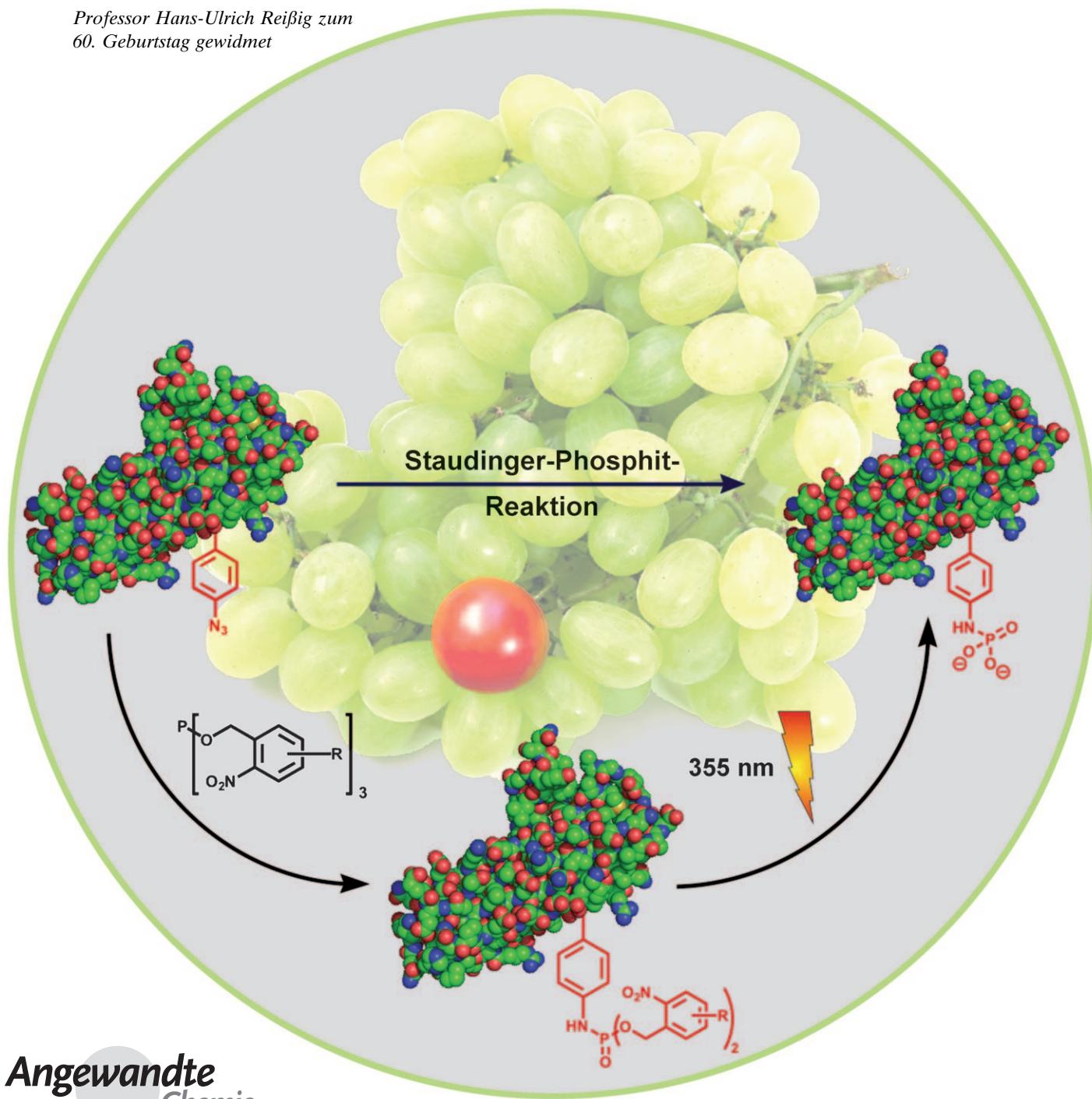


Chemoselektive Staudinger-Phosphit-Reaktion von Aziden für die Phosphorylierung von Proteinen**

Remigiusz Serwa, Ina Wilkening, Giuseppe Del Signore, Michaela Mühlberg, Iris Claußnitzer, Christoph Weise, Michael Gerrits und Christian P. R. Hackenberger*

Professor Hans-Ulrich Reißig zum
60. Geburtstag gewidmet



Chemoselektive Reaktionen haben sich zu wichtigen Werkzeugen in der chemischen Forschung, insbesondere in den modernen Lebenswissenschaften, entwickelt.^[1,2,3a] Sie ermöglichen beispielsweise die Synthese modifizierter Proteine für biologische Studien und somit die Evaluierung post-transkriptionaler Modifizierungen, wie Phosphorylierung und Glycosylierung, in Prozessen der Signaltransduktion und -regulierung.^[3] Weiterhin können biophysikalische Sonden oder andere funktionelle Komponenten in komplexe Biomoleküle, sogar in zellulärer Umgebung, eingeführt werden, um biologische Vorgänge zu visualisieren oder spezifische Funktionen zu generieren.^[1-3]

Für eine biologische Anwendung muss eine chemoselektive Reaktion mit einer singulären chemischen Funktionalität in einem komplexen Biomolekül unter milden wässrigen Bedingungen bei Raumtemperatur gelingen. Um die Positionierung einer gewünschten Modifikation im biologischen Zielmolekül perfekt zu steuern, haben sich besonders Reaktionen mit zwei nichtnatürlichen Reaktionspartnern als nützlich erwiesen, da so eine einzige funktionelle Gruppe in einem komplexen Biopolymer adressierbar ist. Mehrere solcher bioorthogonaler^[4] Reaktionen wurden in den letzten Jahren identifiziert und genutzt, die auf den Einbau nichtnatürlicher Funktionalitäten, üblicherweise als chemische Reporter („chemical reporters“) bezeichnet,^[2a,4] in biologische Moleküle zurückgreifen.^[5,6]

Unter diesen chemoselektiven Reaktionen wurden Azidumwandlungen besonders populär, da mehrere biochemische Verfahren für die Synthese azidhaltiger Biopolymere existieren. Dazu gehören die auxotrophe Exprimierung, die nichtnatürliche Proteintranslation sowie metabolische und enzymatische Prozesse.^[5,6] Beispiele für chemoselektive Azidreaktionen sind die Cu¹-katalysierte („Klick-Chemie“)^[7,8] und die spannungsinduzierte [3+2]-Cycloaddition,^[9] wobei in beiden Fällen Alkine als Substrate mit Aziden zu Triazolen reagieren. Trotz ihrer häufigen Anwendung haben diese Reaktionen nach wie vor einige Nachteile. Insbesondere die Verwendung toxischer Cu¹-Katalysatoren limitiert In-vivo-Anwendungen, oder es müssen große Modifikationseinheiten im Linker zwischen Biopolymer und funktionellem Modul in Kauf genommen werden.^[10] Eine

andere chemoselektive Reaktion, die Staudinger-Ligation,^[11] baut auf der Reaktivität der Staudinger-Reaktion auf, in der Azide **1** mit P^{III}-Verbindungen, hier Phosphanen **2**, Iminophosphorane **3** bilden (Schema 1A). Um die Hydrolyse der P=N-Bindung zu einem Amin **4** zu unterbinden,^[12] hat die Gruppe um Bertozzi eine intramolekulare elektrophile Falle in das Phosphan **5** eingebaut, die mit dem nucleophilen Stickstoffatom des Iminophosphorans reagiert (Schema 1B). Diese Strategie zur chemoselektiven Modifizierung hat vielfältige Anwendungen in der Markierung^[4,13] und in der Immobilisierung^[14] von DNA und Proteinen, sogar in lebenden Organismen, gefunden,^[15] wobei manchmal die Phosphan-oxidation die Anwendbarkeit dieser Reaktion reduziert.^[10]

Wir haben nun eine weitere Reaktion vom Staudinger-Typ für die chemoselektive Funktionalisierung von Aziden identifiziert, die unter milden Bedingungen mit komplexen biologischen Molekülen in hohen Ausbeuten verläuft (Schema 1C).^[16,17] Diese Reaktion beruht auf einem zweistufigen Prozess, in dem ein Phosphorimidat **7** aus einem Phosfit **6** und einem Azid **1** gebildet und anschließend zu einem Phosphorimidat **8** hydrolysiert wird. Obwohl diese Reaktion literaturbekannt ist^[18] und insbesondere für die Synthese von DNA-Oligomeren mit Phosphorimidatlinkern in THF oder Pyridin verwendet wurde,^[18b,19] wurde sie nach unserem Wissen bisher nicht als chemoselektive Reaktion für die Modifizierung von Peptiden und Proteinen eingesetzt. Außerdem wurden Staudinger-Phosfit-Reaktionen bisher nicht in reinem Wasser oder in Puffern durchgeführt, was eine essenzielle Voraussetzung für den Einsatz in anspruchsvollen Peptid- und Proteinmodifizierungen ist.

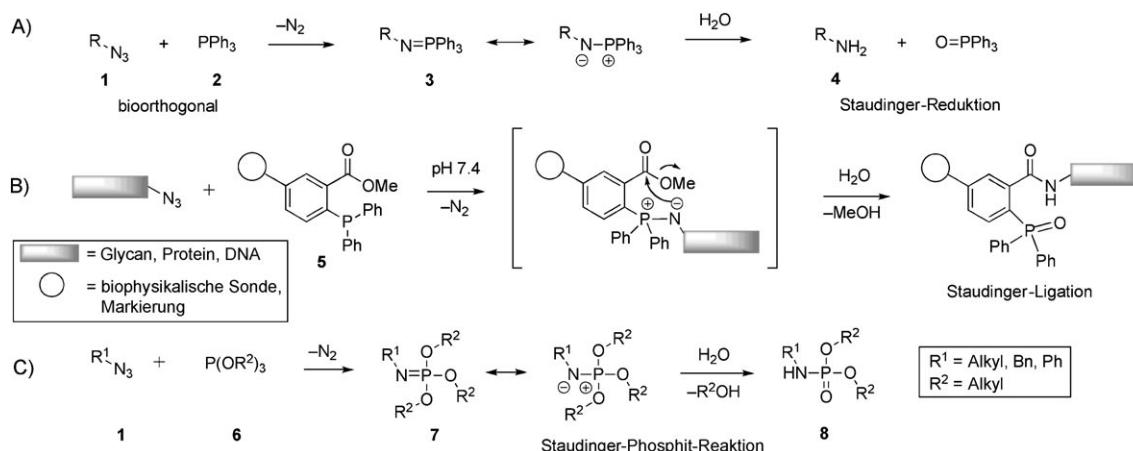
Unser erstes Ziel war es, die breite Anwendbarkeit dieser Reaktion unter milden Reaktionsbedingungen für die Modifizierung von Peptiden zu demonstrieren. Dabei beobachteten wir, dass die Staudinger-Reaktion von Phenylazid (**1a**) mit symmetrischen Phosfiten **6** bei Raumtemperatur in Lösungsmitteln wie CH₂Cl₂, Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO) und sogar Wasser, in dem einige der Startmaterialien nicht vollständig löslich sind, abläuft (Tabelle 1).^[20] Während der Hydrolyse trat, anders als bei der analogen Reaktion mit Phosphanen, keine P-N-Spaltung auf, sondern es wurde bei Raumtemperatur ein primäres Phosphorimidat **8** in Ausbeuten von 80–90 % gebildet (Tabelle 1, Nr. 1–5). Die Hydrolyse ist auch unter Zweiphasenbedingungen in unpolaren Lösungsmitteln möglich; allerdings ist dann die Reaktionszeit länger.

Als nächstes sollte die Staudinger-Phosfit-Reaktion zur chemoselektiven Modifizierung von azidhaltigen Peptiden mit kommerziell erhältlichen Phosfiten genutzt werden. Die Modellpeptide enthielten neben einem Azido-Phe-Baustein mehrere in Proteinen vorkommende funktionelle Gruppen und wurden durch Peptidfestphasensynthese (SPPS) hergestellt. Nach der Abspaltung mit Trifluoressigsäure (TFA) und der Reinigung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) konnten so die Phenylazidopeptide **1b** und **1c** erhalten werden, die anschließend mit Tributyl- bzw. Triethylphosfit versetzt wurden. Die Umsetzung verlief am besten in DMSO und lieferte nur minimale Mengen an Anilinpeptiden aus einer P-N-Spaltung oder umgelagerten Produkten.^[16] Nach vollständigem Azidumsatz wurden die Peptide

[*] Dr. R. Serwa, I. Wilkening, Dr. G. Del Signore, M. Mühlberg, Dr. C. Weise, 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
I. Claußnitzer, Dr. M. Gerrits
RiNA GmbH
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)

[**] Wir bedanken uns für finanzielle Unterstützung bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Emmy-Noether-Programms (HA 4468/2-1) und des SFB 765 sowie beim Fonds der Chemischen Industrie (FCI). Wir danken Dr. Dirk Schwarzer, Dr. Verena Böhrsch, Denise Homann, Silvia Muth, Benjamin Horstmann und Wiebke Ahlbrecht für experimentelle Beiträge und sehr hilfreiche Diskussionen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200902118> zu finden.



Schema 1. A) Staudinger-Reaktion von Aziden mit Phosphanen und anschließende Hydrolyse des Iminophosphorans zum primären Amin (Staudinger-Reduktion). B) Staudinger-Ligation. C) Staudinger-Phosphit-Reaktion und anschließende Hydrolyse des Phosphorimidats zum Phosphoramidat.

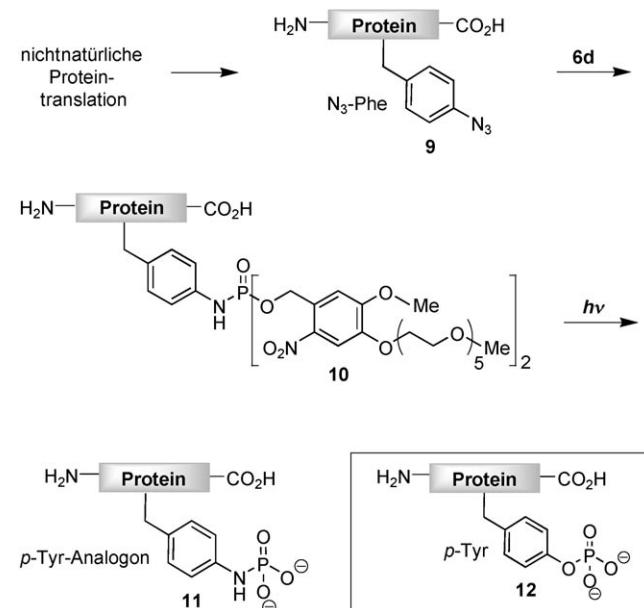
Tabelle 1: Bildung der Phosphoramidate **8** über eine Staudinger-Phosphit-Reaktion mit nachfolgender Hydrolyse.^[a]

Nr.	Azid	Phosphit, R^2	Lösungsmittel	Produkt	Ausb. [%]
				1a	8
1	1a	6a , Me	CH_2Cl_2	8a	84
2	1a	6a , Me	DMF	8a	88
3	1a	6a , Me	H_2O	8a	78
4	1a	6b , Et	CH_2Cl_2	8b	90
5	1a	6b , Et	H_2O	8b	80
6	1b	6c , <i>n</i> Bu	DMSO	8c	63
7	1c	6b , Et	DMSO	8d	39
8	1b	6d , 	Tris-Puffer $pH\ 8.2$	8e	50

[a] Reagenzien und Reaktionsbedingungen: 1. Phosphit **6** (1–10 Äquiv.), Raumtemperatur, 6–24 h; 2. H_2O , Raumtemperatur, 0–48 h. Für weitere Details siehe *Experimentelles* und die Hintergrundinformationen.

8c und **8d** durch HPLC gereinigt und in guten Gesamtausbeuten isoliert (Tabelle 1, Nr. 6 und 7).^[21] Bemerkenswert war, dass beim Cys-Peptid nur die Azidfunktion modifiziert wurde.

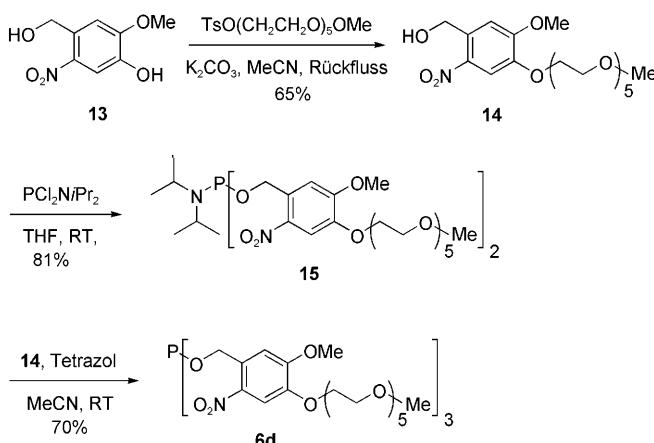
Nach der chemoselektiven Modifizierung von Azidopeptiden richteten wir unsere Aufmerksamkeit auf eine wichtige funktionelle Gruppe mit großem biologischem Potenzial, die sich durch eine chemoselektive Reaktion in ein Protein einbauen lässt. Geladene Phosphoramidate **11** weisen eine große Ähnlichkeit zu den biologisch höchst relevanten phosphorylierten Tyrosinresten in Proteinen **12** auf und können daher als Mimetika von Phosphatestern aufgefasst werden, in denen der natürliche Sauerstoffsubstituent durch eine NH-Gruppe ersetzt ist (Schema 2). Phosphoramidate **11** könnten durch eine milde lichtinduzierte Verseifung von 2-Nitrobenzyl-



Schema 2. Zweistufige Umsetzung eines in einem Protein enthaltenen Azidophenylalanin-Rests zum entsprechenden Phosphotyrosin-Analogen. Für Details siehe *Experimentelles* und die Hintergrundinformationen.

phosphoramidatestern **10** erhalten werden, wobei letztere aus phenylazidohaltigen Proteinen **9** und symmetrischen 2-Nitrobenzylphosphiten zugänglich wären.

Da Tris(2-nitrobenzyl)phosphit, das auf bekanntem Weg hergestellt wurde,^[22a] nur wenig in Wasser löslich ist, erhöhten wir seine Löslichkeit durch die Verknüpfung mit Ethylen-glycoleinheiten. Dazu wurde gemäß Schema 3 das Phosphit **6d** in drei Stufen aus dem einfach zugänglichen Alkohol **13**^[23] über **14** hergestellt. Obwohl **6d** aus **14** direkt mit PCl_3 oder $P(NAlk)_3$ in einer Stufe hergestellt werden konnte, waren die Ausbeuten signifikant höher, wenn das mit zwei Äquivalenten **14** gebildete Phosphoramidit **15** isoliert und anschließend mit einem dritten Äquivalent **14** umgesetzt wurde. Das



Schema 3. Synthese des wasserlöslichen Phosphits **6d**. Für Details siehe *Experimentelles* und die Hintergrundinformationen.

Phosphit **6d** mit fünfzehn Ethylenglycoleinheiten war in Wasser ausgezeichnet löslich (mehr als 60 mM).

6d wurde mit **1b** bei Raumtemperatur in Puffern von pH 7.4–8.2 umgesetzt. Die Reaktion lieferte in weniger als 8 h fast quantitativ **8e**, wobei weniger als 7% Anilinpeptid als Hydrolyseprodukt detektiert wurden (Abbildung 1). **8e**

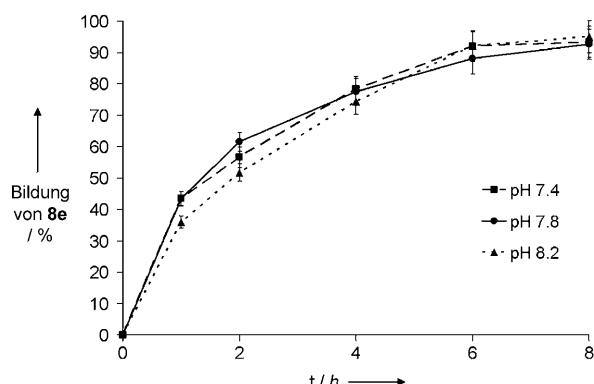


Abbildung 1. LC-UV-analytisch bestimmter Umsatz von **1b** (50 μM) mit **6d** (5 mM) zu **8e** in Pufferlösung bei Raumtemperatur. Für Details siehe *Experimentelles* und die Hintergrundinformationen.

wurde durch halbpräparative HPLC isoliert (Tabelle 1, Nr. 8). Untersuchungen zur Stabilität und zur lichtinduzierten Verseifung ergaben, dass **8e** in Puffern (pH 7.4–8.2) in der Dunkelheit 72 h stabil und nach 90 Sekunden Anregung mit einem 355-nm-Laser vollständig verseift war (Ergebnisse nicht gezeigt).

Anschließend sollte die Staudinger-Phosphit-Reaktion für eine ortsspezifische Phosphorylierung an nichtnatürlichen Stellen in Proteinen getestet werden.^[22,24] Dafür wurde ein Azido-Phe-Protein **9'**, das über nichtnatürliche Proteintranslation mit einem auf der *amber*-Suppression basierenden orthogonalen System erhalten wurde,^[5] als Reaktionspartner für **6d** verwendet.^[25]

Als Modellprotein diente das 17-kDa-Protein SecB **9'** mit einem *p*-Azido-Phe-Rest an Position 156 in der Proteinsequenz und einem C-terminalen His-Tag, das in einem zell-

freien orthogonalen Translationssystem exprimiert wurde (siehe *Experimentelles* und Hintergrundinformationen). Nach Reinigung über den His-Tag wurde **9'** mit **6d** bei pH 8.0 umgesetzt; dabei wurde ein vollständiger Umsatz des Azids zum Phosphoramidat **10'** beobachtet. Dies wurde anhand eines Gel-Shifts in der Proteinelektrophorese verifiziert, der in Einklang ist mit dem Molekulargewicht von **6d** (Abbildung 2 A). Die entstandene Phosphoramidateinheit in **10'** war in Lösung mehr als 72 h vollkommen stabil (keine Zersetzung im Proteingel).

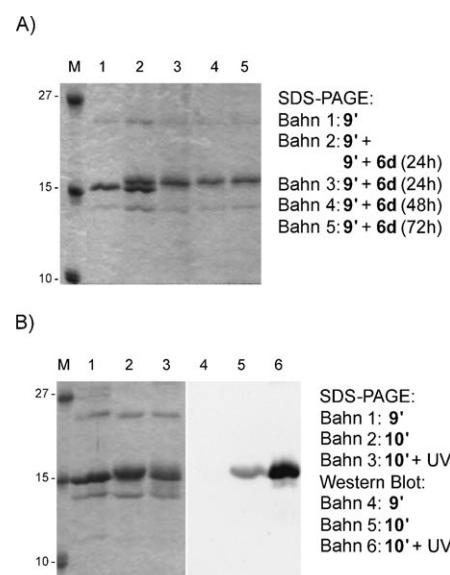


Abbildung 2. A) Analyse der Reaktionsmischung nach Inkubation des Azidoproteins **9'** (12.5 μM) mit **6d** (5 mM) durch SDS-PAGE (Coomassie-Färbung). B) SDS-PAGE (Coomassie-Färbung; Bahnen 1–3) und Western-Blot-Assay (Bahnen 4–6) für die isolierten Proteine **9'** und **10'** sowie nach 90 s Bestrahlung (355 nm) von **10'** in Lösung.

Um das biochemische Verhalten des Phosphoramidats als Mimetikum von phosphorylierten Proteinen zu evaluieren, wurde der Phosphoramidatester in **10'** durch Bestrahlung mit einem 355-nm-Laser zu **11'** verseift, und anschließend wurden die SecB-Proteine **9'**, **10'** und **11'** einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpertest in einem Western Blot unterworfen (Abbildung 2 B). Nach Luminol-basierter Visualisierung des Antikörpers wurden eine starke Antwort des Phosphorylierungsmimetikums in **11'** sowie keine Erkennung der Azidfunktion in **9'** beobachtet. Beim Phosphoramidatester **10'** trat eine schwache Interaktion auf, die wir auf eine unerwünschte partielle Photolyse der reaktiven photolabilen Schutzgruppe zurückführen. Weitere Studien zur Aufklärung dieser Beobachtung sind derzeit in Arbeit.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass die Staudinger-Phosphit-Reaktion eine metallfreie, chemoselektive Umsetzung von Azideinheiten in Peptiden und Proteinen ermöglicht. Diese Staudinger-Reaktion ist einfach durchzuführen und verwendet Phosphite, die durch organisch-chemische Standardverfahren herstellbar und stabil gegen Luftoxidation sind. Chemoselektive Umwandlungen mithilfe der Staudinger-Phosphit-Reaktion ermöglichen quantitative Modifizie-

rungen in unterschiedlichen Lösungsmitteln und Puffern bei Raumtemperatur. Werden lichtempfindliche Phosphite verwendet, können die entstehenden Phosphoramidatester zu Analoga von Phosphotyrosin in Proteinen hydrolysiert werden, die von Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern erkannt werden. Derzeit testen wir diese chemoselektive Phosphorylierungsstrategie für die Untersuchung biologisch relevanter Signaltransduktionsprozesse.

Experimentelles

Synthese der Azidopeptide **1b, c**: Die Peptide wurden mithilfe eines ABI-433-A-Peptid-Synthesizers mit Standard-Amidkupplungsmethoden (HBTU/HOBt; Fmoc-Protokoll) auf einem Wang-Harz mit Fmoc-*p*-azido-Phe-OH als letztem Aminosäurebaustein synthetisiert. Die Peptide wurden von der festen Phase mit 95 % TFA abgespalten und mit halbpräparativer HPLC gereinigt.

Generelles Verfahren für die Staudinger-Phosphit-Reaktion der Azidopeptide **1b, c**: Zu einer Lösung des Azidopeptids in DMSO oder Puffer (0.2 mL mg⁻¹ Peptid) wurde ein Phosphit **6** (5–10 Äquiv.) gegeben und die Mischung bei Raumtemperatur 6–24 h gerührt. Ohne weitere Aufarbeitung wurden die Phosphoramidatpeptide **8c–e** durch halbpräparative HPLC aus der Reaktionslösung isoliert und lyophilisiert. Für die LC-HRMS-Analysen siehe *Experimentelles* und die Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 20. April 2009

Online veröffentlicht am 27. Juli 2009

Stichwörter: Azide · Chemoselektivität · Phosphite · Phosphorylierungen · Staudinger-Reaktionen

- [1] H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 727–736.
- [2] a) J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21; b) N. Jessani, B. F. Cravatt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 54–59; c) P. F. van Swieten, M. A. Leeuwenburgh, B. M. Kessler, H. S. Overkleef, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 20–27; d) C. P. R. Hackenberger, S. Hinderlich, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1763–1765.
- [3] a) C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182–10228; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074; b) D. P. Gamblin, E. M. Scanlan, B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 131–163; c) G. Krauss, *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [4] Der Begriff „bioorthogonal“ wurde von C. R. Bertozzi eingeführt: G. A. Lemieux, C. L. de Graffenreid, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708–4709; eine anschließende Übersicht ist: D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 616–625.
- [5] Übersichten: a) L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 34–68; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34–66; b) L. Wang, J. Xie, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 225–249; c) N. Budisa, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6586–6624; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6426–6463; d) D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 645–652; e) J. Xie, P. G. Schultz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 548–554; f) A. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 603–609; g) M. Gerrits, J. Strey, I. Claußnitzer, U. von Groll, F. Schäfer, M. Rimmele, W. Stiege in *Cell-free Expression* (Hrsg.: T. Kudlicki, F. Katzen, R. Bennett) Landes Bioscience, Austin, 2007, Kap. 14. (<http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/3146>).
- [6] Übersichten über ortsspezifische Proteinmodifizierungen: a) H. M. O’Hare, K. Johnsson, A. Gautier, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 488–494; b) A. Dragulescu-Andrasi, J. Rao, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1099–1101; c) E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (Hrsg.: T. W. J. Gadella), Elsevier, Dordrecht, **2009**, Kap. 12.
- [7] a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; b) H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128–1137; c) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [8] Übersichten: a) P. Wu, V. V. Fokin, *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 7–17; b) R. Breinbauer, M. Köhn, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1147–1149; c) V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *51*–68; d) M. V. Gil, M. J. Arevalo, O. Lopez, *Synthesis* **2007**, 1589–1620; e) S. Dedola, S. A. Nepogodiev, R. A. Field, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1006–1017.
- [9] a) N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047; b) J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486–11493; c) X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285–2287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253–2255; d) J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793–16797; e) S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664–667.
- [10] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648.
- [11] a) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010. b) Übersicht: M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3168–3178; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106–3116. Spurlose Variante der Staudinger-Ligation: c) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939–1941; d) E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143; e) M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8820–8828; f) R. Kleinewieschede, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6073–6077; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5984–5988.
- [12] J. Meyer, H. Staudinger, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646.
- [13] a) K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19–24; b) R. A. Chandra, E. S. Douglas, R. A. Mathies, C. R. Bertozzi, M. B. Francis, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 910–915; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 896–901; c) M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2428–2431; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2394–2397; d) M.-L. Tsao, F. Tian, P. G. Schultz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2147–2149; e) S. C. Hsiao, A. K. Crow, W. A. Lam, C. R. Bertozzi, D. A. Fletcher, M. B. Francis, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8601–8605; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8473–8477.
- [14] 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.
- [15] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873–877.
- [16] Diese Reaktion beobachteten wir bei unseren Untersuchungen zur Lewis-Säure-katalysierten Phosphorimidat-amidat-Umlagerung bei Verwendung von nicht getrockneten Lösungsmitteln; siehe auch: I. Wilkening, G. del Signore, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Commun.* **2008**, 2932–2934.
- [17] Übersichten zu Staudinger-Reaktionen: a) Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353–1406; b) Y. G. Gololobov, I. N. Zhmurova, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 437–472; c) S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5320–5374; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5188–5240.
- [18] a) Erste Beschreibung: M. I. Kabachnik, V. A. Gilyarov, *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci. (Engl. Transl.)* **1956**, *5*, 809–

- 816; b) R. L. Letsinger, G. A. Heavner, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 147–150; c) A. Zidani, R. Carrié, M. Vaultier, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1992**, *129*, 71–75; d) J. Xue, J. Wu, Z. Guo, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1365–1368; e) T. Kline, M. S. Trent, C. M. Stead, M. S. Lee, M. C. Sousa, H. B. Felise, H. V. Nguyen, S. I. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1507–1510.
- [19] a) R. L. Letsinger, M. E. Schott, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7394–7396; b) J. Nielsen, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6275–6276; c) M. Mag, R. Schmidt, J. W. Engels, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7319–7322.
- [20] Obwohl die hier beschriebenen Azide offensichtlich stabil sind, empfehlen wir dringend Vorsichtsmaßnahmen und Schutzapparaturen während der Handhabung von Aziden, besonders bei Aziden mit niedrigem Molekulargewicht, bei Reaktionen unter erhöhten Temperaturen und bei Verwendung/Herstellung von konzentrierten Lösungen; siehe auch Lit. [17c].
- [21] Alle Peptidprodukte waren einfach zu handhaben und zu isolieren und auch bei längerer Lagerung stabil, d.h., die isolierten Phosphoramidatpeptide sind sehr stabil.
- [22] a) T. Arslan, S. V. Mamaev, N. V. Mamaeva, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10877–10887; b) G. F. Short III, A. L. Laikhter, M. Lodder, Y. Shayo, T. Arslan, S. M. Hecht, *Biochemistry* **2000**, *39*, 8768–8781.
- [23] a) S.-C. Tsai, J. P. Klinman, *Bioorg. Chem.* **2003**, *31*, 172–190; b) G. Lu, K. Burgess, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3902–3905.
- [24] Für den Einbau von photoaktivierbaren Phosphoserin- und Phosphotyrosinresten in Proteine durch In-vitro-Nonsense-Suppression siehe: D. M. Rothman, E. J. Petersson, M. E. Vazquez, G. S. Brandt, D. A. Dougherty, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 846–847.
- [25] Zur Semisynthese von phosphorylierten Proteinen und deren Mimetika siehe: a) M. E. Hahn, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5924–5927; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5800–5803; b) D. Schwarzer, Z. Zhang, W. Zheng, P. A. Cole, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4192–4193.