

Chemoselektive Peptidcyclisierung über spurlose Staudinger-Ligation**

Rolf Kleinewieschede und Christian P. R. Hackenberger*

Professor Michael Bienert zum 65. Geburtstag gewidmet

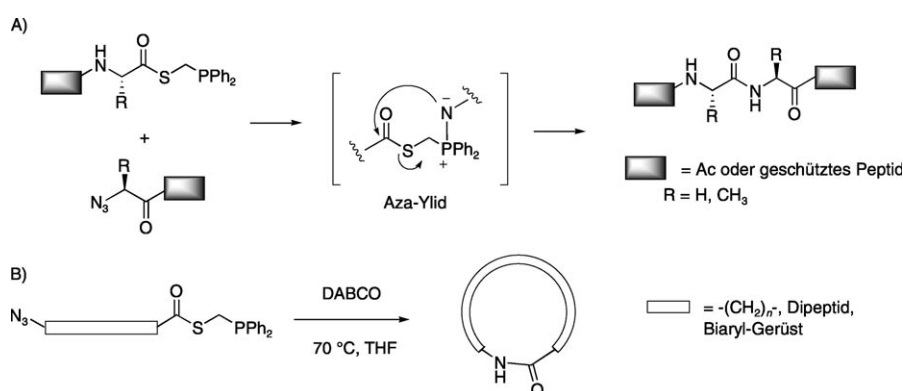
Komplexe zelluläre Funktionen werden durch ein Netzwerk von Protein-Protein-Wechselwirkungen kontrolliert. Diese Wechselwirkungen werden oft durch eine spezifische post- oder cotranslationale Funktionalisierung der Proteinseitenketten gesteuert, einen Prozess, der häufig als Proteinmodifizierung bezeichnet wird.^[1,2] Zur Untersuchung der biologischen Auswirkungen einer bestimmten Proteinmodifizierung, beispielsweise einer Glycosylierung oder Phosphorylierung, werden modifizierte Proteine synthetisiert und anschließend mit ihren nicht modifizierten Analoga verglichen.^[2] Die effizienteste semisynthetische Strategie in der Proteinsynthese ist die Ligation exprimierter Proteine („expressed protein ligation“, EPL).^[2a] In diesem chemoselektiven Prozess wird ein ungeschütztes synthetisches Peptidfragment, das die zu untersuchende Proteinmodifikation enthält, mit einem exprimierten Protein durch native chemische Ligation (NCL) unter Zuhilfenahme einer Thiofunktion eines N-terminalen Cysteinrestes ligiert.^[3]

Während es bereits beeindruckende Untersuchungen zu den biologischen und strukturdirigierenden Funktionen verschiedener modifizierter Proteine gibt, ist die Auswirkung einer Proteincyclisierung auf die Funktion bisher nur selten studiert worden.^[4] Die Kopf-Schwanz-Cyclisierung („head-to-tail cyclization“) ist ein posttranslati- onaler Modifizierungsprozess, der fast ausschließlich bei ribosomal exprimierten Proteinen in Bakterien und seltener in Säugetieren und Pflanzen beobachtet wird.^[5] Cyclische Proteine zeigen vielversprechende biologische (besonders antibakterielle) Aktivität und sind bemerkenswert

stabil, was sie zu idealen Modellverbindungen für Studien macht, in denen der Einfluss der Cyclisierung auf Struktur- stabilität und biologische Aktivität untersucht wird.^[6]

Übliche Synthesestrategien für cyclische Peptide beruhen entweder auf der Cyclisierung von Peptiden mit geschützten Seitenketten unter Verwendung von Aktivierungsreagentien in Lösung oder an der festen Phase^[7] oder auf einer intramolekularen chemoselektiven Amidbildung durch NCL.^[8] Der zweite Weg führt direkt zu ungeschützten Cys-haltigen cyclischen Peptiden und nutzt damit die Vorteile eines strukturassistenten intramolekularen Ringschlusses.^[9] Nicht Cys-haltige Peptide können durch anschließende chemische Umwandlungen, wie die Cys-Desulfurisierung,^[10] oder durch Auxiliarmethoden erhalten werden.^[11]

Im Rahmen der Entwicklung einer direkten Syntheseroute zu nicht Cys-haltigen Kopf-Schwanz-verbrückten cyclischen Polypeptiden, die einen direkten Zugang zu wichtigen Repräsentanten der posttranslational modifizierten cy-



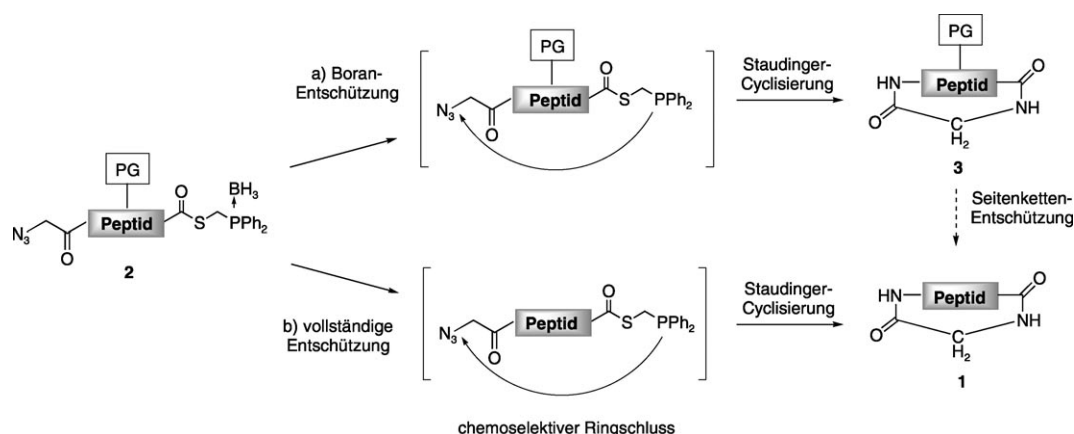
Scheme 1. A) Spurlose Staudinger-Ligation.^[14] B) Baseninduzierte Staudinger-Cyclisierung.^[22] DABCO = 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan.

clischen Proteine wie dem 70-gliedrigen Bacteriocin AS48 ermöglicht,^[12] sollte in der hier vorgestellten Studie die spurlose Staudinger-Ligation^[13] für die Konjugation der Peptidtermini in kleinen peptidischen Modellverbindungen verwendet werden. Die spurlose Staudinger-Ligation, die zuerst von den Arbeitsgruppen um Raines und Bertozzi beschrieben wurde,^[14a,b] beruht auf der Staudinger-Reaktion^[15] eines Azides mit einem Phosphan zu einem Iminophosphoran, das intramolekular als Aza-Ylid mit einem internen Elektrophil, in diesem Fall einem Thioester, unter Bildung einer nativen Amidbindung reagiert (Schema 1 A). Daher benötigt die spurlose Staudinger-Ligation, im Unterschied zur NCL, keinen Cys-Rest an der Lignationsstelle. Seit ihrer ersten

[*] R. Kleinewieschede, Dr. C. P. R. Hackenberger
Institut für Chemie und Biochemie
Freie Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-838-52551
E-Mail: hackenbe@chemie.fu-berlin.de

[**] Wir danken der DFG für Unterstützung im Rahmen des Emmy Noether-Programms (HA 4468/2-1) und des SFB 765 „Multivalenz“ sowie dem FCI. Ilona Papp sei für experimentelle Vorarbeiten gedankt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200801514> zu finden.



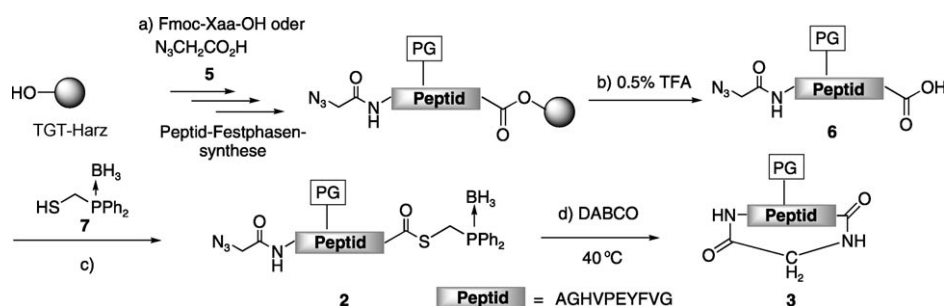
Schema 2. Synthesestrategie für die peptidische Staudinger-Cyclisierung a) mit und b) ohne Seitenketten-geschützte Peptide.

Beschreibung im Jahr 2000 ist die spurlose Staudinger-Ligation intensiv untersucht worden;^[14] zu nennen sind hier insbesondere eine kürzlich publizierte Variante mit wasserlöslichen Phosphanylthiolen,^[16] zahlreiche mechanistische Studien^[17] sowie Anwendungen wie die ortsspezifische Immobilisierung von Peptiden auf Oberflächen^[18] und die Ligation von geschützten (Glyco-)Peptid-Fragmenten.^[19] Allerdings wurde die spurlose Staudinger-Ligation nur selten auf ihre Chemo-selektivität untersucht^[18a,19c,20] – anders als die „bioorthogonale“ Staudinger-Ligation, die von Bertozzi et al. für die chemoselektive Funktionalisierung von metabolisch veränderten Azidoglycanen in zellulärer Umgebung entwickelt wurde.^[21] Des Weiteren ist die spurlose Staudinger-Ligation noch nicht auf die Ligation ungeschützter Peptidfragmente angewendet worden.

Bei der hier vorgestellten Strategie sollte das Konzept der Boran-geschützten Phosphanylthiole zum Einbau der für eine Staudinger-Ligation benötigten reaktiven Gruppen – Azid und Phosphan – in einem Molekül zur Anwendung kommen (Schema 1B).^[20,22] Nach basischer Boran-Entschützung^[23] kann eine intramolekulare Variante der spurlosen Staudinger-Ligation ablaufen, die bereits auf die Synthese von Lactamen und Biaryl-haltigen Naturstoffanaloga angewendet wurde. Dieses Verfahren einer induzierten spurlosen Staudinger-Ligation ermöglicht im Prinzip zwei Syntheserouten zu cyclischen Peptiden **1**, die beide von einem geschützten peptidischen Phosphanylthioester **2** ausgehen: a) Die Cyclisierung wird durch Boran-Entschützung in Gegenwart von Seitenketten-Schutzgruppen eingeleitet, die ein geschütztes cyclisches Peptid **3** liefert, das abschließend entschützt werden muss (Schema 2a). b) Eine chemoselektive Amidbildung in einem vollständig entschützten Peptid eröffnet einen direkten Zugang zum cyclischen Peptid **1**, das nicht mehr

weiter modifiziert oder entschützt werden muss (Schema 2b).

Die zuvor genutzten Bedingungen der Boran-Entschützung eines Phosphanylthioesters in der ersten Syntheseroute (70 °C)^[23] ließen eine generelle Anwendung für Polypeptid-ligationen schwierig erscheinen. Die Entschützung eines Boran-geschützten Acetylphosphanylthiois **4** (siehe Schema 4), das nach Literaturvorschriften erhalten werden kann, verlief unter vollständigem Umsatz bei 40 °C mit DABCO als Base.^[20,24] Für eine intramolekulare Anwendung in einer Peptidcyclisierung haben wir uns auf die Festphasenpeptidsynthese („solid phase peptide synthesis“, SPPS) eines difunktionalen Azido-Peptid-Phosphanylthioesters **2** konzentriert. Die Aminosäuresequenz 1–11 von Microcin J25 (GAGHVPEYFVG) wurde als Modellsequenz ausgewählt, da sie der terminalen zirkulären Schleife dieses mikrobiellen Peptides ähnelt.^[26] Eine 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Peptid-Festphasensynthese, in der Azidoglycin **5** im letzten Kupplungsschritt auf einem säurelabilen Tritylharz (TGT-Harz) gekuppelt wurde, lieferte nach Abspaltung mit 0.5 % TFA in CH₂Cl₂ mit 2.5 % TIS das C-terminal entschützte Peptid **6** (Schema 3). Dieses Peptid wurde durch Aktivierung mit DIC/DMAP in CH₂Cl₂ in den Phosphanylthioester **2** überführt. HPLC- und HRMS(ESI-ToF)-Analyse



Schema 3. Staudinger-Peptidcyclisierung über baseninduzierte Boran-Entschützung: Festphasensynthese des difunktionalen Azido-Peptid-Phosphanylthioesters **2**. Reagentien und Bedingungen: a) 1. Fmoc-Xaa-OH oder **5**, HBTU/HOBt, DIPEA, NMP; 2. 20% Piperidin, NMP; b) 0.5 % TFA, 2.5 % TIS, CH₂Cl₂, 2 h; c) **7** (1.5 Äquiv.), DIC (3 Äquiv.), DMAP (kat.), CH₂Cl₂, 8 h; d) DABCO (3 Äquiv.), DMF, 40 °C (4 h), dann 25 °C (36 h). HBTU = 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, HOBt = N-Hydroxybenzotriazol, TFA = Trifluoressigsäure, DIPEA = Diisopropylethylamin, NMP = N-Methyl-2-pyrrolidon, TIS = Triisopropylsilan, DIC = Diisopropylcarbodiimid.

(Abbildung 1 A und Hintergrundinformationen) zeigten einen vollständigen Umsatz zu **2**, auch wenn nur 1.1 Äquivalente des Phosphanylthiols **7** verwendet wurden, das durch Entschützung von **4** erhalten worden war.^[24] Die basenindu-

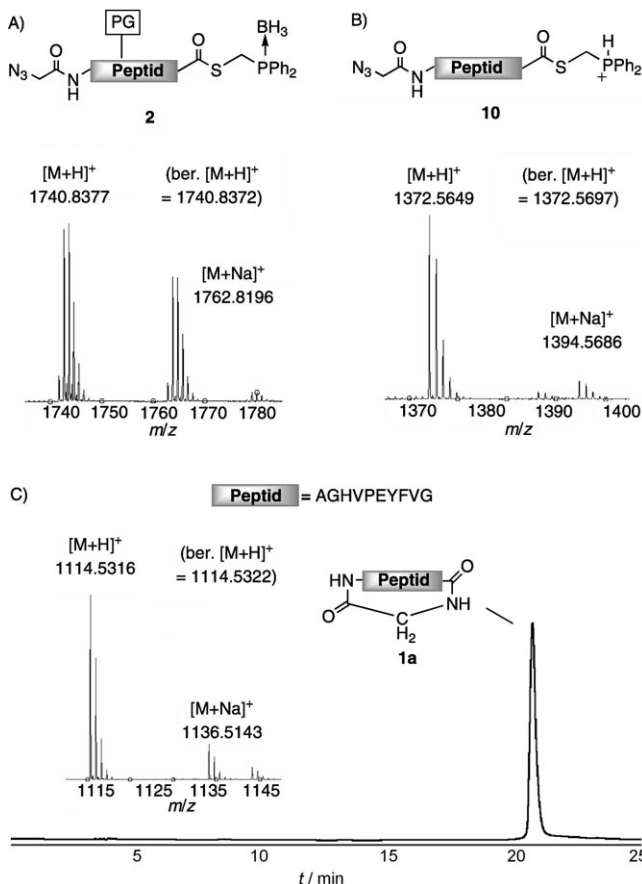
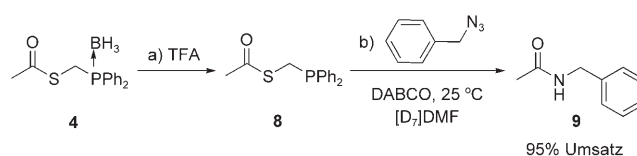


Abbildung 1. HRMS(ESI-ToF)-Analyse des difunktionalen Azido-Peptid-Phosphanylthioesters **2** (A) und des entschützten Azido-Peptid-Phosphanylthioesters **10** (B). C) HRMS(ESI-ToF)-Analyse und HPLC-Spektrum des cyclischen Peptides **1a** nach Aufreinigung.

zierte Staudinger-Ligation mit 7 mM **2** unter optimierten Bedingungen lieferte das cyclische Peptid **3** mit sehr gutem Gesamtumsatz und nur geringem Anteil eines oxidierten Nebenproduktes (siehe Hintergrundinformationen).

Zusätzlich zu dieser Kopf-Schwanz-Cyclisierung geschützter Peptidfragmente über baseninduzierte Staudinger-Cyclisierung wollten wir ein System entwickeln, das die chemoselektiven Eigenschaften der Staudinger-Reaktion nutzt (Schema 2b). Für eine solche Strategie musste eine Methode zur Entschützung der Peptidseitenketten sowie des Phosphanyl-Borans entwickelt werden, die keine abschließende Entfernung der Schutzgruppen des cyclischen Produktes erfordert. Daher wurde auf die weniger häufig genutzten sauren Bedingungen zur Entfernung der Boran-Schutzgruppe zurückgegriffen.^[27]

In Modellstudien wurde das Acetyl-geschützte Phosphanylthiol **4** mit TFA unter anschließender Entfernung der flüchtigen Bestandteile im Hochvakuum in das freie Phosphan **8** überführt (Schema 4). Detaillierte ¹H-, ³¹P- und ¹¹B-

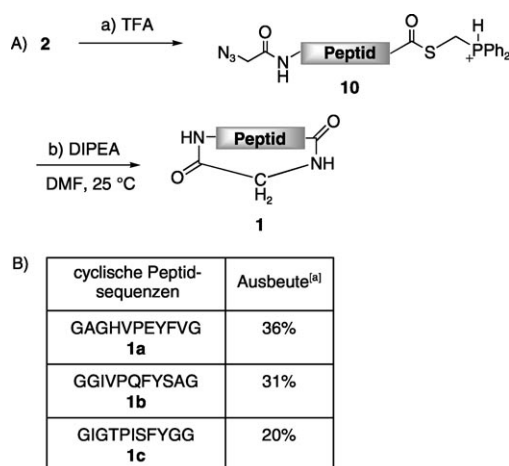


Schema 4. Modellstudien für die intermolekulare spurlose Staudinger-Ligation über saure Boran-Entschützung. Reagentien und Bedingungen: a) TFA, 1 h, dann Entfernung von TFA im Hochvakuum, 1 h; b) Benzylazid (1 Äquiv.), DABCO (2 Äquiv.), [D₇]DMF, 25 °C.

NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigten die vollständige Boran-Entschützung und demonstrierten die quantitative Umsetzung des vierwertigen Borans in eine weniger reaktive dreiwertige Boratspezies (siehe Hintergrundinformationen).^[28] Eine nachfolgende Testreaktion für die spurlose Staudinger-Ligation, in diesem Fall mit Benzylazid^[25] zu *N*-Benzylacetamid (**9**), lieferte unter optimierten Bedingungen exzellente Umsätze von bis zu 95%, wenn die Reaktionsmischung mit DABCO oder DIPEA versetzt wurde, um Reste von TFA zu kompensieren (siehe Hintergrundinformationen), und wenn kurze Entschützungszeiten (1 h) eingehalten wurden, um eine Hydrolyse des Thioesters zu unterbinden. Die Zugabe der Base ist eine Voraussetzung für hohe Umsätze bei der spurlosen Staudinger-Ligation, da TFA-Reste zur Protonierung des Iminophosphorans führen und so die Elektrophilie des Phosphorzentrums und damit die Staudinger-Reduktion zum Amin begünstigen würden.

Die Strategie der sauren Entschützung hat mehrere Vorteile gegenüber der baseninduzierten Variante: Die Entschützung gelingt bei Raumtemperatur, die reaktive Boranspezies wurde in ein chemisch weniger reaktives Borat überführt, und mildere Basen als DABCO können in der Reaktionssequenz verwendet werden. Der wichtigste Vorteil besteht allerdings darin, dass die TFA-induzierte Boran-Entschützung eines Azido-Peptid-Phosphanylthioesters **2** zu einer gleichzeitigen Entschützung der Peptidseitenketten führt, was eine Amidbildung in Gegenwart ungeschützter Peptidfunktionalitäten durch die spurlose Staudinger-Ligation ermöglicht.

Diese vorteilhaften Eigenschaften wurden anhand des Azido-Peptid-Phosphanylthioesters **2** demonstriert, der bei Umsetzung mit einer Lösung aus 97.5 % TFA und 2.5 % TIS den entschützten Azido-Peptid-Phosphanylthioester **10** lieferte (Schema 5 A). Peptid **10**, das durch HPLC und HRMS (ESI-ToF) analysiert wurde, (Abbildung 1B und Hintergrundinformationen), zeigte keine Tendenz zur Staudinger-Cyclisierung ohne Basenzugabe. Es war jedoch schwierig, Peptid **10** durch HPLC zu reinigen, da eine teilweise Oxidation des Phosphans beobachtet wurde. Aus diesem Grund beschlossen wir, die Staudinger-Cyclisierung direkt nach der TFA-Entschützung zu induzieren. Nach Ausfällen aus wasserfreiem kaltem Diethylether wurde Peptid **10** auf eine Konzentration von 7 mM in wasserfreiem DMF verdünnt und mit DIPEA versetzt, um die Staudinger-Cyclisierung einzuleiten. Eine HPLC-Analyse offenbarte als Hauptprodukt der Ligation das vollständig entschützte cyclische Peptid **1a**, das durch HRMS verifiziert wurde (siehe Hintergrundinformationen); des Weiteren wurde der oxidierte Phosphanylthio-



Schema 5. Peptidische Staudinger-Cyclisierung über saure Boran-Entschützung: A) TFA-Entschützung des difunktionalen Azido-Peptid-Phosphanylthioesters **2** und anschließende Staudinger-Cyclisierung. B) Sequenzen der cyclischen Peptide **1a–c** und Ausbeuten an isoliertem Produkt nach präparativer HPLC. Reagentien und Bedingungen: a) 97.5 % TFA, 2.5 % TIS, 1 h, dann Ausfällen aus wasserfreiem kaltem Diethylether; b) DIPEA (20 Äquiv.), DMF, 12 h. Details zur HPLC- und HRMS-Analyse finden sich in den Hintergrundinformationen. [a] Ausbeute an isoliertem Produkt nach HPLC-Reinigung (über drei Stufen, siehe Text und Hintergrundinformationen).

ester mit einem N-terminalen Azid als Nebenprodukt identifiziert. Es wurden keine intermolekularen Kupplungsprodukte beobachtet. Das cyclische Peptid **1a** (cyclo-GAGHVPEYFVG) wurde mithilfe präparativer HPLC gereinigt und durch HRMS charakterisiert (Abbildung 1C). Da zwischen den einzelnen Stufen keine HPLC-Reinigung stattgefunden hatte, konnte nur die Gesamtausbeute ermittelt werden; diese betrug 36 % über die gesamte dreistufige Syntheseroute, die die Thioestersynthese, die TFA-Entschützung sowie die finale Cyclisierung einschließt.

Die gleiche Synthesevorschrift wurde auch auf die Cyclisierung zweier weiterer Undecapeptide angewendet: Peptid **1b** hat eine weitere Hydroxygruppe und ein Seitenkettenamid (Sequenz: GGIVPQFYSG). Gesamtausbeute (31 %) und Nebenprodukte waren ähnlich wie im Fall von **1a** (Schema 5B). Abschließend wurde Peptid **1c**, das die restlichen Aminosäuren der Microcin-J25-Sequenz enthält (Sequenz: GIGTPISFYGG), in einer Ausbeute von 20 % erhalten.

Wir haben eine Synthese cyclischer Peptide entwickelt, die auf zwei Strategien einer induzierten Staudinger-Ligation fußt. Unsere Methode eröffnet einen effizienten Zugang zu geschützten und ungeschützten Peptid-Phosphanylthioestern durch Verwendung eines säurelabilen Tritylharzes. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die saure Boran-Entschützung eine chemoselektive Peptidligation in Gegenwart funktioneller Peptidseitenketten und damit die generelle Anwendung der spurlosen Staudinger-Ligation in (Poly-)Peptidligationen ermöglicht, da keine Cysteinreste für die Amidbildung benötigt werden. Des Weiteren ist keine abschließende Entschützung des Peptidproduktes erforderlich. Obwohl noch nicht alle funktionellen Aminosäureseitenketten getestet

worden sind, demonstriert diese Studie bereits das Potenzial der spurlosen Staudinger-Ligation als eine chemoselektive Reaktion zur Amidbildung bei der Synthese natürlicher Peptidsubstrate.

Die Cyclisierung in Gegenwart ungeschützter Seitenketten könnte von einer strukturellen Vororganisation der Termini profitieren, die eine intramolekulare Amidbildung gegenüber einer intermolekularen begünstigen würde.^[9] Derzeit untersuchen wir diesen strukturellen Einfluss in Kombination mit den Auswirkungen der Peptidkonzentrationen auf die Gesamtausbeute und arbeiten an der Entwicklung einer intermolekularen chemoselektiven Staudinger-Ligation sowie an der Cyclisierung größerer Polypeptidsequenzen in wässrigen Lösungen.

Experimentelles

Synthese des geschützten difunktionalen Azido-Peptid-Phosphanylthioesters **2:** Das Azido-Peptid wurde durch Standard-Fmoc-Peptid-Festphasensynthese mit dem Peptidsynthesizer ABI 433a hergestellt (Fast-moc-Verfahren mit HBTU/HOBt-Aktivierung). Ein TGT-Harz (Novabiochem) wurde als feste Phase verwendet, wobei die erste Aminosäure (Gly) schon gekuppelt vorlag. Das Peptid wurde vom Harz mit 0.5-proz. TFA-Lösung in CH_2Cl_2 (mit 2.5 % TIS) innerhalb von 2 h abgespalten. Das Harz wurde abfiltriert und mit CH_2Cl_2 gewaschen. Das Filtrat und die Waschfraktionen wurden vereinigt, und das Solvens wurde im Hochvakuum entfernt. Das C-terminal ungeschützte Peptid wurde in wasserfreiem CH_2Cl_2 gelöst (5 mL/0.033 mmol). Nach Versetzen mit 3 Äquiv. DIC und katalytischen Mengen DMAP wurden 1.5 Äquiv. des Boran-geschützten Diphenylphosphanylmethanthiols (**7**) zugegeben, und die Reaktionsmischung wurde 12 h gerührt. Der Umsatz zum Phosphanylthioester **2** wurde durch HPLC- und HRMS-Analyse bestimmt (siehe Hintergrundinformationen).

TFA-Entschützung von **2 und anschließende Staudinger-Cyclisierung:** Das Rohprodukt **2** der Phosphanylthioestersynthese wurde zur Entschützung 1 h mit 97.5 % TFA und 2.5 % TIS (0.5 mL/0.033 mmol) umgesetzt. Der vollständig entschützte Thioester **10** wurde durch Zugabe von 10 mL wasserfreiem Diethylether ausgefällt, durch HPLC und HRMS charakterisiert (siehe Hintergrundinformationen) und in wasserfreiem DMF aufgelöst (5 mL/0.033 mmol).

Für die Cyclisierung wurden 20 Äquiv. DIPEA zugegeben und 12 h umgesetzt. Das cyclische Peptid **1a** wurde durch präparative HPLC gereinigt und durch HRMS analysiert.

Eine HPLC- und eine HRMS-Analyse der Peptide **1a–c**, **2**, **3** und **10** sind in Abbildung 1 und den Hintergrundinformationen gezeigt. Eine NMR-Analyse zur TFA-Entschützung von **4** zu **8** sowie weitere Synthesevorschriften finden sich ebenfalls in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 31. März 2008

Online veröffentlicht am 4. Juli 2008

Stichwörter: Cyclisierungen · Peptide · Proteindesign · Schutzgruppen · Staudinger-Ligation

[1] a) C. T. Walsh in *Posttranslational Modifications of Proteins*, Roberts and Company Publishers, Colorado, **2003**; b) B. G. Davis, *Science* **2004**, 303, 480–482; c) F. Wold, *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, 50, 783–814.

[2] a) T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 249–289; b) J.-P. Pellois, T. W. Muir, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 487–491;

- c) D. Rauh, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 840–844; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 826–829; d) C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.*, DOI: 10.1002/ange.200801313; *Angew. Chem. Int. Ed.*, DOI: 10.1002/anie.200801313.
- [3] P. E. Dawson, T. W. Muir, J. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779. Pionierarbeiten: T. Wieland, E. Bockelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebig's Ann. Chem.* **1953**, 583, 129.
- [4] Übersichtsartikel zu den Auswirkungen einer Peptidcyclisierung auf Struktur und Funktion: a) J. S. Davies in *Cyclic Polymers*, 2. Aufl. (Hrsg.: J. A. Semlyen), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2000**, S. 85–124; b) H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 703–703; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512–689; c) P. Wipf, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2115–2134.
- [5] M. Trabi, D. J. Craik, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 132–138.
- [6] Struktur- und Faltungsstudien von zirkulären Varianten einer src-SH3-Domäne: a) J. A. Camarero, D. Fushman, S. Sato, I. Girit, D. Cowburn, D. P. Raleigh, T. W. Muir, *J. Mol. Biol.* **2001**, *308*, 1045–1062; b) V. P. Grantcharova, D. Baker, *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 555–563.
- [7] a) M. Chorev, E. Roubini, R. L. McKec, S. W. Gibbons, M. E. Goldman, M. P. Caulfield, M. Rosenblatt, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5968–5974; b) M. Bodanszky in *Principles of Peptide Synthesis*, Springer, Berlin, **1984**; c) N. Seewald, H.-D. Jakubke in *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, S. 311–319.
- [8] a) J. A. Camarero, T. W. Muir, *Chem. Commun.* **1997**, 1369–1370; b) L. Zhang, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2363–2370; c) R. Quaderer, D. Hilvert, *Chem. Commun.* **2002**, 2620–2621.
- [9] a) J. A. Camarero, J. Pavel, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 361–364; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 347–349; b) G. S. Beligere, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6332–6333; c) J. Blankenstein, J. Zhu, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1949–1964.
- [10] a) L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526–533; b) Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9408–9412; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248–9252.
- [11] Y. Shao, W. Lu, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3911–3914.
- [12] a) M. Maqueda, A. Galvez, M. M. Bueno, M. J. Sanchez-Barrena, C. Gonzalez, A. Albert, M. Rico, E. Valdivia, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, *5*, 399–416; b) D. J. Craik, N. L. Daly, I. Saska, M. Trabi, K. J. Rosengren, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 4011–4021.
- [13] Übersichtsartikel: M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3168–3178; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106–3116.
- [14] a) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939–1941; b) E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143; c) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 9–12; d) M. B. Soellner, A. Tam, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9824–9830.
- [15] J. Meyer, H. Staudinger, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646.
- [16] A. Tam, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11421–11430.
- [17] a) M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8820–8828; b) A. Tam, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1173–1175.
- [18] a) M. B. Soellner, K. A. Dickson, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11790–11791; b) M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schroeder, L. Soulere, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6010–6014; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830–5834; c) A. Watzke, M. Gutierrez-Rodriguez, M. Köhn, R. Wacker, H. Schroeder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6288–6306; d) A. Watzke, M. Köhn, M. Gutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schroeder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1436–1440; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1408–1412.
- [19] a) B. L. Nilsson, R. J. Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268–5269; b) L. Liu, Z.-Y. Hong, C.-H. Wong, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 429–432; c) R. Merckx, D. T. S. Rijkers, J. Kemmink, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4515–4518.
- [20] Konjugation ungeschützter Zuckerderivate an Proteinträger über spurlose Staudinger-Ligation: C. Grandjean, A. Boutonier, C. Guerreiro, J.-M. Fournier, L. A. Mulard, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7123–7132.
- [21] a) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010; b) N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 644–648; Übersichtsartikel: J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.
- [22] a) O. David, W. J. N. Meester, H. Bieräugel, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4509–4511; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4373–4375; b) G. Masson, T. den Hartog, H. E. Schoemaker, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Synlett* **2006**, 865–868.
- [23] a) B. Carboni, L. Monnier, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1197–1248; b) T. Imamoto, T. Oshiki, T. Onazawaj, T. Kusmoto, K. Sato, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5244–5252.
- [24] M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4993–4996.
- [25] Obwohl die hier beschriebenen Azide offensichtlich stabil sind, empfehlen wir dringend Vorsichtsmaßnahmen und Schutzapparaturen während der Handhabung von Aziden, besonders bei Aziden mit geringem Molekulargewicht, bei Reaktionen unter erhöhten Temperaturen und bei Verwendung/Herstellung von konzentrierten Lösungen. Siehe auch: S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5320–5374; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5188–5240.
- [26] M. J. Bayro, J. Mukhopadhyay, G. V. T. Swapna, J. Y. Huang, L.-C. Ma, E. Sineva, P. E. Dawson, G. T. Montelione, R. H. Ebright, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12382–12383.
- [27] P. Shapland, E. Vedejs, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4094–4100.
- [28] H. Nöth, B. Wrackmeyer in *NMR Spectroscopy of Boron Compounds*, Springer, Berlin, **1978**.