

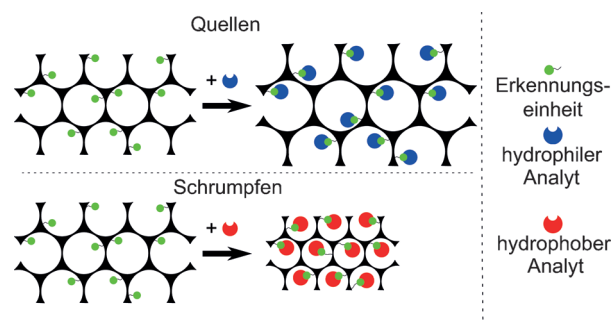
Inverse Opale aus responsiven Hydrogelen für die Detektion von Makromolekülen**

Jean-Philippe Couturier, Martin Sütterlin, André Laschewsky,* Cornelia Hettrich und Erik Wischerhoff*

Abstract: Doppelt responsive Hydrogele in Form inverser Opale ermöglichen neue autonome Sensorsysteme für (Bio)-Makromoleküle, indem ein analytinduzierter Phasenübergang die Strukturfarbe des Opals ändert. Die auf Oligo(ethylenglycol)-Makromonomeren basierenden thermoresponsiven Systeme enthalten Comonomere mit diversen Erkennungseinheiten. Andocken eines Analyten verschiebt die Temperatur des Volumenphasenübergangs vom LCST-Typ und induziert durch die spezifische Erkennung ein Quellen des Hydrogels. Dies verschiebt die Lage der optischen Bragg-Bande bis weit über 100 nm und erlaubt die Detektion mit einfachen optischen Methoden. Dabei fördert die inverse Opalstruktur die effektive Diffusion auch von makromolekularen Analyten, wie von Glycopolymere und Proteinen, im photonischen Kristall. Das variable Systemdesign liefert eine breit anpassbare Plattform für die Entwicklung von einfach zu verwendenden, schnellen und preisgünstigen Sensoren für Pathogene.

Dreidimensionale photonische Kristalle, speziell synthetische Opale und inverse Opale, sind eine attraktive Basis für autonome Chemosensoren oder kolorimetrische Bioassays. Typischerweise ändert sich durch das Andocken eines Analyten an eine geeignete funktionelle Gruppe, die im photonischen Kristall eingebaut ist, ihre Strukturfarbe,^[1] da sich die Bedingungen für die konstruktive Interferenz von reflektiertem Licht ändern. Auch wenn die Farbverschiebung sowohl durch eine Änderung des Brechungsindex als auch des Abstands der Gitterebenen induziert werden kann, ist der zweite

Ansatz der effektivere.^[2] Im Fall von Bioassays wird der Kolloidkristall vorteilhaft aus einem Hydrogel aufgebaut (inverses Opal-Hydrogel, IOH), das auf eine Veränderung der Hydrophilie des gesamten Systems durch die Bindung eines Analyten mit Quellen oder Schrumpfen reagiert (Schema 1). Solche Sensorsysteme sind bestechend einfach



Schema 1. Durch Bindung des Analyten induzierte Volumenänderung eines dreidimensionalen photonischen Kristalls als Sensor, für das Beispiel eines inversen Opal-Hydrogels (IOH).

und ermöglichen a priori sogar eine Detektion mit dem Auge, sodass weder komplizierte Geräte noch speziell ausgebildetes Personal benötigt werden. Daher wurden hydrogelbasierte photonische Kristalle als Sensoren bereits für etliche niedermolekulare Analyte erprobt.^[1b–3]

Bisher gibt es jedoch kaum Systeme zur Detektion von großen Analyten wie Makromolekülen, Viren oder Bakterien.^[1b,d,e] Bei den wenigen Beispielen sind die maximalen Verschiebungen des Interferenzmaximums klein und erreichen kaum 20 nm.^[4]

Dies ist vermutlich auf eine nur begrenzte Veränderung der Hydrophilie des IOH durch die Bindung des Analyten zurückzuführen und auch auf die gehinderte Diffusion von Makromolekülen in einen photonischen Kristall, sodass sich der Gitterabstand nur wenig ändert. Dieser muss aber eine massive Änderung erfahren, um ein großes optisches Signal zu erzeugen. Wir hofften dieses Problem mit inversen Opalen aus doppelt responsiven IOHs lösen zu können, die einen Volumenphasenübergang aufweisen: Während die IOH-Struktur das Eindiffundieren des Analyten in das Sensorgel durch weite Kanäle begünstigt, sollte der analytinduzierte Phasenübergang das optische Signal verstärken.

Entsprechend entwickelten wir für die Erkennung von Makromolekülen neue IOH-Systeme, die auf Copolymeren der Oligo(ethylenglycol)-Monomere **1** und **2** basieren (Abbildung 1). Solche Copolymere sind für ihre Biokompatibili-

[*] Ing. J.-P. Couturier, Dr. M. Sütterlin, Prof. Dr. A. Laschewsky
Institut für Chemie, Universität Potsdam
Karl-Liebknecht-Straße 24–25, 14476 Potsdam-Golm (Deutschland)
E-Mail: laschews@uni-potsdam.de
Homepage: <http://www.chem.uni-potsdam.de/groups/apc/>

Dr. C. Hettrich
Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Institutsteil
Bioanalytik und Bioprozesse IZI-BB
Am Mühlenberg 13, 14476 Potsdam-Golm (Deutschland)

Dr. E. Wischerhoff
Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung IAP
Geiselbergstraße 69, 14476 Potsdam-Golm (Deutschland)
E-Mail: erik.wischerhoff@iap.fraunhofer.de
Homepage: <http://www.iap.fraunhofer.de/en.html>

[**] Wir danken für finanzielle Unterstützung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Initiative „Spitzenforschung & Innovation in den neuen Ländern“, Verbundprojekt „Das Taschentuchlabor – Impulszentrum für Integrierte Bioanalyse“, FKZ 03IS2201 B/C.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201500674> zu finden.

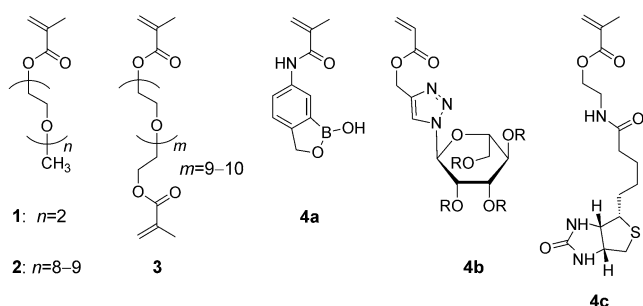


Abbildung 1. Monomere zur Herstellung der Hydrogelmatrix (**1** und **2**), für deren Vernetzung (**3**) und deren Funktionalisierung (**4a–4c**). Die Mannose-Einheit von **4b** wurde während der Polymerisation geschützt ($R = \text{Acetyl}$) und im endgültigen Copolymer bzw. den IOH-Systemen entschützt ($R = \text{H}$).

tät und ihre geringe Neigung zu Fouling bekannt,^[5] was für Bioassays unabdingbar ist. Wichtig ist weiterhin, dass solche Copolymere in Wasser einen Phasenübergang mit unterer kritischer Mischungstemperatur (lower critical solution temperature, LCST) aufweisen, der sich durch ihre Zusammensetzung genau einstellen lässt.^[5b,c,6] Zusätzlich können funktionelle Comonomere, die Erkennungseinheiten für die Bindung spezifischer Analyten tragen, einfach mit polymerisiert werden. Wenn die Bindung des Analyten die Gesamthydrophilie verändert, verschiebt sich die LCST solcher Systeme.^[7]

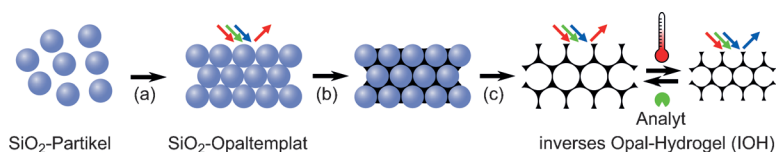
Eine solche doppelte Responsivität erlaubt es, einen Phasenübergang unter isothermen Bedingungen zu induzieren, wenn die Bindung des Analyten die Übergangstemperatur von unterhalb nach oberhalb der Messtemperatur verschiebt bzw. umgekehrt.^[7b] In einem geeignet gewählten Temperaturfenster sollte dies zu wesentlich stärkeren Volumeneffekten führen als ein einfaches Quellen oder Schrumpfen infolge der primären Änderung der Hydrophilie des Systems nach Bindung eines Analyten.

Für den Konzeptbeweis wählten wir gut etablierte Erkennungssysteme, wie die Bindung von vicinalen Diolgruppen in bestimmten Glycopolymeren durch Benzoboroxol,^[8] von Lektinen durch spezifische Zucker^[9] und von Avidin durch Biotin.^[7b,10] Entsprechend synthetisierten wir die Erkennungseinheiten tragenden Comonomere **4a–c**, die mit einem Boronsäurehalbester,^[8a] einem Derivat der Azidomannose oder einem Biotin-Rest^[11] funktionalisiert sind (Abbildung 1). Die funktionalisierten IOHs wurden in drei Schritten hergestellt. Zuerst wurden monodisperse SiO_2 -Nanopartikel mittels Stöber-Verfahren^[12] hergestellt und in einen Kolloidkristall überführt. Dann wurden dessen Lücken mit den jeweiligen Monomergemischen gefüllt und diese polymerisiert. Schließlich wurden die Nanopartikel des Templats entfernt. (Schema 2).

Chemische Struktur und Menge des Vernetzers im Sensor-IOH müssen exakt angepasst werden, um einerseits einen effektiven Kontakt bzw. Eindringen der makromolekularen Analyte mit bzw. in das Hydrogel zu ermöglichen, und um andererseits sicherzustellen, dass ein ausreichender

Unterschied zwischen den Brechungsindizes von Hydrogelmatrix und den mit Wasser gefüllten Kanälen und Poren besteht. Gute Ergebnisse wurden mit dem oligomeren Vernetzer **3** bei Anteilen von 19 Mol-% bezogen auf den gesamten Comonomergehalt erzielt (Tabelle 1). Um IOH-Filme mit ausreichender mechanischer Stabilität für die Handhabung zu erhalten, wurde der dünne, mit Monomer gefüllte Opalfilm mit einem vergleichsweise dicken Film der Comonomere von ungefähr 100 μm Dicke überschichtet. Nach Aushärten und Entfernen der Templatpartikel wurde so eine ungefähr 5 μm dünne IOH-Schicht erhalten, die auf dem entsprechenden, aber unstrukturierten Hydrogelfilm als Träger sitzt.

Zusätzlich zu den funktionalisierten inversen Opal-Serien IOH-a bis IOH-c wurden analoge IOHs ohne Erkennungseinheiten als Referenzen hergestellt (Serie IOH-d, Tabelle 1). Für vergleichende Modellstudien in wässriger Lösung syn-



Schema 2. Synthese von inversen Opal-Hydrogelen (IOHs): a) Monodisperse SiO_2 -Partikel (Durchmesser 420 nm) werden zu einem synthetischen Opal von ungefähr 5 μm Dicke angeordnet. b) Das Templat wird mit Monomergemisch gefüllt und anschließend zu einem gefüllten Hydrogel photopolymerisiert. c) Entfernen der Nanopartikel des Templats mit verdünnter HF führt zum doppelt responsiven IOH.

Tabelle 1: Zusammensetzung von ausgewählten responsiven Copolymeren und IOHs auf der Basis von **1** und **2** (festes Molverhältnis 85:15).

Probe	funktionelles Comonomer	Comonomergehalt [Mol-%]	Vernetzergehalt [Mol-%]	Trübungspunkt [$^{\circ}\text{C}$] ^[a]
5a	4a	15	0	27.0
IOH-a	4a	7	19	
5b*	4b	10	0	39.2 ^[b]
5b	4b	10	0	42.4 ^[c]
IOH-b	4b	14	19	
5c	4c	10	0	34.5
IOH-c	4c	13	19	
5d	–	–	0	30.9
IOH-d	–	–	19	

[a] Trübungspunkte wurden mittels Turbidimetrie in 0.3 Gew.-% PBS-Lösung (pH 7.4) bestimmt. [b] Vor Entschüttung. [c] Nach Entschüttung.

thetisierten wir ebenso die analogen löslichen Copolymere ohne Vernetzer (Proben **5a–d**, Tabelle 1).

Tabelle 1 listet die Trübungspunkte der löslichen Copolymeranaloge der IOHs in wässrigem Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung, PBS) auf. Das Basiscopolymer zeigt einen Phasenübergang bei 30.9 $^{\circ}\text{C}$. Die Funktionalisierung mit den Monomeren **4a–c** verändert die Gesamthydrophilie unweigerlich und verschiebt so den Trübungspunkt geringfügig. Wichtig ist, dass die Zugabe der entsprechenden Liganden (Auswahl in Abbildung 2) zu einer deutlichen Verschiebung der Trübungspunkte führte. So erhöhte die Zugabe von Fructose oder des von Xylose abgeleiteten Copolymers

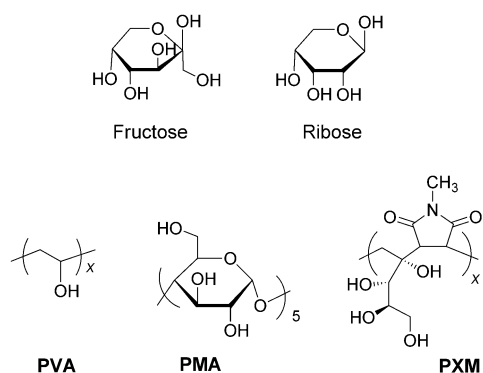


Abbildung 2. Auswahl von nieder- und hochmolekularen potenziellen Liganden, deren Bindung an das Boroxol enthaltende Copolymer **5a** und IOH-a getestet wurde (die Zucker sind in ihrer bevorzugten β -Pyranoseform dargestellt).

PXM (siehe unten) den Trübungspunkt einer 0.3 Gew.-% Lösung von Copolymer **5a** in PBS um 8.4°C bzw. 5.9°C , während die schwach oder nicht bindenden verwandten Moleküle Ribose, Maltopentaose (**PMA**) oder Poly(vinylalkohol) (**PVA**) lediglich marginale Verschiebungen ($<0.5^\circ\text{C}$) verursachten. Ähnlich erhöhte die Zugabe des Proteins Avidin den Trübungspunkt von **5c** um 6.7°C , während die Zugabe von anderen, nicht bindenden Proteinen wie Rinderserumalbumin den Trübungspunkt nicht beeinflusste. Diese Ergebnisse belegen das doppelte Ansprechen des funktionalisierten Copolymers, nämlich sowohl auf die Temperatur als auch auf molekulare Erkennungsprozesse.

Nach adäquater Vernetzung bleibt die Thermoresponsivität der Copolymersysteme im IOH erhalten. Dies führt zu einem starken Schrumpfen beim Erwärmen, und in Folge zu einer ausgeprägten Verschiebung der Lage der Bragg-Bande und der entsprechenden Farbe. Abbildung 3 zeigt dies beispielhaft für IOH-a. Für die Copolymere von **1** und **2** ist charakteristisch, dass sich der Schrumpfprozess der Hydrogele infolge des Phasenübergangs über einen breiten Temperaturbereich erstreckt. Dies kontrastiert mit den scharfen Trübungspunkten, die in Lösung beobachtet werden und den Beginn des Phasenübergangs der analogen löslichen Copolymere anzeigen.^[13]

Werden spezifische polymere Liganden zu den funktionellen IOHs gegeben, ändert sich die temperaturabhängige Verschiebung der Bragg-Bande deutlich (Abbildungen 4 und 5). Dieses Verhalten ist bemerkenswert selektiv. Während z.B. der stark bindende polymere Ligand **PXM** eine starke und empfindliche Verschiebung des Überganges von IOH-a induziert, das Boroxolgruppen als Erkennungseinheiten trägt,^[14] sind die Effekte der schwach bzw. nicht bindenden Polymere **PVA** und **PMA** auf den Übergang vernachlässigbar (Abbildung 4a). Bemerkenswert ist, dass Fructose die Lage des Übergangs von IOH-a kaum beeinflusst, obwohl dieser mäßig bindende niedermolekulare Ligand den Trübungspunkt des analogen löslichen Copolymers merklich verschiebt (siehe oben). Hingegen beeinflusst selbst die Zugabe des stark bindenden Polymers **PXM** nicht das als Referenz dienende IOH-d, das keine Erkennungseinheiten besitzt (Abbildung 4b). Diese Ergebnisse belegen allesamt eine er-

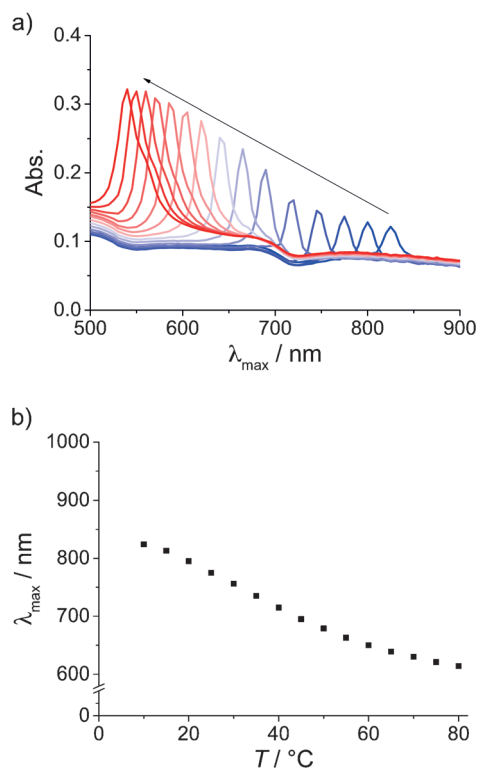


Abbildung 3. Von der Temperatur T abhängige optische Eigenschaften von IOH-a in PBS-Puffer: a) Absorptionsspektren, b) Wellenlänge des Maximums der Bragg-Bande (λ_{max}).

folgreiche und spezifische Erkennung von Makromolekülen durch die IOHs.

Wenn die IOHs innerhalb des Übergangsfensters bei einer konstanten Temperatur gehalten werden, lässt sich der durch den Phasenübergang verstärkte Detektionsprozess isotherm durchführen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass biologisch relevante wasserlösliche Polymere die Hydrophilie des Gesamtsystems in der Regel erhöhen und somit auch dessen Phasenübergangstemperatur. Die Quellung des Hydrogels aufgrund des verschobenen Phasenübergangs erfolgt viel schneller als ein induziertes Schrumpfen. Beispielsweise führt die Bindung des spezifischen Liganden **PXM** an IOH-a bei 37°C zu einer Verschiebung der Bragg-Bande von 130 nm. Im optimalen Temperaturbereich von 50 – 55°C werden mit diesem IOH-System sogar Verschiebungen von bis zu 200 nm erreicht. Solch große Effekte sind mit einem einfachen Photometer oder sogar mit dem bloßen Auge problemlos zu erkennen.

Die IOH-Systeme auf Basis der Comonomere **1–3** sind offenbar generell als Plattform zur Detektion von Makromolekülen geeignet. Wenn Comonomer **4a**, das eine Boroxol-Erkennungseinheit trägt, durch andere funktionelle Comonomere ersetzt wird, z.B. durch das mit Mannose funktionalisierte **4b** oder das Biotin tragende **4c**, lassen sich auch Proteine wie das Lektin Concanavalin A (ConA) oder Avidin spezifisch nachweisen (Abbildung 5a). In diesen Systemen induziert die Bindung ebenfalls eine große Verschiebung des Temperaturfensters für die Entquellung und entsprechend auch des Maximums der Bragg-Bande bei einer vorgegebe-

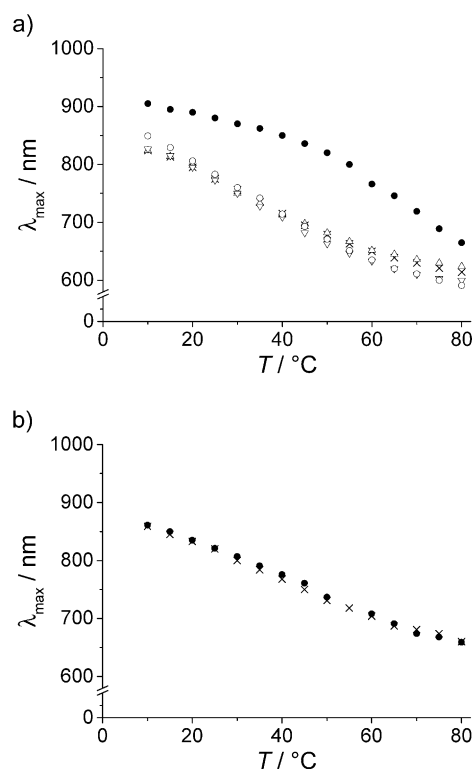


Abbildung 4. Von der Temperatur T abhängiges Quellen funktionalisierter IOHs in Gegenwart potenzieller Liganden, verfolgt anhand der Verschiebung des Maximums der Bragg-Bande (Wellenlänge des Absorptionsmaximums λ_{\max}). a) IOH-a: x = in PBS-Puffer, o = in Gegenwart von Fructose, Δ = in Gegenwart von PVA, ▽ = in Gegenwart von PMA, ● = in Gegenwart von PXM (IOH-spezifischer Analyt). b) Referenz IOH-d (ohne Erkennungseinheiten): x = in PBS-Puffer, ● = in Gegenwart von PXM (alle Analytkonzentrationen 50 mM Wiederholungseinheiten).

nen Temperatur, wie für die inversen Opale IOH-b und IOH-c gezeigt. Sogar bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich übersteigt die spektrale Verschiebung noch 20 nm (Abbildung 5b).

Maßgeschneiderte inverse Opale aus doppelt responsiven Hydrogelen erlauben es also, thermosensitives Verhalten und Empfindlichkeit für molekulare Erkennungsprozesse miteinander zu verbinden. Dies ermöglicht die Detektion makromolekularer Analyte mittels einfacher optischer Methoden, wobei entsprechend konstruierte Systeme die effiziente Diffusion auch großer Analyte in den photonischen Kristall erlauben. Durch Erkennung und Bindung des Analyten werden die Gitterabstände – und damit die Strukturfarbe – massiv verändert; das erzeugte optische Signal ist einfach zu detektieren. Solche Systeme stellen eine vielversprechende und vielseitige Plattform für die Entwicklung von einfachen, kostengünstigen Sensoren für Pathogene dar.

Stichwörter: Hydrogele · Photonische Kristalle · Polymere · Responsive Materialien · Sensoren

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6641–6644
Angew. Chem. **2015**, *127*, 6741–6745

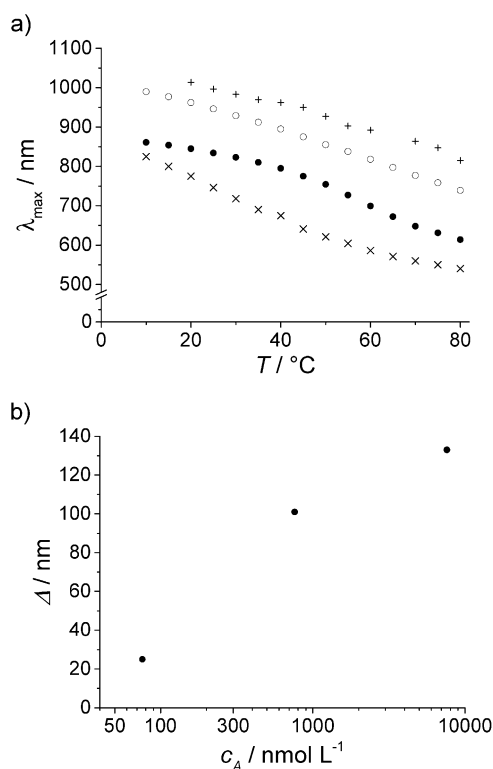


Abbildung 5. a) Von der Temperatur (T) abhängiges Quellen funktionalisierter IOHs in Gegenwart potenzieller Liganden, verfolgt anhand der Verschiebung des Maximums der Bragg-Bande (λ_{\max}): + = IOH-b in PBS-Puffer, o = IOH-b in Gegenwart von ConA, x = IOH-c in PBS-Puffer, ● = IOH-c in der Gegenwart von Avidin (Analytkonzentration 0.5 g L⁻¹). b) Verschiebung Δ des Maximums der optischen Bragg-Bande von Biotin-funktionalisiertem IOH-c mit steigender Konzentration von Avidin C_A bei 35 °C.

- [1] a) J. H. Holtz, S. A. Asher, *Nature* **2007**, *389*, 829–832; b) J. Ge, Y. Yin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1492–1522; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1530–1561; c) I. B. Burgess, M. Loncar, J. Aizenberg, *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 6075–6086; d) H. Wang, K.-Q. Zhang, *Sensors* **2013**, *13*, 4192–4213; e) C. Fenzl, T. Hirsch, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3318–3335; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3384–3402.
- [2] Y. Zhao, Z. Xie, H. Gu, C. Zhu, Z. Gu, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3297–3317.
- [3] a) A. Stein, B. E. Wilson, S. G. Rudisill, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 2763–2803; b) J. Cui, W. Zhu, N. Gao, J. Li, H. Yang, Y. Jiang, P. Seidel, B. J. Ravoo, G. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3844–3848; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3923–3927.
- [4] a) Y. Zhao, X. Zhao, J. Hu, M. Xu, W. Zhao, L. Sun, C. Zhu, H. Xu, Z. Gu, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 569–572; b) Y. Zhao, X. Zhao, B. Tang, W. Xu, J. Li, J. Hu, Z. Gu, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 976–982; c) T. J. Park, S.-K. Lee, S. M. Yoo, S.-M. Yang, S. Y. Lee, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11*, 632–637.
- [5] a) E. Wischerhoff, N. Badi, A. Laschewsky, J.-F. Lutz, *Adv. Polym. Sci.* **2011**, *240*, 1–33; b) J.-F. Lutz, *J. Polym. Sci. Part A* **2008**, *46*, 3459–3470; c) G. Vancoillie, D. Frank, R. Hoogenboom, *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 1074–1095.
- [6] a) H. Kitano, T. Hirabayashi, M. Gemmei-Ide, M. Kyogoku, *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, *205*, 1651–1659; b) Ö. Akdemir, N. Badi, S. Pfeifer, Z. Zarafshani, A. Laschewsky, E. Wischerhoff, J.-F. Lutz, *ACS Symp. Ser.* **2009**, *1023*, 189–202.

- [7] a) H. Ritter, O. Sadowski, E. Tepper, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3171–3173; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3279–3281; b) J. Buller, A. Laschewsky, J.-F. Lutz, E. Wischerhoff, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1486–1489; c) S. Inal, J. D. Kölsch, F. Sellrie, J. A. Schenk, E. Wischerhoff, A. Laschewsky, D. Neher, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 6373–6381; d) L. Sambe, V. R. de La Rosa, K. Belal, F. Stoffelbach, J. Lyskawa, F. Delattre, M. Bria, G. Cooke, R. Hoogenboom, P. Woisel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5044–5048; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 5144–5148.
- [8] a) S. Schumacher, F. Grüneberger, M. Katterle, C. Hettrich, D. G. Hall, F. W. Scheller, N. Gajovic-Eichelmann, *Polymer* **2011**, *52*, 2485–2491; b) Y. Zhang, Y. Guan, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8106–8121; c) A. Matsumoto, K. Kataoka, Y. Miyahara, *Polym. J.* **2014**, *46*, 483–491.
- [9] a) I. J. Goldstein, C. E. Hayes, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1978**, *35*, 127–340; b) H. Kitano, H. Suzuki, K. Matsuura, K. Ohno, *Langmuir* **2010**, *26*, 6767–6774; c) S. R. S. Ting, G. Chen, M. H. Stenzel, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1392–1412.
- [10] a) M. Wilchek, E. A. Bayer, O. Livnah, *Immunol. Lett.* **2006**, *103*, 27–32; b) E. Heydari, J. Buller, E. Wischerhoff, A. Laschewsky, S. Döring, J. Stumpe, *Adv. Opt. Mater.* **2014**, *2*, 137–141.
- [11] Y. Liu, M. C. Young, O. Moshe, Q. Cheng, R. J. Hooley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7748–7751; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7868–7871.
- [12] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69.
- [13] a) X. Laloyaux, B. Mathy, B. Nysten, A. M. Jonas, *Langmuir* **2010**, *26*, 838–847; b) J. Buller, A. Laschewsky, E. Wischerhoff, *Soft Matter* **2013**, *9*, 929–937.
- [14] G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *58*, 5291–5300.

Eingegangen am 23. Januar 2015

Online veröffentlicht am 16. April 2015