen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

### 5.5.14. Laser-basierte Darstellung von Peptoidarrays auf einer PEGMA-co-MMA Oberfläche mittels der Monomer-Methode

*2-Amino-N-(2-amino-2-oxoethyl)-N-benzylacetamid (202)*:



Eine Fmoc-NH- $\beta$ Ala-PEGMA-co-MMA Oberfläche wurde nach **AAV 10** entschützt.

a) Nach **AAV 25** wurde Fmoc-*N*-Phe-OH (**201**) (1. Lage), DIC (**6**) (2. Lage) und HOBt (**8**) (3. Lage) Laser-transferiert und bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen mit den freien Aminen der Akzeptor-Oberfläche umgesetzt. Anschließend wurde die Akzeptor-Oberfläche nach **AAV 11** acetyliert und nach **AAV 10** die Fmoc-Schutzgruppen abgespalten. Dann wurde nach **AAV 3** die Oberfläche mit einer 50.0 mM Lösung von Fmoc-Gly-OPfp (**102**) in DMF umgesetzt.

Das Produkt **202** wurde mittels Fluoreszenz verifiziert. Dazu wurde nach **AAV 17** die Oberfläche mit 10.0 mL *DyLight* 680 in PBS-T (1: 10 000) bei RT inkubiert.

b) Nach **AAV 25** wurde Fmoc-*N*-Phe-OH (**201**) (1. Lage), PyBOP (**15**) (2. Lage), HOBt (**8**) (3. Lage) und DIPEA (4. Lage) Laser-transferiert und bei ca. 90 °C für 90 min im Ofen mit den freien Aminen der Akzeptor-Oberfläche umgesetzt. Anschließend wurden die Akzeptor-Oberfläche nach **AAV 11** für 4 h mit 10.0 mL Acetylierungslösung umgesetzt und nach **AAV 10** mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) die Fmoc-Schutzgruppen abgespalten. Anschließend wurde nach **AAV 13** die Oberfläche mit einer 50.0 mM Lösung von Fmoc-Gly-OPfp (**102**) in DMF umgesetzt. Anschließend wurden die Akzeptor-Oberfläche nach **AAV 11** für 4 h mit 10.0 mL Acetylierungslösung umgesetzt und nach **AAV 10** mit 10.0 mL 20% Piperidin in DMF (v/v) die Fmoc-Schutzgruppen abgespalten.

Das Produkt **202** wurde mittels Fluoreszenzmarkierung detektiert. Dazu wurde nach **AAV 17** die Oberfläche mit 10.0 mL *DyLight* 680 in PBS-T (1: 10 000) bei RT inkubiert.

Die Donor-Oberflächen wurden nach **AAV 24** hergestellt. Die benötigten Reagenzienmengen sind in Tabelle 9 und 10 zusammengefasst.

**Tabelle 9:** Zusammenfassung der benötigten Reagenzien und Lösungsmittel zur Erzeugung der Donor-Oberflächen für die Peptid-Synthese. Zuerst wurde DMF (falls es verwendet wurde) und dann die Matrix in DCM zur Reagenz hinzugegeben.

<b>Donor- nummer</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Masse/Volumen (Stoffmenge)</b>	<b>Masse der Matrix</b>	<b>Lösungsmittel</b>
<b>1</b>	Fmoc-Aminosäure-OPfp	15.0 mg	135 mg	1.00 mL DCM
<b>2</b>	Fmoc-Aminosäure-OH	15.0 mg	135 mg	40.0 $\mu$ L DMF 1.00 mL DCM
<b>3</b>	DIC ( <b>6</b> )	9.40 mg (56.0 $\mu$ mol)	142 mg	1.00 mL DCM
<b>4</b>	EDC $\times$ HCl	11.00 mg (56.0 $\mu$ mol)	139 mg	40.0 $\mu$ L DMF 1.00 mL DCM
<b>5</b>	HOBt ( <b>8</b> )	8.00 mg (56.0 $\mu$ mol)	142 mg	20.0 $\mu$ L DMF 1.00 mL DCM
<b>6</b>	Oxyma Pure	8.00 mg (56.0 $\mu$ mol)	142 mg	1.00 mL DCM
<b>7</b>	PyBOP ( <b>15</b> )	30.0 mg (56.0 $\mu$ mol)	120 mg	40.0 $\mu$ L DMF 1.00 mL DCM
<b>8</b>	HBTU ( <b>14</b> )	22.0 mg (56.0 $\mu$ mol)	128 mg	50.0 $\mu$ L DMF 1.00 mL DCM
<b>9</b>	DIPEA	19.6 mg (0.112 mmol)	130 mg	1.00 mL DCM

**Tabelle 10:** Zusammenfassung der benötigten Reagenzien und Lösungsmittel zur Erzeugung der Donor-Oberflächen für die Peptidsynthese.

<b>Donoren</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Masse (Stoffmenge)</b>	<b>Masse der Matrix</b>	<b>Lösungsmittel</b>
<b>1</b>	BrAcOH ( <b>37</b> )	15.6 mg (112 $\mu$ mol)	134 mg	1.00 mL DCM
<b>2</b>	BrAc-ODNP ( <b>40</b> )	17.2 mg (56.0 $\mu$ mol)	132 mg	1.00 mL DCM
<b>3</b>	BrAc-OPfp ( <b>41</b> )	34.8 mg (112 $\mu$ mol)	124 mg	1.00 mL DCM
<b>4</b>	BrAc-OSu ( <b>42</b> )	26.9 mg (112 $\mu$ mol)	115 mg	1.00 mL DCM
<b>5</b>	DIC ( <b>6</b> )	37.0 $\mu$ L (2.28 mmol)	130 mg	1.00 mL DCM
<b>6</b>	Aminobutin ( <b>187</b> )	8.00 mg (112 $\mu$ mol)	142 mg	1.00 mL DCM
<b>7</b>	Azidopropylamin	11.2 mg (112 $\mu$ mol)	139 mg	1.00 mL DCM
<b>8</b>	tert-Butyl-aminobutansäure	19.6 mg (112 $\mu$ mol)	130 mg	1.00 mL DCM
<b>9</b>	mono-Boc-diaminobutan ( <b>174</b> )	21.5 mg (112 $\mu$ mol)	129 mg	1.00 mL DCM
<b>10</b>	Methoxyethylamin ( <b>123</b> )	11.0 $\mu$ L (112 $\mu$ mol)	141 mg	1.00 mL DCM
<b>11</b>	Propargylamin ( <b>114</b> )	7.00 $\mu$ L (112 $\mu$ mol)	143 mg	1.00 mL DCM
<b>12</b>	Naphtylethylamin	19.6 mg (112 $\mu$ mol)	130 mg	1.00 mL DCM

---

<b>13</b>	<i>N</i> -Fmoc-1,3-Propyldiamin	32.8 mg (112 $\mu$ mol)	127 mg	50.0 $\mu$ L DMF 1.00 mL DCM
<b>14</b>	Benzylamin	12.0 mg (112 $\mu$ mol)	138 mg	1.00 mL DCM
<b>15</b>	Fmoc- <i>N</i> Phe-OH ( <b>201</b> )	15.0 mg	135 mg	50.0 $\mu$ L DMF 1.00 mL DCM

---

## 6. Abkürzungen

A	Alanin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyliert
AOM	Akustooptischer Modulator
Allyl	$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-$
APTES	Aminopropyl(triethoxy)silan
Äquiv.	Äquivalent(e)
Asp	Asparaginsäure
ber.	Berechnet
BiF1	3-Acetamido-4-((1-((3-amino-3-oxopropyl)amino)-6-azido-1-oxohexan-2-yl)amino)-4-oxobutansäure
BiF2	<i>N</i> -(9-(2-((2-((1-((1-((3-amino-3-oxopropyl)amino)-6-azido-1-oxohexan-2-yl)amino)-3-carboxy-1-oxopropan-2-yl)amino)-2-oxoethyl)(2-methoxyethyl)carbamoyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)- <i>N</i> -ethylethanaminium
Butyl	$\text{C}_4\text{H}_9$
Boc	Di-tert-butyl dicarbonat
$\beta$ Ala	$\beta$ -Alanin
BrAcOH	Bromessigsäure
bzgl.	Bezüglich
bs	breites Singulett
°C	Grad Celsius

## 240 Abkürzungen

CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
C <sub>quart</sub>	quarternäre Kohlenstoff-Atom
cLIFT	<i>Combinatorial Laser-induced forward transfer</i>
cm	Zentimeter
CuAAC	Kupfer katalysierte Azid Alkin Cycloaddition
Cys	Cystein
d	Dublett
D	Asparaginsäure
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dest.	destilliert
DFPA	Dibenzofulven-Piperidin-Addukt
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	2,4-Dinitrophenol
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
EE	Essigsäureethylester
EI-MS	Elektronenstoß-Ionisationsmassenspektrometrie
Et	Ethyl
ESI	Elektrospray-Ionisation
ESA	Essigsäureanhydrid
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
eV	Elektronenvolt

FAB-MS	<i>Fast atom bombardment mass spectroscopy</i>
Fmoc	9 <i>H</i> -Flouren-9-ylmethoxycarbonyl
FLAG	DYKDDDDK
g	Gramm
G	Glycin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
Gly	Glycin
h	Stunde
HA	YPYDVPDYA
His	Histidin
HBTU	<i>O</i> -Benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
IAAC	Institut für Anorganische und Analytische Chemie
IFG	Institut für funktionelle Grenzflächen
iPr	Isopropyl
IR	Infrarot-(Spektroskopie)
IMT	Institut für Mikrostrukturtechnik
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Kap.	Kapitel
kV	Kiloelektronenvolt
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
konz.	konzentriert
Lys	Lysin
M	molar

## 242 Abkürzungen

m	Multipllett
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption/ ionization</i>
mbar	Millibar
Me	Methyl
MEA	Methoxyethylamin
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
mHz	Megahertz
mL	Milliliter
$\mu$ L	Mikroliter
mm	Millimeter
MMA	Methylmethacrylat
$\mu$ m	Mikrometer
Mmol	Millimol
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
$\mu$ mol	Mikromol
<i>m/z</i>	Masseladungsverhältnis
N	Newton
NHS	<i>N</i> -Succinimidyl-ester
nm	Nanomol
NMI	Methylimidazol
nM	Nanomolar
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
ODNP	Dinitrophenol Ester

OPfp	Pentafluorophenyl Ester
OSU	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid Ester
P	<i>protected</i> (Seitenketten-geschützt)
P	Prolin
p.a.	<i>per analysi</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEGMA	Poly(ethylenglycol)methacrylat
Phe	Phenylalanin
PL	Photo-Linker
ppm	<i>parts per million</i>
PS	Polystyrol
PyBOP	Benzotriazol-1-yl- oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
q	Quartett
Q	Glutamin
R	Rest
RAL	Rink-Amid-Linker
RL	Blocking Puffer
rps	<i>revolutions per second</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett oder Sekunde
S	Serin
SG	Schutzgruppe
SPAAC	<i>Strain promoted azide alkyne cycloaddition</i>
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
SPyri	(E)-4-(4-(Dimethylamino)styryl)-2,6- diisopropylpyridinium

SPyry	(E)-4-(4-(Dimethylamino)styryl)-2,6-diisopropylpyrylium
SMCC	Succinimidyl-4-( <i>N</i> -maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
t	Triplett
T	Transmission
TAMRA	5-(6)-Carboxytetramethylrhodamin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDPS-	<i>tert</i> -Butyldiphenysilyl-
<i>t</i> Bu	<i>Tert</i> -Butyl
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
<i>tert</i>	teritär
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoressigsäure
TIBS	Triisobutylsilan
TIPS-	Triisopropylsilyl-
TOF	<i>Time of Flight</i>
$t_{\text{ret}}$	Retentionszeit
TriL1	((1-((3-Amino-3-oxopropyl)amino)-1,4-dioxo-4-((3-(triisopropylsilyl)prop-2-in-1-yl)amino)butan-2-yl)amino)-3-(6-azidohexanamido)-4-oxobutansäure
TriL2	10-((3-amino-3-oxopropyl)carbamoyl)-13-(4-azidobutyl)-2,2-dimethyl-8,12,15-trioxo-3,3-diphenyl-7,11,14-triaza-3-silaooctadec-4-in-18-säure
Trt	Trityl
Tween 20 (T)	Polyoxyethylensorbitan monolaurat

Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
V	Volumen
vol%	Volumenprozent
vs	<i>very strong</i> (sehr stark)
vw	<i>very weak</i> (sehr schwach)
w	<i>weak</i> (schwach)
W	Watt
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

## 7. Anhang

### 7.1. Lebenslauf

**Daniela Silke Mattes**

---

Geburtsort: Karlsruhe

Geburtsdatum: 10.02.1989

Staatsangehörigkeit: deutsch

#### **Akademischer Werdegang:**

*05/2014 – 07/2017 Promotion*

---

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (D)

- Thema der Dissertation: *Synthese von Peptiden, Peptoiden und Protein-ähnlichen Strukturen im  $\mu$ -Arrayformat* ausgeführt am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) und am Institut für Organische Chemie (IOC) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (D).
- 09/2016: Konferenzbesuch: Combinatorial and High-Throughput Materials Science
- 12/2015 – 03/2016: Teilnahme an upCAT (Start up catalyst)

*04/2009 – 02/2014 Studium: Diplom-Chemikerin*

---

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (D)

- Thema der Diplomarbeit: *Festphasensynthese neuer Peptidomimetika* am Institut für Organische Chemie (IOC) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (D).
- 08/2012 – 11/2012: Studentische Hilfskraft am Institut für Genetik und Toxikologie (ITG) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (D).

*06/2008: Abitur*

---

Gymnasium Neureut (D)

- 03/2003 – 06/2008: Gymnasium Neureut
- 09/2000 – 02/2003: Realschule Neureut

## 7.2. Publikationen

Mattes, D. S.; Rentschler, S.; Foertsch, T. C.; Münch S. W.; Loeffler, F. F.; Nesterov-Müller, A.; Bräse, S.; Breitling, F., *Small methods* **2018**, 2, 1700205. *A trifunctional linker for purified three dimensional protein-like structure arrays.*

Mattes, D. S.; Streit, B.; Bhandari, D. R.; Greifenstein, J.; Foertsch, T. C.; Muench S.W., S., Ridder B.; v. Bojničić-Kninski, C.; Nesterov-Müller, A.; Schepers U.; Bräse, S.; Loeffler, F. F.; Breitling, F. *Combinatorial synthesis of peptoid arrays via laser-based stacking of multiple solid polymer nanolayers, submitted.*

Striffler, J.\*; Mattes, D. S.\* (\* = these authors contributed equally); Schillo, S.; Münster, B.; Palermo, A.; Ridder, B.; Welle, A.; Trouillet, V.; Stadler, V.; Markovic, G.; Proll, G.; Bräse, S.; Loeffler, F. F.; Nesterov-Müller, A.; Breitling, F. *ChemNanoMat* **2016**, 2, 897-903. *Replication of Polymer-Based Microarrays by Multi-Step Transfer.*

Althuon, D.; Rönicke, F.; Furniss, D.; Quan, J.; Wellhofer, I.; Jung, N.; Schepers, U.; Bräse, S., *Organic & biomolecular chemistry* **2015**, 13, 4226-4230. *Functionalized triazolo-peptoids--a novel class for mitochondrial targeted delivery.*

Ridder, B.; Mattes, D. S.; Nesterov-Mueller; A.; Breitling, F.; Meier, M. A. R., *ChemComm.* **2017**, 53, 5553-5556. *Peptide Array Functionalization via the Ugi Four-Component Reaction.*

Loeffler, F. F.; Foertsch, T. C.; Popov, R.; Mattes, D. S.; Schlageter, M.; Sedlmayr, M.; Ridder, B.; Dang, F. X.; von Bojnicic-Kninski, C.; Weber, L. K.; Fischer, A.; Greifenstein, J.; Bykovskaya, V.; Buliev, I.; Bischoff, F. R.; Hahn, L.; Meier, M. A. R.; Bräse, S.; Powell, A. K.; Balaban, T. S.; Breitling, F.; Nesterov-Mueller, A. *Nat. Commun.* **2016**, 7, 11844. *High-flexibility combinatorial peptide synthesis with laser-based transfer of monomers in solid matrix material.*

Held, F. E.; Guryev, A. A.; Fröhlich, T.; Hampel F.; Kahnt A.; Hutterer C.; Steingruber M.; Bahsi H.; von Bojničić-Kninski C.; Mattes D. S.; Foertsch T. C.; Nesterov-Mueller A.; Maschall M. und Tsogoeva S. B., *A. Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15071. *Facile access to potent antiviral quinazoline heterocycles with fluorescence properties via merging metal-free domino reaction.*

Ridder, B.; Foertsch, T. C.; Welle, A.; Mattes, D. S.; von Bojnicic-Kninski, C. M.; Loeffler, F. F.; Nesterov-Mueller, A.; Meier, M. A. R.; Breitling, F. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *389*, 942-951. *Development of a poly(dimethylacrylamide) based matrix material for solid phase high density peptide array synthesis employing a laser based material transfer.*

Muenster, B.; Welle, A.; Ridder, B; Althuon, D.; Striffler, J.; Foertsch, T. C.; Hahn, L.; Thelen, R.; Stadler, V.; Nesterov-Mueller, A.; Breitling, F.; Loeffler, F. F. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *360*, 306-314. *Solid-material-based coupling efficiency analyzed with time-of-flight secondary ion mass spectrometry.*

Von Bojnicic-Kninski, C.; Bykovskaya, V.; Maerkle, F.; Popov, R.; Palermo, A.; Mattes, D. S.; Weber, L. K.; Ridder, B.; Foertsch, T. C.; Welle, A.; Loeffler, F. F.; Breitling, F.; Nesterov-Mueller, A. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 7067-7073. *Selective Functionalization of Microstructured Surfaces by laser-Assisted Particle Transfer.*

### **7.3. Konferenzbeiträge**

Daniela Mattes, Posterpräsentation bei Combinatorial and High-Throughput Materials Science, **2016**, Jena, Deutschland. *Synthesis of peptoids via a combinatorial laser-assisted microarray technology.*

## 7.4. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Breitling und Prof. Dr. Stefan Bräse, die mir die Möglichkeit gaben diese Arbeit anzufertigen und immer für fachliche Diskussionen zur Verfügung standen.

Dem gesamten Arbeitskreis im IOC und IMT danke ich für die angenehme Atmosphäre und Hilfsbereitschaft. Besonderen Dank möchte ich Tobias Förtsch für die Hilfe bei zahlreichen Problemen mit der cLIFT-Methode und Simone Rentschler für die Durchführung von zahlreichen Immunfärbungen aussprechen. Juliane Greifenstein und Bettina Streit, danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung von zahlreichen Experimenten bzgl. cLIFT.

Dr. Jakob Striffler möchte ich für die hervorragende Vorarbeit zur Replikation von Peptidarrays danken.

Ralf Bischoff und seiner Gruppe am DKFZ in Heidelberg danke ich für die Unterstützung bei der HPLC. Mein besonderer Dank geht an Martina Schnölzer und Sabine Fiedler für die Durchführung einiger MALDI-Messungen.

Dhaka Bhandari (IAAC) von der Justus-Liebig-Universität, danke ich für die Durchführung des MALDI-MS-Imaging.

Anne Schneider (IOC), Martin Schlageter (IAC), Bettina Streit (IMT), Silviu Balaban (Campus Scientifique de St Jérôme), Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte (Universität Bochum) danke ich für die Bereitstellung der Chemikalien.

Julia Kuhn und Sylvia Vanderheiden-Schroen (Complat am ITG) vom KIT, danke ich für die ESI-Messungen.

Boris Kühl (IFG) vom KIT, danke ich für die Einweisung und Unterstützung des MALDI Spektrometers.

Sven Stahl (INT) vom KIT, danke ich für die Einweisung und Unterstützung des NMR-Gerätes.

Stephan Münch (IOC) danke ich für die Unterstützung bei der HPLC und für die Beantwortung aller Fragen bzgl. der Peptoidchemie.

Vanessa Trouillet (IAM) vom KIT, danke ich für die XPS-Messungen.

Den Mitarbeiterinnen der Analytik-Abteilung des Institutes für Organische Chemie für die Aufnahme zahlreicher Spektren.

Meiner Arbeitskollegin Dr. Barbara Ridder, danke ich für die tolle Zeit und die Unterstützung zu jeder Zeit.

Dr. Barbara Ridder, Janina Beck, Dr. Felix Loeffler, Andrea Fischer und Bettina Streit danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meiner Familie und meinem Mann Benjamin Mattes danke ich für ihre mentale und finanzielle Unterstützung.

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] a) X. Yu, B. Petritis, J. LaBaer, *Proteomics* **2016**, *16*, 1238-1250. *Advancing translational research with next-generation protein microarrays*; b) C. Katz, L. Levy-Beladev, S. Rotem-Bamberger, T. Rito, S. G. D. Rudiger, A. Friedler, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2131-2145. *Studying protein-protein interactions using peptide arrays*.
- [2] a) F. F. Cortese R, Galfre G., Luzzago A., Monaci P., Nicosia A., *Trends Biotechnol* **1994**, *12*, 262-267. *Epitope discovery using peptide libraries displayed on phage*; b) M. B. Irving, O. Pan, J. K. Scott, *Curr Opin Chem Biol* **2001**, *5*, 314-324. *Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics*.
- [3] P. Timmerman, W. C. Puijk, R.S. Boshuizen, P. van Dijken, J.W. Slootstra, F. J. Beurskens, P.W.H.I. Parren, A. Huber, M.F. Bachmann, a. R. H. Meloe, *Open Vaccine J* **2009**, *2*, 56-67. *Functional Reconstruction of Structurally Complex Epitopes Using Clips Technology*.
- [4] G. P. Smith, V. A. Petrenko, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 391-410. *Phage Display*.
- [5] a) F. Breitling, A. Nesterov, V. Stadler, T. Felgenhauer, F. R. Bischoff, *Mol. bioSystems* **2009**, *5*, 224-234. *High-density peptide arrays*; b) N. Ramachandran, J. V. Raphael, E. Hainsworth, G. Demirkan, M. G. Fuentes, A. Rolfs, Y. Hu, J. LaBaer, *Nat. methods* **2008**, *5*, 535-538. *Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays*; c) L. K. Weber, A. Palermo, J. Kugler, O. Armant, A. Isse, S. Rentschler, T. Jaenisch, J. Hubbuch, S. Dubel, A. Nesterov-Mueller, F. Breitling, F. F. Loeffler, *J. immunol methods* **2017**, *443*, 45-54. *Single amino acid fingerprinting of the human antibody repertoire with high density peptide arrays*; d) L. B. Hansen, S. Buus, C. Schafer-Nielsen, *Plos One* **2013**, *8*. *Identification and Mapping of Linear Antibody Epitopes in Human Serum Albumin Using High-Density Peptide Arrays*.
- [6] K. Büsow, D. Cahill, W. Nietfeld, D. Bancroft, E. Scherzinger, H. Lehrach, G. Walter, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5007-5008. *A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library*.
- [7] A. Ambrogelly, S. Palioura, D. Söll, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 29.
- [8] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217-9232. *Spot-Synthesis - an Easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support*.
- [9] a) S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767-773. *Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis*; b) J. B. Legutki, Z.-G. Zhao, M. Greving, N. Woodbury, S. A. Johnston, P. Stafford, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4785. *Scalable high-density peptide arrays for comprehensive health monitoring*.
- [10] V. Stadler, T. Felgenhauer, M. Beyer, S. Fernandez, K. Leibe, S. Guttler, M. Groning, K. König, G. Torralba, M. Hausmann, V. Lindenstruth, A. Nesterov, I. Block, R. Pipkorn, A. Poustka, F. R. Bischoff, F. Breitling, *Angew. Chem.* **2008**, *47*, 7132-7135. *Combinatorial synthesis of peptide arrays with a laser printer*.
- [11] F. F. Loeffler, T. C. Foertsch, R. Popov, D. S. Mattes, M. Schlageter, M. Sedlmayr, B. Ridder, F. X. Dang, C. von Bojnic-Kninski, L. K. Weber, A. Fischer, J. Greifenstein, V. Bykovskaya, I. Buliev, F. R. Bischoff, L. Hahn, M. A. Meier, S. Brase, A. K. Powell, T. S. Balaban, F. Breitling, A. Nesterov-Mueller, *Nat. commun.* **2016**, *7*, 11844. *High-flexibility combinatorial peptide synthesis with laser-based transfer of monomers in solid matrix material*.
- [12] R. Uy, F. Wold, *Science* **1977**, *198*, 890-896. *Posttranslational covalent modification of proteins*.

- [13] a) A. Rabocchi, A. Guarna, *Peptidomimetics in organic and medicinal chemistry: the art of transforming peptides in drugs.*, Vol. 89, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **2014**. *Peptidomimetics in organic and medicinal chemistry: the art of transforming peptides in drugs*; b) J. Vagner, H. Qu, V. J. Hruby, *Curr Opin Chem Biol* **2008**, *12*, 292-296. *Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery*.
- [14] a) S. D. Ganesh, N. Saha, O. Zandrea, R. N. Zuckermann, P. Sáha, *Polymer Bulletin* **2017**. *Peptoids and polypeptoids: biomimetic and bioinspired materials for biomedical applications*; b) M. M. Reddy, T. Kodadek, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 12672-12677. *Protein "fingerprinting" in complex mixtures with peptoid microarrays*.
- [15] a) S. M. Miller, R. J. Simon, S. Ng, R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, W. H. Moos, *Bioorg Med Chem Lett* **1994**, *4*, 2657-2662. *Proteolytic Studies of Homologous Peptide and N-Substituted Glycine Peptoid Oligomers*; b) R. J. S. Susan M. Miller, Simon Ng, Ronald N. Zuckermann, Janice M. Kerr, Walter H. Molina, *Drug Dev. Res.* **1995**, *35*, 20-32. *Comparison of the proteolytic susceptibilities of homologous L-amino acid, D-amino acid, and N-substituted glycine peptide and peptoid oligomers*.
- [16] K. H. A. Lau, *Biomater Sci-Uk* **2014**, *2*, 627-633. *Peptoids for biomaterials science*.
- [17] A. R. Statz, J. P. Park, N. P. Chongsiriwatana, A. E. Barron, P. B. Messersmith, *Biofouling* **2008**, *24*, 439-448. *Surface-immobilised antimicrobial peptoids*.
- [18] K. Hilpert, D. F. Winkler, R. E. Hancock, *Nat. proto.* **2007**, *2*, 1333-1349. *Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion*.
- [19] R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, S. B. H. Kent, W. H. Moos, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10646-10647. *Efficient Method for the Preparation of Peptoids [Oligo(N-Substituted Glycines)] by Submonomer Solid-Phase Synthesis*.
- [20] J. A. W. Kruijtzter, L. J. F. Hofmeyer, W. Heerma, C. Versluis, R. M. J. Liskamp, *Chem-Eur J* **1998**, *4*, 1570-1580. *Solid-phase syntheses of peptoids using Fmoc-protected N-substituted glycines: The synthesis of (retro) peptoids of Leu-enkephalin and substance P*.
- [21] R. B. Merrifield, *Science* **1965**, *150*, 178.
- [22] S. Li, D. Bowerman, N. Marthandan, S. Klyza, K. J. Luebke, H. R. Garner, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4088-4089. *Photolithographic synthesis of peptoids*.
- [23] a) X. Espanel, R. Hooft van Huijsduijnen, *Methods* **2005**, *35*, 64-72. *Applying the SPOT peptide synthesis procedure to the study of protein tyrosine phosphatase substrate specificity: probing for the heavenly match in vitro*; b) U. Reineke, R. Sabat, U. Hoffmüller, *American Peptide Symposia* **2006**, *6*. *Identification of miniproteins using cellulose-bound duotope scan*.
- [24] P. W. Gunning, U. Ghoshdastider, S. Whitaker, D. Popp, R. C. Robinson, *J. Cell Sci* **2015**, *128*, 2009-2019. *The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments*.
- [25] G. S. Adair, *J Biol Chem* **1925**, *63*, 529-545. *The hemoglobin system. IV. The oxygen dissociation curve of hemoglobin*.
- [26] W. Müller-Esterl, M. Plenikowski, *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler [Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kieß, Katrin Ridinger und Michael Plenikowski]*, Spektrum Akademischer Verlag, **2009**. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler [Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kieß, Katrin Ridinger und Michael Plenikowski]*.
- [27] E. Fischer, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1906**, *39*, 530-610. *Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine*.

- [28] T. Liljefors, P. Krogsgaard-Larsen, U. Madsen, *Textbook of Drug Design and Discovery*, Taylor & Francis, London, New York, **2002**. *Textbook of Drug Design and Discovery*.
- [29] A. Ambrogelly, S. Palioura, D. Soll, *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 29-35. *Natural expansion of the genetic code*.
- [30] J. Jones, *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford Science Publication, Oxford, **2002**. *Amino Acid and Peptide Synthesis*.
- [31] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827. *Amide bond formation and peptide coupling*.
- [32] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409. *9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group*.
- [33] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, in *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., **2006**, pp. 533-646.
- [34] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068. *A New Method of Forming Peptide Bonds*.
- [35] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden*, Spektrum, Heidelberg, **2004**. *Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden*.
- [36] M. Bodanszky, M. Bednarek, *J Protein Chem.* **1989**, *8*, 461-469. *Active esters in solid-phase peptide synthesis*.
- [37] E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631. *Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents*.
- [38] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467. *Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis*.
- [39] C. G. Fields, D. H. Lloyd, R. L. Macdonald, K. M. Otteson, R. L. Noble, *J. Pept res* **1991**, *4*, 95-101. *HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis*.
- [40] B. Castro, J. R. Dormoy, *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 4747-4750. *Le perchlorate de chlorotrisdimethylaminophosphonium: un nouveau reactif pour le couplage peptidique*.
- [41] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208. *PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product*.
- [42] W. König, R. Geiger, *Chemische Berichte* **1970**, *103*, 788-798. *Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen*.
- [43] a) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154. *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*; b) S. Bräse, J. Bülle, A. Hüttermann, *Organische und bioorganische Chemie*, WILEY-VCH, Weinheim, **2008**. *Organische und bioorganische Chemie*.
- [44] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, Springer, **2004**. *Molekulare Zellbiologie*.
- [45] <http://www.lcsciences.com/discovery/>, **28.04.2017**.
- [46] <http://www.pepperprint.com/leading-peptide-microarray-solutions/>, **28.04.2017**.
- [47] A. Palla-Papavlu, C. L. V. Dinca, J. Shaw-Stewart, M. Nagel, T. Lippert, a. M. Dinescu, *IOP Science* **2010**, *12*. *Laser induced forward transfer of soft materials*.
- [48] J. Lawrence, *Advances in Laser Materials Processing Vol. 1*, Woodhead Publishing, Cambridge, **2010**. *Advances in Laser Materials Processing*
- [49] a) M. D. J. Salisbury C.M., Ellman J.A., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14868-14870. *Peptide microarrays for the determination of protease substrate specificity*; b) J. V. Price, D. J. Haddon, D. Kemmer, G. Delepine, G. Mandelbaum, J. A. Jarrell, R. Gupta, I. Balboni, E. F. Chakravarty, J. Sokolove, A. K. Shum, M. S. Anderson, M. H. Cheng, W. H. Robinson, S. K. Browne, S. M. Holland, E. C. Baechler, P. J. Utz, *The J. clin. Invest.* **2013**, *123*, 5135-5145. *Protein microarray analysis reveals BAFF-binding*

- autoantibodies in systemic lupus erythematosus*; c) J. V. Price, Tangsombatvisit, S., Xu, G., Levy, D., Baechler, E. C., Gozani, O., Varma, M., Utz, P. J., Liu C. L., *Nat Med.* **2012**, 18, 1434-1440. *On silico peptide microarrays for high-resolution mapping of antibody epitopes and diverse protein-protein interactions*; d) H. H. Chen, Y. C. Hsiao, J. R. Li, S. H. Chen, *Anal. chim. acta* **2015**, 865, 53-59. *In situ fabrication of cleavable peptide arrays on polydimethylsiloxane and applications for kinase activity assays*.
- [50] J. B. Legutki, Z. G. Zhao, M. Greving, N. Woodbury, S. A. Johnston, P. Stafford, *Nat. commun.* **2014**, 5, 4785. *Scalable high-density peptide arrays for comprehensive health monitoring*.
- [51] W. H. Robinson, C. DiGennaro, W. Hueber, B. B. Haab, M. Kamachi, E. J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M. C. Genovese, H. E. de Vegvar, K. Skriner, D. L. Hirschberg, R. I. Morris, S. Muller, G. J. Pruijn, W. J. van Venrooij, J. S. Smolen, P. O. Brown, L. Steinman, P. J. Utz, *Nat med.* **2002**, 8, 295-301. *Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses*.
- [52] Y. Lu, S. Ling, A. M. Hegde, L. A. Byers, K. Coombes, G. B. Mills, R. Akbani, *Semin Oncol* **2016**, 43, 476-483. *Using reversed-phase protein arrays as pharmacodynamic assays*.
- [53] J. R. Falsey, M. Renil, S. Park, S. Li, K. S. Lam, *Bioconjugate chem* **2001**, 12, 346-353. *Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays*.
- [54] a) C. Schirwitz, F. F. Loeffler, T. Felgenhauer, V. Stadler, A. Nesterov-Mueller, R. Dahint, F. Breitling, F. R. Bischoff, *Adv Mater* **2013**, 25, 1598-1602. *Purification of high-complexity peptide microarrays by spatially resolved array transfer to gold-coated membranes*; b) B. Ay, M. Streitz, P. Boisguerin, A. Schlosser, C. C. Mahrenholz, S. D. Schuck, F. Kern, R. Volkmer, *Biopolymers* **2007**, 88, 64-75. *Sorting and pooling strategy: A novel tool to map a virus proteome for CD8 T-cell epitopes*; c) Kramer, U. Reineke, L. Dong, B. Hoffmann, U. Hoffmuller, D. Winkler, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, *J pept res* **1999**, 54, 319-327. *Spot synthesis: observations and optimizations*; d) Molina, D. Laune, C. Gougat, B. Pau, C. Granier, *Peptide research* **1996**, 9, 151-155. *Improved performances of spot multiple peptide synthesis*; e) Takahashi, Y. Sakamoto, H. Yamada, S. Usui, Y. Fukazawa, *Angew:Chem: Int: Ed.* **1995**, 34, 1345-1348. *Synthesis of a Dynemicin A Analogue and Its Bergaman-Type Cycloaromatization*.
- [55] a) A. M. Bray, N. J. Maeji, A. G. Jhingran, R. M. Valerio, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 6163-6166. *Gas phase cleavage of Peptides from a solid support with ammonia vapour. Application in simultaneous multiple Peptide Synthesis*; b) Volkmer, *ChemBioChem* **2009**, 10, 1431-1442. *Synthesis and Application of Peptide Arrays: Quo Vadis SPOT Technology*.
- [56] E. Dulkeith, A. C. Morteani, T. Niedereichholz, T. A. Klar, J. Feldmann, S. A. Levi, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, M. Möller, D. I. Gittins, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 89, 203002. *Fluorescence Quenching of Dye Molecules near Gold Nanoparticles: Radiative and Nonradiative Effects*.
- [57] J. Striffler, D. S. Mattes, S. Schillo, B. Munster, A. Palermo, B. Ridder, A. Welle, V. Trouillet, V. Stadler, G. Markovic, G. Proll, S. Brase, F. F. Loeffler, A. Nesterov-Muller, F. Breitling, *Chemnanomat* **2016**, 2, 897-903. *Replication of Polymer-Based Peptide Microarrays by Multi-Step Transfer*.
- [58] <http://www.cambridgeproteinarrays.com/>; **31.05.2017**.  
<http://www.raybiotech.com/protein-array.html>; **31.05.2017**.
- [59] H. Zhu, S. H. Hu, G. Jona, X. W. Zhu, N. Kreiswirth, B. M. Willey, T. Mazzulli, G. Z. Liu, Q. F. Song, P. Chen, M. Cameron, A. Tyler, J. Wang, J. Wen, W. J. Chen, S.

- Compton, M. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 4011-4016. *Severe acute respiratory syndrome diagnostics using a coronavirus protein microarray.*
- [60] R. N. Zuckermann, *Biopolymers* **2011**, *96*, 545-555. *Peptoid origins.*
- [61] a) T. J. Sanborn, C. W. Wu, R. N. Zuckermann, A. E. Barron, *Biopolymers* **2002**, *63*, 12-20. *Extreme stability of helices formed by water-soluble poly-N-substituted glycines (polypeptoids) with alpha-chiral side chains*; b) P. Ducheyne, *Comprehensive Biomaterials Vol. 1*, Elsevier Science **2011**. *Comprehensive Biomaterials.*
- [62] Fowler, PhD thesis, **2009**. *Structure-function relationships in peptoids: recent advances towards deciphering the structural requirements for biological function.*
- [63] G. K. Olivier, A. Cho, B. Sanii, M. D. Connolly, H. Tran, R. N. Zuckermann, *ACS Nano* **2013**, *7*, 9276-9286. *Antibody-Mimetic Peptoid Nanosheets for Molecular Recognition.*
- [64] R. M. J. Liskamp, D. T. S. Rijkers, J. A. W. Kruijtzter, J. Kemmink, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1626-1653. *Peptides and Proteins as a Continuing Exciting Source of Inspiration for Peptidomimetics.*
- [65] T. Kodadek, M. M. Reddy, H. J. Olivos, K. Bachhawat-Sikder, P. G. Alluri, *Acc.of Chem Res.* **2004**, *37*, 711-718 *Synthetic Molecules as Antibody Replacements.*
- [66] X. Xiao, P. Yu, H.-S. Lim, D. Sikder, T. Kodadek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2865-2868. *A Cell-Permeable Synthetic Transcription Factor Mimic.*
- [67] R.N. Zuckermann, J.M. Kerr, S.B. H. Kent, W. H. Moost, *J. Am. Chem. SOC.* **1992** *114*, 10646-10647 *Efficient Method for the Preparation of Peptoids [Oligo(N-substituted glycines)] by Submonomer Solid-Phase Synthesis*
- [68] P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. Rees, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 4527-4554. *Solid-phase organic reactions: A review of the recent literature.*
- [69] J. Sun, R. N. Zuckermann, *ACS Nano* **2013**, *7*, 4715-4732. *Peptoid polymers: a highly designable bioinspired material.*
- [70] N. Heine, T. Ast, J. Schneider-Mergener, U. Reineke, L. Germeroth, H. Wenschuh, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9919-9930. *Synthesis and screening of peptoid arrays on cellulose membranes.*
- [71] C. Cardenal, S. B. L. Vollrath, U. Schepers, S. Bräse, *Helv. Chimi. Acta* **2012**, *95*, 2237-2248. *Synthesis of Functionalized Glutamine- and Asparagine-Type Peptoids – Scope and Limitations.*
- [72] R. J. Simon, R. S. Kania, R. N. Zuckermann, V. D. Huebner, D. A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, C. K. Marlowe, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1992**, *89*, 9367-9371. *Peptoids: a modular approach to drug discovery.*
- [73] <http://www.raybiotech.com/files/manual/Peptoids/PA7-2800-2.pdf>, **26.04.2017**.
- [74] K. F. Sykes, J. B. Legutki, P. Stafford, *Trends biotechnol*, *31*, 45-51. *Immunosignaturing: a critical review.*
- [75] E. Dias-Neto, D. N. Nunes, R. J. Giordano, J. Sun, G. H. Botz, K. Yang, J. C. Setubal, R. Pasqualini, W. Arap, *Plos One* **2009**, *4*, e8338. *Next-generation phage display: integrating and comparing available molecular tools to enable cost-effective high-throughput analysis.*
- [76] a) H. A. Doyle, M. J. Mamula, *Trends in immun* **2001**, *22*, 443-449. *Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity*; b) G. Benkert, *Handbuch der Psychopharmakotherapie*, Vol. 2, Springer, Heidelberg, **2012**. *Handbuch der Psychopharmakotherapie.*
- [77] M. Mulisch, U. Welsch, *Mikroskopische Technik*, Springer Spektrum, Heidelberg, **2015**. *Mikroskopische Technik.*
- [78] J. W. Dobrucki, in *Fluorescence Microscopy*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2013**, pp. 97-142.

- [79] a) L. Stryer, R. P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1967**, 58, 719-726. *Energy transfer: a spectroscopic ruler*; b) U. Kubitscheck, in *Fluorescence Microscopy*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2013**, pp. 33-95.
- [80] K. V. Sairam, B. M. Gurupadaya, R. S. Chandan, K. N. Dattatri, B. Vishwanathan, *Curr. Drug Deliv.* **2016**, 13, 186-201. *A Review on Chemical Profile of Coumarins and their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer.*
- [81] N. Soh, T. Ueda, *Talanta* **2011**, 85, 1233-1237. *Perylene bisimide as a versatile fluorescent tool for environmental and biological analysis: A review.*
- [82] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, *Anal. Chem* **1985**, 57, 2935-2939. *Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules.*
- [83] a) E. B. Yalcin, S. M. d. I. Monte, *J. Histochem. Cytochem.* **2015**, 63, 762-771. *Review of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Imaging Mass Spectrometry for Lipid Biochemical Histopathology*; b) F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1193A-1203A. *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers.*
- [84] J. L. Norris, R. M. Caprioli, *Chem Rev* **2013**, 113, 2309-2342. *Analysis of Tissue Specimens by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry in Biological and Clinical Research.*
- [85] P. K. M. P. Greving, Z. Zhao, N. W. Woodbury *Langmuir* **2010**, 26, 1456-1459. *Feature-Level MALDI-MS Characterization of in Situ-Synthesized Peptide Microarrays.*
- [86] H. Wei, K. Nolkrantz, D. H. Powell, J. H. Woods, M.-C. Ko, R. T. Kennedy, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18, 1193-1200. *Electrospray sample deposition for matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) and atmospheric pressure MALDI mass spectrometry with attomole detection limits.*
- [87] J. A. Hankin, R. M. Barkley, R. C. Murphy, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **2007**, 18, 1646-1652. *Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging.*
- [88] H.-R. Aerni, D. S. Cornett, R. M. Caprioli, *Anal. Chem* **2006**, 78, 827-834. *Automated Acoustic Matrix Deposition for MALDI Sample Preparation.*
- [89] D. L. Baluya, T. J. Garrett, R. A. Yost, *Anal. Chem* **2007**, 79, 6862-6867. *Automated MALDI Matrix Deposition Method with Inkjet Printing for Imaging Mass Spectrometry.*
- [90] R. Huisgen, *Angew. Chem. Inter. Ed. in English* **1963**, 2, 565-598. *1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future.*
- [91] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 210-216. *Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates.*
- [92] a) V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate chemistry* **2010**, 21, 1912-1916. *Labeling live cells by copper-catalyzed alkyne--azide click chemistry*; b) S. I. Presolski, V. P. Hong, M. G. Finn, *Curr Protoc Chem Biol* **2011**, 3, 153-162. *Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation*; c) Sinclair, R. A. Stockman, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 298-326. *Thirty-five years of synthetic studies directed towards the histrionicotoxin family of alkaloids.*
- [93] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021. *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions.*
- [94] B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8923-8930. *Ruthenium-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition: Scope and Mechanism.*

- [95] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047. *A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems.*
- [96] B. Cao, Y. Zheng, T. Xi, C. Zhang, W. Song, K. Burugapalli, H. Yang, Y. Ma, *Biomed Microdevices* **2012**, *14*, 709-720. *Concentration-dependent cytotoxicity of copper ions on mouse fibroblasts in vitro: effects of copper ion release from TCu380A vs TCu220C intra-uterine devices.*
- [97] R. Hoogenboom, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3415-3417. *Thiol-Yne Chemistry: A Powerful Tool for Creating Highly Functional Materials.*
- [98] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540-1573. *Thiol-Ene Click Chemistry.*
- [99] A. B. Lowe, *Poly. Chem* **2010**, *1*, 17-36. *Thiol-ene "click" reactions and recent applications in polymer and materials synthesis.*
- [100] J. Striffler, PhD thesis, (Karlsruhe), **2014**. *Replikation von  $\mu$ -Peptidarrays.*
- [101] A. Golla, PhD thesis, KIT (Karlsruhe), **2014**. *Development of an assay to detect proteolytic activity in peptide arrays.*
- [102] V. Stadler, R. Kirmse, M. Beyer, F. Breitling, T. Ludwig, F. R. Bischoff, *Langmuir* **2008**, *24*, 8151-8157. *PEGMA/MMA Copolymer Graftings: Generation, Protein Resistance, and a Hydrophobic Domain.*
- [103] A. A. Popova, S. M. Schillo, K. Demir, E. Ueda, A. Nesterov-Mueller, P. A. Levkin, *Adv Mater* **2015**, *27*, 5217-5222. *Droplet-Array (DA) Sandwich Chip: A Versatile Platform for High-Throughput Cell Screening Based on Superhydrophobic-Superhydrophilic Micropatterning.*
- [104] C. D. Hein, X.-M. Liu, D. Wang, *Pharmaceutical research* **2008**, *25*, 2216-2230. *Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences.*
- [105] G. J. Kubas, B. Monzyk, A. L. Crumblis, in *Inorg. Synth.*, John Wiley & Sons, Inc., **2007**, pp. 68-70.
- [106] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855. *Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis.*
- [107] A. Z. Ahmady, F. Heidarizadeh, M. Keshavarz, *Synt. Commun* **2013**, *43*, 2100-2109. *Ionic Liquid Containing Copper(I): A New, Green, Homogeneous, and Reusable Catalyst for Click Cyclization.*
- [108] H. N. Heine, Humboldt-Universität (Berlin), **2000**. *Peptidmimetika an Zellulosemembranen –SPOT-Synthese und Screening kombinatorischer Peptoid-Bibliotheken*
- [109] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790. *Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin.*
- [110] M. R. Carrasco, M. C. Fitzgerald, Y. Oda, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6331-6334. *Direct Monitoring of Organic Reactions on Polymeric Supports.*
- [111] C. Schirwitz, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (Heidelberg), **2012**. *Aufreinigung von Peptiden in hochkomplexen Arrays.*
- [112] D. S. Mattes, S. Rentschler, T. C. Foertsch, S. W. Münch, F. F. Loeffler, A. Nesterov-Müller, S. Bräse, F. Breitling, *Small methods* **2018**, *2*, 1700205. *A trifunctional linker for purified three dimensional protein-like structure arrays.*
- [113] a) A. E. Voelker, R. Viswanathan, *J. Org. Chem* **2013**, *78*, 9647-9658. *Synthesis of a Suite of Bioorthogonal Glutathione S-Transferase Substrates and Their Enzymatic Incorporation for Protein Immobilization;* b) R. Chapman, K. A. Jolliffe, S. Perrier, *Polym. Chem* **2011**, *2*, 1956-1963. *Modular design for the controlled production of polymeric nanotubes from polymer/peptide conjugates.*

- [114] N. Brabez, R. M. Lynch, L. Xu, R. J. Gillies, G. Chassaing, S. Lavielle, V. J. Hruby, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7375-7384. *Design, Synthesis, and Biological Studies of Efficient Multivalent Melanotropin Ligands: Tools toward Melanoma Diagnosis and Treatment.*
- [115] C. Cai, A. Vasella, *Hel. Chim. Acta* **1995**, *78*, 732-757. *Oligosaccharide Analogues of Polysaccharides. Part 3. A new protecting group for alkynes: Orthogonally protected dialkynes.*
- [116] P. Wipf, T. H. Graham, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15346-15347. *Total Synthesis of (-)-Disorazole C1.*
- [117] C. Rucker, *Chem Rev* **1995**, *95*, 1009-1064. *The Triisopropylsilyl Group in Organic-Chemistry - Just a Protective Group, or More.*
- [118] I. E. Valverde, A. F. Delmas, V. Aucagne, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 7597-7602. *Click à la carte: robust semi-orthogonal alkyne protecting groups for multiple successive azide/alkyne cycloadditions.*
- [119] J. D. Fontenot, J. M. Ball, M. A. Miller, C. M. David, R. C. Montelaro, *Peptide research* **1991**, *4*, 19-25. *A survey of potential problems and quality control in peptide synthesis by the fluorenylmethoxycarbonyl procedure.*
- [120] V. N. Belov, C. A. Wurm, V. P. Boyarskiy, S. Jakobs, S. W. Hell, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3598-3602. *Rhodamine NN: eine neue Klasse maskierter Fluoreszenzfarbstoffe.*
- [121] E. Sudarman, (Braunschweig), **2007**. *Design, Synthese und Untersuchung des Bindungsverhaltens von Inhibitoren der Interaktion von viralem Interleukin-6 mit dem Zytokinrezeptor gp130.*
- [122] A. P. Hagens, T. S. Miller, R. L. Bynum, V. P. Kapila, *J. Org. Chem* **1982**, *47*, 1345-1347. *Reaction of trifluoroacetic acid with alcohols, phenols, ethers, and their sulfur analogs.*
- [123] T. Förtsch, PhD thesis, Karlsruher Institut für Technologie (Karlsruhe), **2017**. *Kombinatorische Mikrostrukturierung von Biooberflächen mit Hilfe des laserinduzierten Vorwärtstransfers*
- [124] B. Ridder, T. C. Foertsch, A. Welle, D. S. Mattes, C. M. von Bojnicic-Kninski, F. F. Loeffler, A. Nesterov-Mueller, M. A. R. Meier, F. Breitling, *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *389*, 942-951. *Development of a poly(dimethylacrylamide) based matrix material for solid phase high density peptide array synthesis employing a laser based material transfer.*
- [125] J. Greifenstein, Zulassungsarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (IMT, Karlsruhe), **2016**.
- [126] B. Münster, PhD Thesis thesis, Karlsruher Institut für Technologie (IMT, Karlsruhe), **2016**. *Entwicklung von Mikropartikeln für die kombinatorische Synthese hochdichter Peptidarrays durch laserbasierte Verfahren.*
- [127] R. Subirós-Funosas, R. Prohens, R. Barbas, A. El-Faham, F. Albericio, *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 9394-9403. *Oxyrna: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion[1].*
- [128] B. T. Watson, G. E. Christiansen, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6087-6090. *Solid phase synthesis of substituted coumarin-3-carboxylic acids via the Knoevenagel condensation.*
- [129] a) D. Aigner, S. M. Borisov, I. Klimant, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 2475-2485. *New fluorescent perylene bisimide indicators—a platform for broadband pH optodes;*  
b) L. Chen, K. Zhang, L. Zhu, Y. Xiao, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2015**, *54*, 12699-12703. *New and Efficient Approach to the Versatile Building Block of 3,4-Perylenedicarboxylic Monoanhydride.*
- [130] a) T. Ast, N. Heine, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, H. Wenschuh, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 4317-4318. *Efficient assembly of peptomers on continuous surfaces;*  
b) N. El Tayar, R.-S. Tsai, B. Testa, P.-A. Carrupt, C. Hansch, A. Leo, *J. Pharm. Sci.*,

- 80, 744-749. *Percutaneous Penetration of Drugs: A Quantitative Structure-Permeability Relationship Study*.
- [131] M. J. Drysdale, M. C. Pritchard, D. C. Horwell, *J. Med. Chem* **1992**, 35, 2573-2581. *Rationally designed "dipeptoid" analogs of CCK. Acid mimics of the potent and selective non-peptide CCK-B receptor antagonist (CI-988)*.
- [132] P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C. B. Anfinsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, 61, 636-643. *Selective enzyme purification by affinity chromatography*.
- [133] a) R. N. Zuckermann, T. Kodadek, *Curr Opin Mol. Ther.* **2009**, 11, 299-306. *Peptoids as potential therapeutics*; b) G. M. Figliozzi, R. Goldsmith, S. C. Ng, S. C. Banville, R. N. Zuckermann, *Methods Enzymol.* **1996**, 267, 437-447. [25] *Synthesis of N-substituted glycine peptoid libraries*.
- [134] B. Streit, Master thesis, Karlsruher Institut für Technologie (IMT, Karlsruhe), **2017**. *Kombinatorische Synthese von Peptiden und Peptoiden*.
- [135] M. Sendlmayr, PhD thesis, KIT (Karlsruhe), *in Bearbeitung*.
- [136] K. L. Parry, A. G. Shard, R. D. Short, ;, W. G. G.;, J. D. Whittle, A. Wright, *Interface Anal.* **2006**, 38, 1497. *ARXPS characterisation of plasma polymerised surface chemical gradients*.
- [137] J. H. Scofield, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1976**, 8, 129-137. *Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV*.
- [138] A. L. Cauchy, *Bulletin des Sciences Mathématiques* **1830**, 14, 6-10.
- [139] D. Althun, F. Roenicke, D. Fuerniss, J. Quan, I. Wellhofer, N. Jung, U. Schepers, S. Bräse, *Org. biomol. Chem* **2015**, 13, 4226-4230. *Functionalized triazolo-peptoids--a novel class for mitochondrial targeted delivery*.