

Rozprawa doktorska

Synteza i analiza nowych molekularnych układów
makrocyclicznych i klatkowych zawierających
odwracalne wiązania disulfidowe

Synthesis and analysis of new molecular macrocyclic and cage-like systems
containing reversible disulfide bonds

Marcin Konopka

Promotor prof. dr hab. Artur R. Stefankiewicz

Praca została wykonana w Laboratorium Nanostruktur Funkcjonalnych
Wydział Chemii/Centrum Zaawansowanych Technologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu



Poznań 2022

Panu Profesorowi dr. hab. Arturowi R. Stefankiewiczowi składam serdeczne podziękowania za opiekę naukową, zaangażowanie w prowadzone przeze mnie badania, merytoryczne wskazówki oraz za pomoc w trakcie całych moich studiów doktoranckich.

Calemu Zespołowi Laboratorium Nanostruktur Funkcjonalnych dziękuję za pięć lat wspólnej współpracy, za codzienne rozmowy, naukowe dyskusje i wspaniałą atmosferę pracy.

*I would like to thank **prof. Jack M. Harrowfield** from the **Université de Strasbourg** for the professional and fruitful collaboration.*

*I would like to thank **dr. Sébastien Ulrich** from the Institut des Biomolécules Max Mousseron for inviting me to his team in Montpellier and for his commitment to my research.*

*I would like to thank **the team of the Glycochemistry and Molecular Recognition** for the warm welcome in Montpellier and for the friendly work atmosphere during my internship.*

*Szczególne podziękowania składam moim **Najbliższym, Babci, Rodzicom**, a zwłaszcza mojej narzeczonej **Marii**.*

SPIS TREŚCI

1	STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU POLSKIM.....	7
2	STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU ANGIELSKIM	9
3	ANKIETA DOROBKU NAUKOWEGO	11
4	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	14
5	WPROWADZENIE	16
5.1	Dynamiczna chemia kombinatoryczna	16
5.2	Układy multidynamiczne	19
5.3	Wiązanie disulfidowe.....	19
5.4	Dynamiczna wymiana disulfidowa.....	21
5.5	Przegląd literaturowy dynamicznych układów disulfidowych	23
6	CEL PRACY I UZASADNIENIE TEMATYKI BADAWCZEJ	32
7	CZĘŚĆ BADAWCZA – OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ	34
7.1	Strukturalne samosortowanie pseudopeptydowych, dimerycznych klatek disulfidowych w wodzie: badania mechanistyczne i wykrywanie kationów [D1].....	34
7.2	Regulowanie rozpuszczalności fluorescencyjnych klatek aromatycznych przy użyciu bloków budulcowych funkcjonalizowanych aminokwasami [D2]	42
7.3	Wydajna synteza mikrofalowa zróżnicowanych strukturalnie diimidów modyfikowanych α -aminokwasami [D3]	47
7.4	Rozszerzanie różnorodności strukturalnej w dynamicznej bibliotece disulfidowych makrocykli poprzez hydrolizę imidów <i>in situ</i> [D4]	51
8	PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	58
9	CYTOWANA LITERATURA.....	60
10	OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW.....	63
11	PRZEDRUK PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE.....	69

1 STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU POLSKIM

Celem tej pracy była synteza i analiza nowych molekularnych makrocykli i klatek opartych na odwracalnym wiązaniu disulfidowym.

Synteza funkcjonalnych architektur molekularnych stanowi intrygujące wyzwanie badawcze ze względu na liczne zastosowania takich struktur jako receptory chemiczne, kontenery do transportu czy rozpoznania molekularnego lub dostarczanie leków. Pomimo postępu w badaniu takich układów, wciąż znanych jest niewiele przykładów stabilnych, a jednocześnie dynamicznych i rozpuszczalnych w wodzie struktur tego typu. Dynamiczna chemia kombinatoryczna (DCC) jest skuteczną metodą generowania złożonych architektur kowalencyjnych, które są zazwyczaj niezwykle trudne do uzyskania w drodze klasycznej syntezy. Disulfidy to jedne z najbardziej uniwersalnych rodzajów odwracalnych wiązań kowalencyjnych, które można stosować w DCC; dynamiczne, symetryczne, stabilne i inspirowane układami biologicznymi.

Pierwsza część pracy została poświęcona syntezie i analizie pięciu dimerycznych klatek molekularnych rozpuszczalnych w wodzie. Trzy strukturalnie różne, tritiolowe bloki budulcowe o symetrii C_3 i wzrastającym rozmiarze centralnej platformy aromatycznej dopasowują się do siebie tak, że spośród licznych możliwych produktów kombinatorycznych, w warunkach dynamicznych, powstają wyłącznie dimeryczne produkty klatkowe. Biblioteki kombinatoryczne zawierające pary komponentów wykazują częściowe samosortowanie strukturalne produktów. Przedstawiono pełny opis syntezy i analizę spektroskopową każdej wyizolowanej klatki. Zaprezentowano także oryginalne badania kinetyczne, które śledzą proces formowania się każdej z klatek w czasie oraz dają wgląd w mechanizm tych reakcji poprzez identyfikację produktów pośrednich. Dodatkowo przedstawiono potencjał aplikacyjny otrzymanych struktur jako fluorescencyjne sensory wybranych lantanowców w wodzie.

W drugiej części opisano metodę modyfikowania rozpuszczalności złożonych multidynamicznych klatek molekularnych. Opracowana ścieżka syntezy umożliwia łatwą i wydajną modyfikację bloków budulcowych o dodatkowy łańcuch boczny. W ten sposób wprowadzono nową funkcjonalność do struktury całej klatki. W efekcie otrzymano i scharakteryzowano dwie nowe wieloskładnikowe klatki molekularne o zróżnicowanej polarności i właściwościach fluorescencyjnych. Zastosowana metoda modulowania rozpuszczalności pozwoliła na otrzymanie i analizę tego rodzaju architektur w dwóch skrajnie różnych środowiskach tj. wodzie i chloroformie.

W ostatniej części pokazano zupełnie nowe podejście do stymulowania biblioteki dynamicznych makrocykli disulfidowych poprzez wykorzystanie hydrolizy imidów *in situ*. Zastosowanie syntezy wspomaganej mikrofalami doprowadziło do otrzymania interesującego aromatycznego ditiolowego bloku budulcowego zawierającego grupy imidowe. Hydroliza tych grup w łagodnych warunkach zasadowych uwolniła nieoczekiwaną labilność konformacyjną komponentu, która zaowocowała różnorodną strukturalnie biblioteką disulfidowych produktów makrocyklicznych. Na tej podstawie opracowano metodę kontroli tego zjawiska poprzez dobór odpowiedniego pH i przez dodatek DMSO. Zastosowanie opracowanej metodologii doprowadziło do rozszerzenia różnorodności strukturalnej produktów z prostych dimerów do tri- i tetramerycznych makrocykli.

2 STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU ANGIELSKIM

The aim of this thesis was the synthesis and analysis of the new molecular macrocycles and cage-like systems based on reversible disulfide bonds.

The synthesis of functional architectures continues to pose an intriguing challenge due to the numerous applications of such structures as chemical receptors, hosts for molecular transport and recognition as well as drug delivery. Despite enormous progress in the development of this type of systems, examples of stable, yet dynamic and water-soluble structures are still very scarce. Dynamic combinatorial chemistry (DCC) is an effective approach to generate complex covalent assemblies which are extremely difficult to obtain via the traditional synthetic procedures. Disulfides are one of the most universal type of covalent reversible bonds for DCC as they are dynamic, symmetric, stable and bio-inspired.

The first part of this work deals with the synthesis and analysis of five different water-soluble dimeric molecular cages. The three different trithiol building blocks of C_3 symmetry and increasing size react with each other under dynamic conditions which results in exclusive dimeric cage-like products (among possible combinatorial structures). Combinatorial libraries containing pairs of components show a partial structural self-sorting between generated products. A full description of the synthesis and spectroscopic analysis of each isolated cage is provided. This part also discusses some original kinetic studies that investigate the formation process of each particular cage over time and provide insights into the mechanism of these processes by the identification of intermediate products. Additionally, the application potential of the obtained structures is presented as fluorescent sensors of selected lanthanides in water.

The second part presents the method of solubility tuning in multi-dynamic molecular cages. The designed synthesis pathway allows one of the building blocks to be easily and efficiently modified with an additional side chain. In consequence, this new functionality was introduced to the structure of the entire cage. That way, two new multi-component molecular cages with various polarity and fluorescent properties were obtained. The application of this solubility-tuning method resulted in the synthesis and analysis of those cages in two extremely different environments i.e. water and chloroform.

The last part presents an unorthodox approach to stimulating a dynamic library of disulfide macrocycles by using *in situ* imide hydrolysis. The use of microwave-assisted synthesis has resulted in an interesting, aromatic dithiol building block containing imide

groups. The hydrolysis of those imide groups under mild basic conditions caused unexpected conformational flexibility of this component that led to a significant increase in the library structural complexity. That served as a basis for the development of the original method of controlling this phenomenon by selecting an appropriate pH and the addition of DMSO. The application of this new method resulted in the expansion of the structural diversity in dynamic products from simple dimers to numerous tri- and tetrameric macrocycles.

3 ANKIETA DOROBKU NAUKOWEGO

LISTA PUBLIKACJI

Publikacje naukowe wchodzące w skład rozprawy:

[D1] Konopka M., Cecot P., Harrowfield J.M., Stefankiewicz A.R., *Structural self-sorting of pseudopeptide homo and heterodimeric disulfide cages in water: mechanistic insights and cation sensing*, *Journal of Materials Chemistry C*, **2021**, 9, 7607-7614.

IF = 7,393, MNiSW = 140.

[D2] Konopka M., Cecot P., Ulrich S., Stefankiewicz A.R., *Tuning the Solubility of Self-Assembled Fluorescent Aromatic Cages Using Functionalized Amino Acid Building Blocks*, *Frontiers in Chemistry*, **2019**, 7, (503).

IF = 5,221, MNiSW = 100.

[D3] Konopka M., Markiewicz G., Stefankiewicz A.R., *Highly efficient one-step microwave-assisted synthesis of structurally diverse bis-substituted α -amino acid derived diimides*, *RSC Advances*, **2018**, 8, 29840-29846.

IF = 3,361, MNiSW = 100.

[D4] Konopka M., Stefankiewicz A.R., *Expanding structural diversity in a library of disulfide macrocycles through in-situ imide hydrolysis*, *Scientific Reports*, **2022**, 12, 38.

IF = 4,379, MNiSW = 140.

IF – współczynnik *Impact Factor* według listy Journal Citation Reports (JCR) za rok 2021.
MNiSW – punkty przyznane według listy załączonej do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 grudnia 2021 r.

Analiza bibliometryczna

Sumaryczny i średni współczynnik IF (JCR) publikacji wchodzących w skład rozprawy: **20,354** i **5,089**.

Sumaryczne punkty MNiSW publikacji wchodzących w skład rozprawy: **480**.

Całkowita liczba cytowań (Scopus, na dzień 25.01.2022): **10** (7 bez autocytowań).

Indeks Hirscha (Scopus, na dzień 25.01.2022): **2**.

STAŻE NAUKOWE

Staż naukowy w ramach programu INNChem:
Università degli Studi di Roma "La Sapienza"
Rzym, Włochy.
Opiekun naukowy: prof. Antonella Dalla Cort.
Okres stażu: 01.09.2021 - 28.02.2022 (6 miesięcy).



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Staż naukowy w ramach programu Erasmus+:
Institut des Biomolécules Max Mousseron, ENSCM
Montpellier, Francja.
Opiekun naukowy: dr Sébastien Ulrich.
Okres stażu: 05.03 - 27.07.2018 (5 miesięcy).



IBMM
Institut des
Biomolécules
Max Mousseron

UDZIAŁ W KONFERENCJACH NAUKOWYCH

Międzynarodowych:

- *14th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry*, 2-6.06.2019 Lecce, Włochy,
- *Supr@Lyon Supramolecular Chemistry & Work*, 12-14.12.2018 Lyon, Francja.

Krajowych:

- *V Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii*, 11-12.05.2017 Łódź.
- *III Ogólnopolskie Seminarium Naukowe „Zielone Idee 21. Wieku”*, 30.03.2017 Poznań.

NAGRODY I WYRÓŻNIENIA

- Laureat Stypendium Rektora UAM dla najlepszych doktorantów w roku 2020.
- Laureat Stypendium Rektora UAM dla najlepszych doktorantów w roku 2019.
- Laureat Stypendium programu „*INNChem – rozwój kompetencji doktorantów kluczowych w pracy o charakterze badawczo-rozwojowym*” w latach 2018-2021.
- Wyróżnienie za najlepszą prezentację ustną wygłoszoną podczas V Łódzkiego Sympozjum Doktorantów Chemii w roku 2017.

UDZIAŁ W PROJEKTACH BADAWCZYCH

- **WYKONAWCA:** IUVENTUS PLUS/0446/IP3/2015/73: *Synteza i właściwości kompleksujące nowych dynamicznych nanokapsuł disulfidowych.*
- **WYKONAWCA:** LIDER/024/391/L-5/13/NCBR/2014: *Synteza, właściwości fizykochemiczne i zastosowanie dynamicznych szkieletów metaliczno-organicznych.*
- **WYKONAWCA:** SONATA-BIS/UMO-2018/30/E/ST5/00032: *Samoasocjujące kapsuły porowate jako multifunkcjonalne nanomateriały.*

4 WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Skróty chemiczne

CH₂Cl₂ – dichlorometan

CHCl₃/CDCl₃ – chloroform/chloroform deuterowany

DABCO – 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan

DCC – *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid

DMAP – 4-dimetyloaminopirydyna

DMF – *N,N'*-dimetyloformamid

DMSO/DMSO-d₆ – dimetylosulfotlenek/deuterowany dimetylosulfotlenek

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

EDC·HCl – chlorowodorek *N*-etylo-*N'*-(3-dimetyloaminopropylo)karbodiimidu

Et₃N – trietyloamina

H₂O/D₂O – woda/woda deuterowana

HMPT – heksametylofosforotriamid

HOBt – hydroksybenzotriazol

MeCN – acetonitryl

MeOH/CD₃OD – metanol/metanol deuterowany

NHS – *N*-hydroksyimid kwasu bursztynowego

p.p.m. – części na milion (ang. *parts per million*)

TFA – kwas trifluorooctowy

THF – tetrahydrofuran

TIPS – triizopropylosilan

TPE – 1,1,2,2-tetrafenyloetylen

Skróty pojęć

AIE – emisja fluorescencji wywołana agregacją (ang. *aggregation induced emission*)

DCC – dynamiczna chemia kombinatoryczna (ang. *dynamic combinatorial chemistry*)

DCL – dynamiczna biblioteka kombinatoryczna (ang. *dynamic combinatorial library*)

RPA – względna powierzchnia piku (ang. *relative peak area*)

Techniki analityczne

^1H NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego protonów (ang. *proton Nuclear Magnetic Resonance*)

^{13}C NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego węgla ^{13}C (ang. *carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance*)

1D i 2D NMR – jednowymiarowa i dwuwymiarowa spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *one-dimensional, two-dimensional*)

COSY – spektroskopia korelacyjna (ang. *correlation spectroscopy*)

DOSY – spektroskopia dyfuzyjna (ang. *diffusion-ordered spectroscopy*)

EDS – spektroskopia z dyspersją energii (ang. *energy dispersive spectroscopy*)

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high-performance liquid chromatography*)

ICP-MS – spektrometria mas sprzężona z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ang. *inductively coupled plasma – mass spectrometry*)

LC-MS – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. *liquid chromatography – mass spectrometry*)

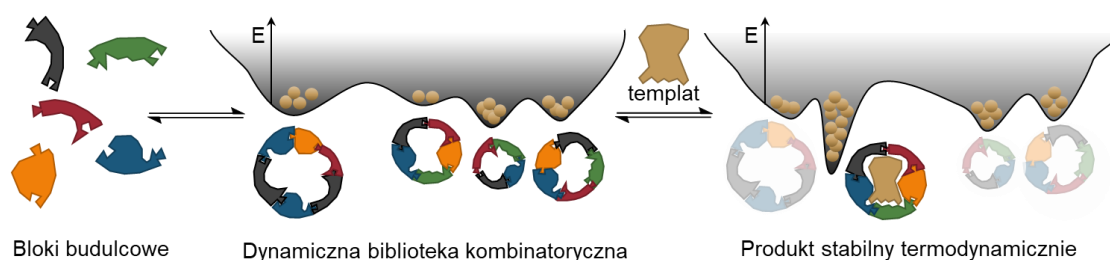
SEM – skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *scanning electron microscope*)

UV-Vis – spektroskopia absorpcyjna w świetle ultrafioletowym i widzialnym

5 WPROWADZENIE

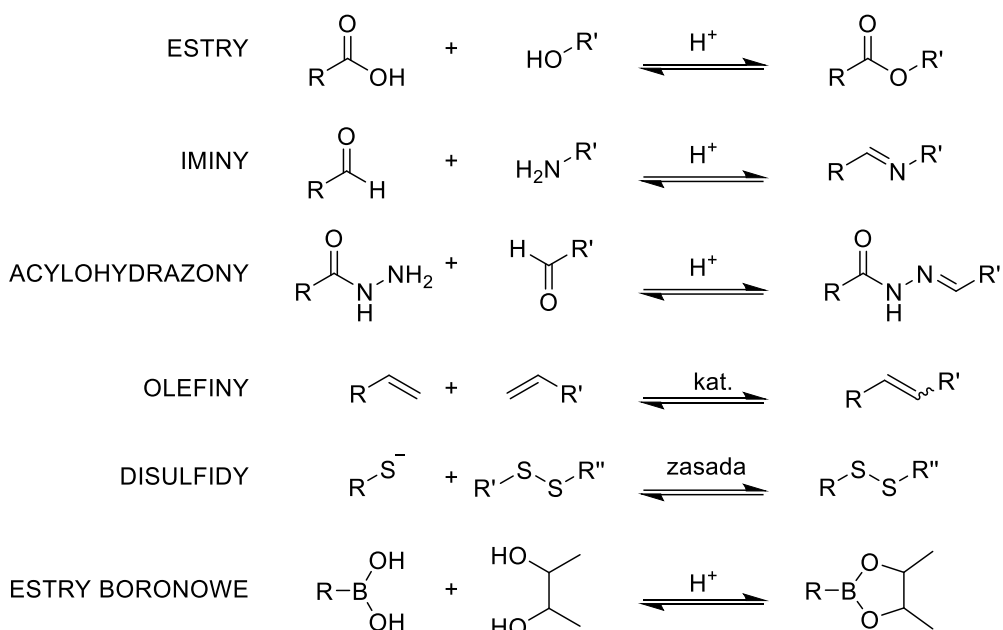
5.1 Dynamiczna chemia kombinatoryczna

Dynamiczna chemia kombinatoryczna – (ang. *dynamic combinatorial chemistry*, DCC) – to podejście metodologiczne i eksperymentalne, służące do syntezy skomplikowanych struktur supramolekularnych i molekularnych, które zazwyczaj trudno otrzymać na drodze klasycznej syntezy organicznej. DCC trudno jednoznacznie umiejscowić i zdefiniować ponieważ jest to wielowymiarowe podejście, które łączy w sobie cechy klasycznej chemii molekularnej jak i chemii supramolekularnej¹. W chemii tej wykorzystuje się małe cząsteczki chemiczne zwane blokami budulcowymi (lub komponentami), które posiadają w swej strukturze odpowiednie grupy funkcyjne zdolne do tworzenia odwracalnych wiązań kowalencyjnych z innymi cząsteczkami w odpowiednich warunkach. Bloki budulcowe reagują ze sobą i tworzą mieszaninę produktów w stanie równowagi (pod kontrolą termodynamiczną), zwaną dynamiczną biblioteką kombinatoryczną (ang. *dynamic combinatorial library*, DCL, Rys. 1).



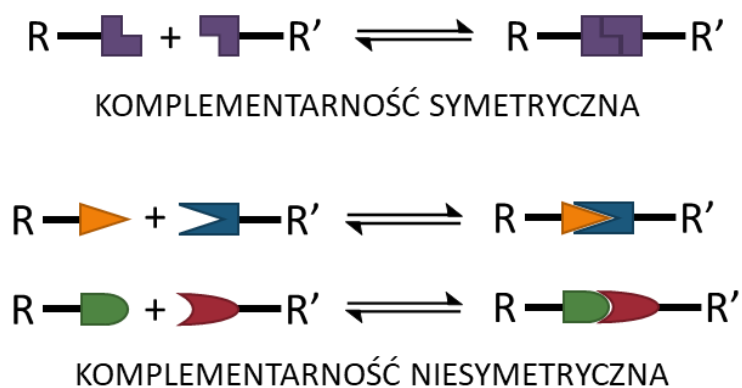
Rys. 1. Schematyczne przedstawienie idei dynamicznej chemii kombinatorycznej

DCC może wykorzystywać zarówno odwracalne wiązania kowalencyjne (m.in. iminy, hydrazony, olefiny, disulfidy, Rys. 2), jak i oddziaływania niekowalencyjne, a więc supramolekularne. W przypadku zastosowania w DCC wiązań kowalencyjnych mówimy o dynamicznej chemii kowalencyjnej (ang. *dynamic covalent chemistry*). Jak powiedział noblista, a zarazem jeden z odkrywców tej dziedziny chemii, prof. Jean-Marie Lehn, chemia supramolekularna to „chemia poza cząsteczką” (ang. *“chemistry beyond molecule”*). Zgodnie z tą definicją kowalencyjna DCC w pełni wpisuje się w chemię supramolekularną, ponieważ wykorzystuje oddziaływania międzycząsteczkowe². Jednakże zgodnie z aktualną definicją chemia supramolekularna dotyczy wykorzystania wyłącznie wiązań niekowalencyjnych².



Rys. 2. Wybrane odwracalne wiązania kowalencyjne najczęściej wykorzystywane w DCC

Bloki budulcowe łączą się ze sobą według zasady komplementarności (Rys. 3). Oznacza to, że zachodzi pomiędzy nimi zasada tzw. klucza-zamka, która wymusza określone rodzaje połączeń, jednocześnie uniemożliwiając inne. Większość z wymienionych połączeń kowalencyjnych w DCC powstaje w sposób niesymetryczny w reakcji dwóch różnych grup funkcyjnych, np. imina powstaje z aldehydu i aminy. Jednym z połączeń komplementarnie symetrycznych są disulfidy, ponieważ to połączenie korzysta z dwóch grup tiolowych (-SH). Takie rozróżnienie niesie ze sobą istotne konsekwencje. W przypadku wiązań komplementarnie niesymetrycznych na jednym bloku budulcowym mogą znajdować się dwie takie same grupy funkcyjne np. aldehydowe.



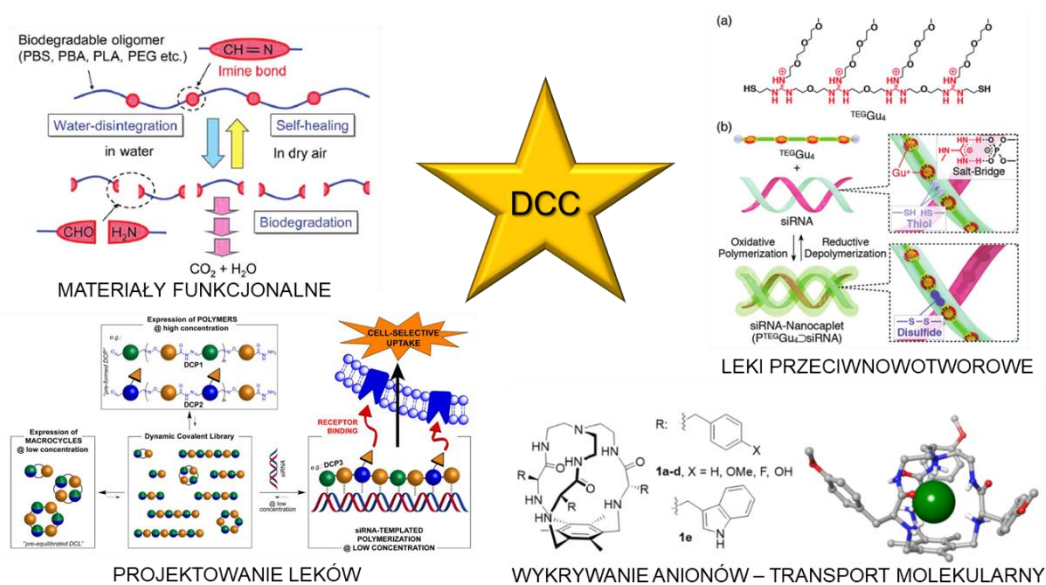
Rys. 3. Schematyczne przedstawienie idei komplementarności symetrycznej i niesymetrycznej

Przy projektowaniu komponentów tiolowych (komplementarnie symetrycznych) istotne jest takie zaplanowanie struktury bloku budulcowego, tak aby dwie grupy tiolowe znajdujące się w tej samej cząsteczce nie mogły ze sobą reagować wewnątrzcząsteczkowo poprzez dopasowanie konformacyjne.

Jedną z istotnych cech DCC jest podatność na zewnętrzną lub wewnętrzną stymulację poprzez bodźce fizykochemiczne, które wpływają na różnorodność i dystrybucję produktów w tworzącej się DCL. Tę podatność na bodźce DCC zawdzięcza swoim właściwościom dynamicznym, gdzie produkty i substraty stale ze sobą reagują aż do osiągnięcia przez układ równowagi termodynamicznej.

Dodatkowa stymulacja układu może odbywać się poprzez bodźce fizyczne, takie jak temperatura, ciśnienie³, ekspozycja na promieniowanie UV⁴, sonikację ultradźwiękami⁵ itd. Na sposób chemiczny DCL można stymulować poprzez zmianę stężenia (stechiometrii) danego bloku budulcowego, poprzez dodanie templaty (wzorca, ang. *template*), który poprzez oddziaływania niekowalencyjne z wybranym produktem zwiększy jego stężenie w DCL⁶⁻⁸ poprzez zmianę pH⁹, poprzez strukturę bloku budulcowego^{10, 11} lub poprzez inne oddziaływania niekowalencyjne¹².

DCC pozwala w stosunkowo łatwy sposób wygenerować bogate biblioteki złożonych strukturalnie produktów, więc od lat cieszy się zainteresowaniem ze względu na liczne potencjalne, jak i już odkryte zastosowania w dziedzinach takich jak chemiczne receptory^{13, 14}, transport molekularny¹⁵⁻¹⁷, projektowanie leków¹⁸⁻²¹, materiały funkcjonalne^{22, 23} czy terapie przeciwnowotworowe (Rys. 4)²⁴.

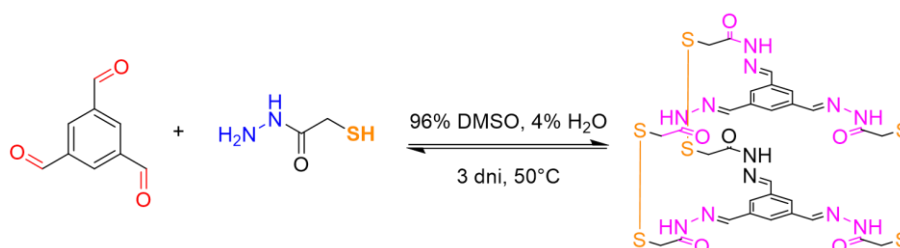


Rys. 4. Wybrane przykłady zastosowań DCC

5.2 Układy multidynamiczne

Układy multidynamiczne (ang. *multidynamic*) powstają wtedy, gdy w jednym procesie DCC wykorzystywany jest więcej niż jeden rodzaj wiązania odwracalnego. Zastosowanie różnych grup funkcyjnych sprawia, że bloki budulcowe mogą łączyć się ze sobą na więcej sposobów niż w przypadku zastosowania tylko jednego rodzaju połączenia dynamicznego. Celem takiego działania jest otrzymanie bardziej zróżnicowanej DCL lub bardziej złożonego strukturalnie produktu.

Jednoczesne reakcje pomiędzy różnymi grupami funkcyjnymi w układzie multidynamicznym mogą powodować wzajemne interakcje działające na korzyść lub niekorzyść całego procesu. W celu usystematyzowania kompatybilności dostępnych reakcji odwracalnych w DCC w 2001 r. wprowadzono pojęcie ortogonalności wiązań²⁵. Ortogonalność definiowana jest jako istnienie takich warunków, które pozwalają na dynamiczną wymianę jednego wiązania odwracalnego bez wpływu na inne w tym samym układzie. Przykładem ortogonalnej pary wiązań są disulfidy i acylohydrazony, gdzie wymiana disulfidowa przebiega najlepiej w warunkach zasadowych, zaś formowanie się acylohydrazonów wymaga środowiska kwasowego^{26, 27}.

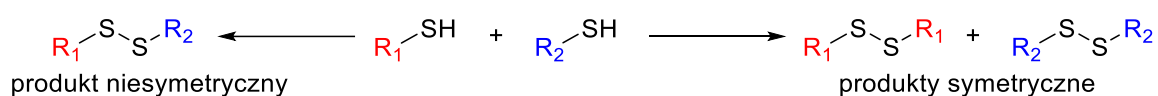


Rys. 5. Przykład zastosowania układu podwójnie dynamicznego do otrzymania wieloskładnikowej klatki molekularnej²⁷

5.3 Wiązanie disulfidowe

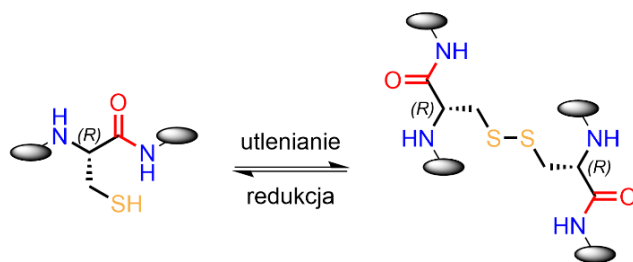
Wiązanie disulfidowe to w chemii organicznej jedno z podstawowych połączeń siarki o wzorze ogólnym $R_1-S-S-R_2$, w którym dwa organiczne atomy siarki są ze sobą połączone pojedynczym wiązaniem kowalencyjnym. Jest to stosunkowo silne wiązanie o średniej energii ok. $250 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$, słabsze jednak niż wiązanie C-C (ok. $340 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$), czy C-S (ok. $260 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$)²⁸. Kąt torsyjny pomiędzy atomami siarki w disulfidach zawiera się zazwyczaj w przedziale ok. 90° - 100° . Jest to istotna konsekwencja geometryczna, która musi być wzięta pod uwagę przy projektowaniu tiolowych bloków budulcowych.

Disulfidy otrzymuje się zazwyczaj z odpowiednich tioli (merkaptanów) w warunkach utleniających, uzyskując produkt symetryczny lub krzyżowy (niesymetryczny, Rys. 6)²⁹⁻³¹. Utlenianie może zachodzić zgodnie z mechanizmem dwuelektronowym – jonowo lub jednoelektronowym – rodnikowo. Większość metod syntetycznych skoncentrowana jest na otrzymywaniu disulfidów symetrycznych poprzez utlenienie odpowiedniego tiolu. Otrzymywanie disulfidów krzyżowych jest trudniejsze ze względu na utratę symetrii w takim produkcie³²⁻³⁴. Dalsze utlenianie disulfidów prowadzi do otrzymania sulfotlenków i sulfonów (kwasów sulfonowych). W warunkach redukujących disulfidy ulegają redukcji do sulfidów (tioeterów) lub z powrotem do tioli.



Rys. 6. W zależności od warunków reakcji utlenianie tioli do disulfidów prowadzi do otrzymania produktów symetrycznych lub niesymetrycznych

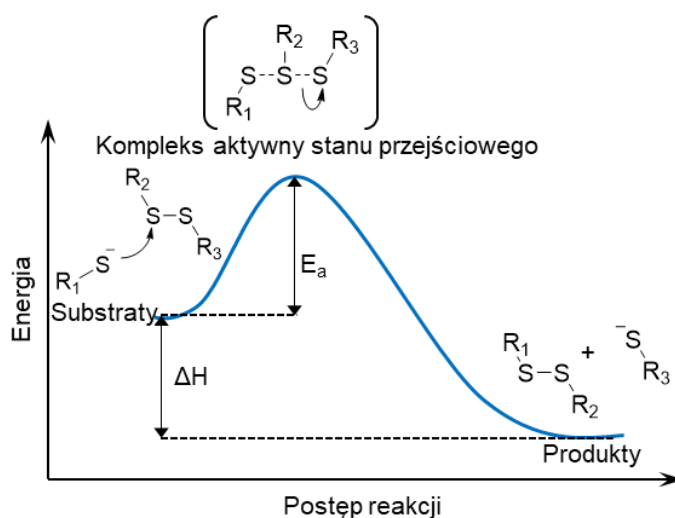
Disulfidy są intensywnie badane ze względu na swoje ogromne znaczenie w układach biologicznych. Poprzez tworzenie wiązań pomiędzy resztami *L*-cysteiny (mostki disiarczkowe) disulfidy odpowiadają za II i III-rzędową strukturę białek (Rys. 7)³⁵. Dynamiczny charakter tego wiązania pozwala na reorganizację układu mostków na drodze dynamicznej wymiany disulfidowej, co prowadzi do zmian konformacyjnych całego białka i w efekcie do zmiany jego właściwości³⁶. Drugim fundamentalnym zadaniem disulfidów w organizmach żywych jest utrzymywanie i regulowanie fizjologicznego potencjału redoks. Najpopularniejszym związkiem zawierającym siarkę w każdym organizmie jest glutation (GSH), tripeptyd zawierający resztę cysteinową o właściwościach redukujących. Glutation w formie zredukowanej (GSSG) zawierającej wiązanie disulfidowe obniża stres oksydacyjny poprzez redukowanie wolnych rodników i regenerowanie grup tiolowych cysteiny w białkach, które uległy uszkodzeniu^{37, 38}.



Rys. 7. Schemat reakcji powstawania wiązań disulfidowych z reszt cysteinowych w białkach

5.4 Dynamiczna wymiana disulfidowa

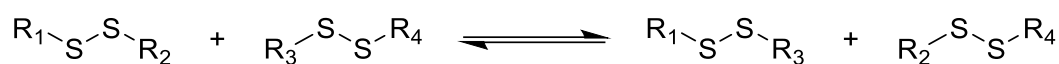
Dynamiczna wymiana disulfidowa to reakcja pomiędzy disulfidem $R_1-S-S-R_2$, a jonem tiolanowym R_3-S^- , w której powstaje nowy disulfid $R_1-S-S-R_3$ (Rys. 8). Reakcja ta przebiega zgodnie z mechanizmem substytucji typu S_N2 . Na skutek nukleofilowego ataku tiolanu na wiązanie disulfidowe powstaje liniowy produkt przejściowy zawierający trzy atomy siarki, który następnie ulega rozkładowi na produkt (Rys. 8). Jon tiolanowy powstaje poprzez dysocjację wiązania S-H w łagodnych warunkach zasadowych³⁹.



Rys. 8. Schemat reakcji dynamicznej wymiany disulfidowej i diagram energetyczny zmiany energii potencjalnej układu od czasu

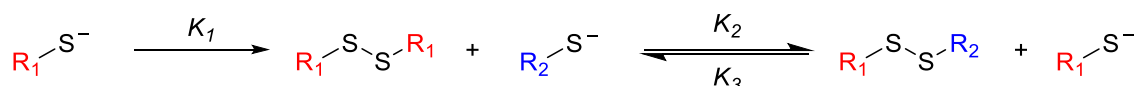
Dowodzono, że pH środowiska ma istotny wpływ na szybkość reakcji wymiany disulfidowej. Siarka jako miękka zasada bogata w elektrony jest silniejszym nukleofilem w stanie zdeprotonowanym $R-S^-$ niż w stanie protonowanym $R-SH$. Ponieważ szybkość wymiany jest zależna od stężenia jonu tiolanowego w roztworze, które jest zależne od dysocjacji wiązania S-H, to cały proces jest zależny od pH roztworu i pK_a tiolu. Jeżeli $pH < pK_a$, to szybkość wymiany disulfidowej jest mała ze względu na wysokie stężenie formy $R-SH$. Jeśli $pH > pK_a$, to reakcja wymiany jest szybka przez wyższe stężenie jonów $R-S^-$. Jednakże przy zbyt wysokim pH nukleofilowość tiolanu istotnie maleje i następują reakcje konkurencyjne ze strony jonów OH^- ³⁹. Z tego powodu przyjęto empiryczną regułę, że dla optymalnej szybkości wymiany disulfidowej, pH roztworu powinno być zbliżone do pK_a reagującego tiolu (zazwyczaj $pH 7,0-8,0$)³⁹.

Szczególnym rodzajem wymiany disulfidowej jest metateza disulfidowa¹. Jest to reakcja podobna do metatezy olefin. Biorą w niej udział dwa różnie podstawione wiązania disulfidowe, które w wyniku reakcji przegrupowują się wg atomów siarki (Rys. 9).



Rys. 9. Schemat reakcji metatezy disulfidowej

Planując eksperymenty DCC należy uwzględnić także zjawisko tzw. pułapki kinetycznej. Pułapka kinetyczna to sytuacja, w której jeden z dwóch konkurencyjnych procesów równowagowych jest znacząco szybszy niż drugi. Prowadzi to do wysycenia układu w produkt kinetyczny, co skutkuje zatrzymaniem wymiany dynamicznej⁴⁰. Otrzymywanie disulfidów z tioli jest nieodwracalną reakcją utleniania. Natomiast wymiana disulfidowa jest procesem dynamicznym i odwracalnym, który zachodzi pomiędzy obecnym już w układzie disulfidem a jonem tiolanowym. Tak więc w disulfidowych układach dynamicznych zachodzi nieustanna konkurencja pomiędzy nieodwracalnym utlenianiem a odwracalną wymianą disulfidową (Rys. 10).

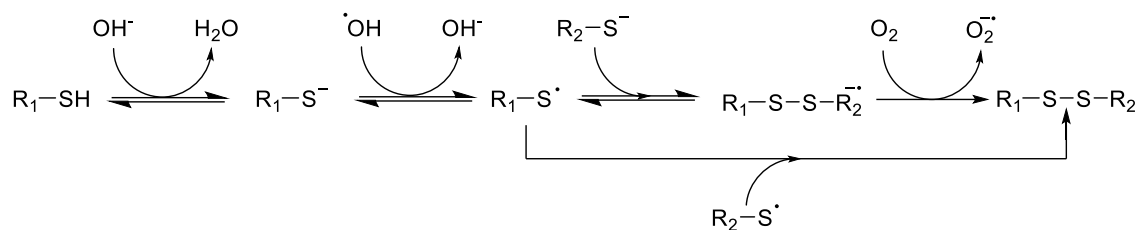


Rys. 10. Schemat reakcji ilustrujący konkurencję pomiędzy utlenianiem K_1 a dynamiczną wymianą disulfidową K_2 i K_3

Jeżeli szybkość reakcji utleniania K_1 jest wysoka, to z układu szybko znika źródło tiolanów, które są niezbędne dla odwracalnych reakcji K_2 i K_3 . Dlatego też dynamiczna wymiana disulfidowa jest możliwa, dopóki w układzie są obecne jony tiolanowe. Jeżeli układ reakcyjny jest stale wystawiony na obecność utleniacza, to zawsze dojdzie do zatrzymania wymiany dynamicznej. Ponowna reakcja wymiany może być zainicjowana poprzez dodanie czynnika redukującego lub niewielkiej ilości dodatkowego tiolu.

Najczęściej stosowaną techniką unikania pułapki kinetycznej w disulfidowej DCC jest dostosowanie szybkości utleniania tioli do szybkości dynamicznej wymiany disulfidowej. Popularną metodą powolnego utleniania jest prowadzenie reakcji w wodzie w warunkach zasadowych (pH ok. 8), gdzie czynnikiem utleniającym jest rozpuszczony w wodzie elementarny tlen (O_2). Wciąż nie udało się przedstawić wyczerpującego mechanizmu tej reakcji na poziomie atomowym, chociaż znane są pośrednie obserwacje wskazujące na to, że w reakcji tej następuje utlenianie jednoelektronowe powodowane

reaktywnym rodnikiem hydroksylowym $\cdot\text{OH}$, który powstaje w wyniku reakcji O_2 z anionem hydroksylowym OH^- (Rys. 11)^{38, 41}.

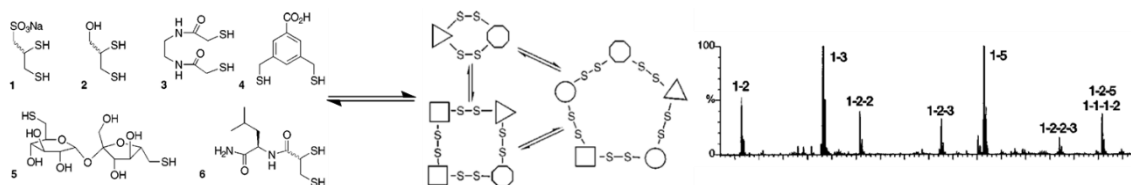


Rys. 11. Schemat postulowanego mechanizmu utleniania tioli do disulfidów według mechanizmu jednoelektronowego

Pionierem disulfidowej DCC opartej o utlenianie rozpuszczalnych w wodzie komponentów tiolowych elementarnym tlenem jest prof. Jeremy K.M. Sanders z Uniwersytetu w Cambridge. W jego metodologii jako źródło grup tiolowych w blokach budulcowych najczęściej stosuje się cysteinę. Ten naturalny aminokwas białkowy zapewnia szereg pożądanych właściwości. Silnie polarna grupa karboksylowa umożliwia dysocjację i rozpuszczalność komponentu w wodzie. Grupa aminowa to uniwersalna grupa funkcyjna pozwalająca na przyłączenie cząsteczki cysteiny do reszty bloku budulcowego. Trwała konfiguracja absolutna (*R*)-*L*-cysteiny zapewnia homochiralność całego komponentu. Powstałe biblioteki kombinatoryczne analizuje się metodą LC-MS. Jest to tandemowa technika jakościowo-ilościowa polegająca na rozdziale polarnych produktów DCL przez HPLC, które są następnie kierowane na spektrometr mas, co pozwala przyporządkować rozdzielonym produktom ich masy cząsteczkowe.

5.5 Przegląd literaturowy dynamicznych układów disulfidowych

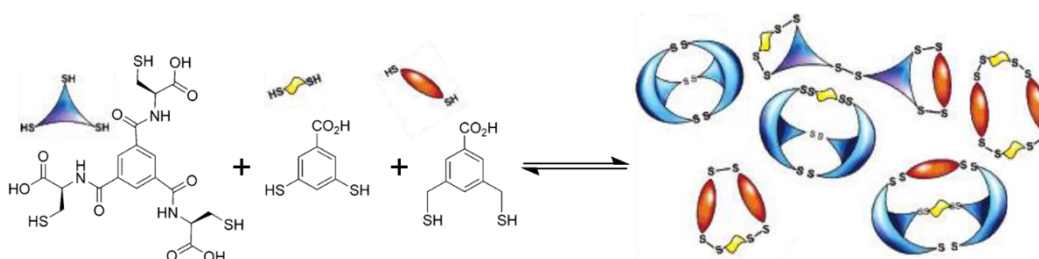
Zainteresowanie chemią kombinatoryczną opartą o wiązania disulfidowe zostało zapoczątkowane dopiero przez wymienioną wyżej grupę prof. J.K.M. Sandersa. Jak podają autorzy pionierskiej pracy, aż do 2000 roku nie opisano w całości żadnego przypadku DCL opartej na disulfidach⁴². W pracy tej poddano procedurze DCC proste ditiole, takie jak 2,3-dimerkaptopropanol, czy kwas 3,5(bis-merkaptometylo)-benzoesowy w wodzie w warunkach zasadowych (Rys. 12). Do dzisiaj zbadane i opisane zostały liczne układy oparte o disulfidowe DCC⁴³.



Rys. 12. Pierwsza disulfidowa biblioteka kombinatoryczna, struktury komponentów, schematyczna reprezentacja produktów w DCL i analiza masowa⁴²

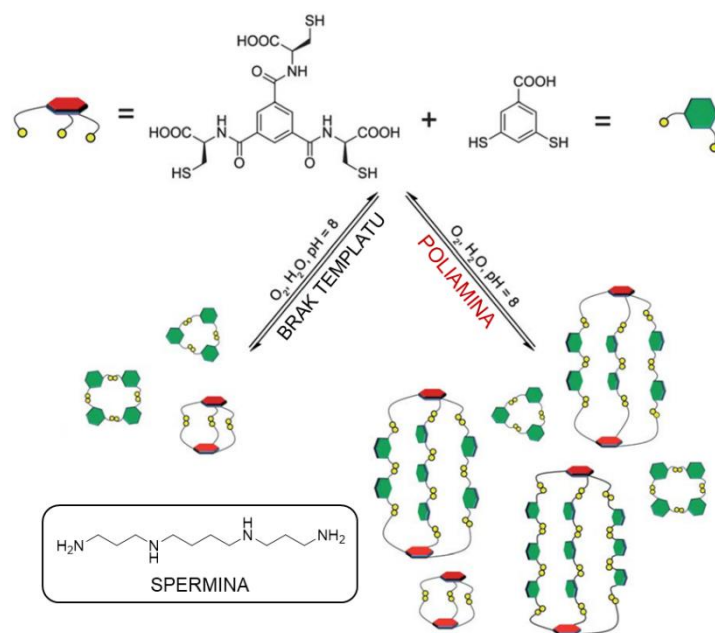
Jednym z obszarów, w jakim DCC wzbudza zainteresowanie, jest jej wykorzystanie w chemii układów gość-gospodarz, w taki sposób aby odpowiednio dobrany związek wzorcowy (ang. *templat*) powodował amplifikację jednego z produktów DCL poprzez utworzenie z nim (przez oddziaływania niekowalencyjne) bardziej stabilnego termodynamicznie produktu^{44, 45}.

Znaczącą innowacją strukturalną było wprowadzenie przez Westa w 2005 tritiolowego komponentu opartego o 1,3,5-trikarboksybenzen do mieszaniny aromatycznych ditioli⁴⁶. Nowość ta zaowocowała pojawieniem się niespotykanych do tej pory architektur klatkowych i pseudo-klatkowych zawierających w swojej strukturze komponent tritiolowy (Rys. 13).



Rys. 13. Zastosowanie trifunkcyjnego bloku budulcowego pozwala na otrzymanie struktur klatkowych i pseudo-klatkowych⁴⁶

W toku dalszych badań dowiedziono, że grupy karboksylowe obecne w blokach budulcowych mogą być wykorzystane jako receptor anionowy oddziałujący z odpowiednimi templatami kationowymi (oddziaływania kation-anion). Wykazano, że dodatek liniowych poliamin, takich jak kadaweryna, spermina czy spermidyna, prowadzi do zróżnicowania produktów makrocyklicznych⁴⁷ lub do wygenerowania nowych struktur klatkowych w wieloskładnikowych DCL (Rys. 14)⁴⁸.



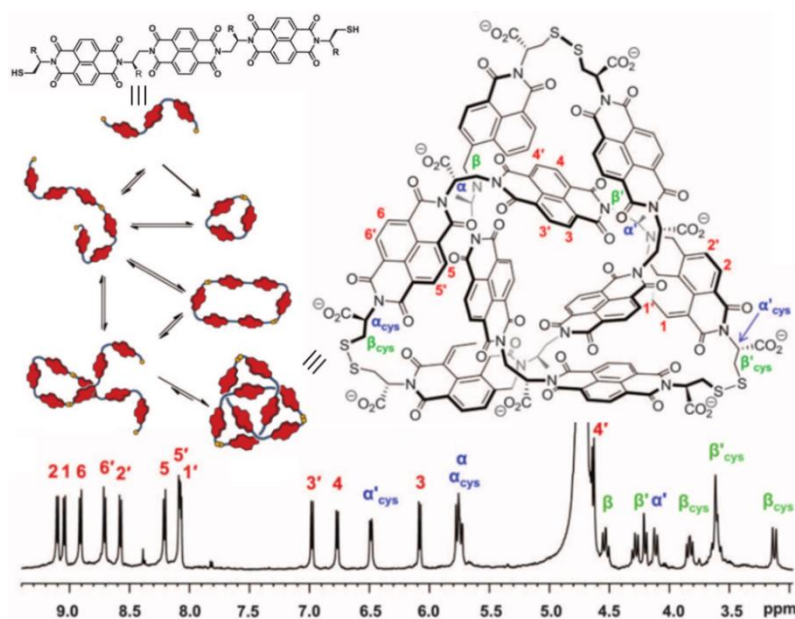
Rys. 14. Zastosowanie poliaminowego templatu (np. sperminy) całkowicie zmienia skład jakościowy i struktury produktów w DCL⁴⁸

Charakter oddziaływania kation-anion można odwrócić poprzez zastosowanie kationowego bloku budulcowego oddziałującego z anionami. W jednej z prac pokazano metodę stymulacji DCL poprzez dobór anionu wielokarboksylowego kwasu o odpowiednim rozmiarze w celu amplifikacji stężenia n-krotnych makrocykli disulfidowych powstałych z ditiolowych komponentów zawierających pirydynę jako receptor anionów⁴⁹.

Spośród oddziaływań niekowalencyjnych wykorzystywanych w DCC szczególnie ważny jest efekt hydrofobowy. Jest to zjawisko polegające na tym, że substancje niepolarne mają tendencję do agregacji w środowisku wodnym z jednoczesnym wypchnięciem wody pomiędzy agregującymi cząstkami⁵⁰. W kontakcie z substancją hydrofobową cząsteczki wody układają się w taki sposób, aby nie utracić korzyści energetycznej wynikającej z istniejących wiązań wodorowych. W efekcie prowadzi to do minimalizacji kontaktu powierzchniowego cząsteczek niepolarnych z cząsteczkami wody^{51, 52}. Tiolowe bloki budulcowe są często związkami organicznymi o licznych fragmentach aromatycznych, co wiąże się z ich znaczną hydrofobowością⁵³. Zaobserwowano, że DCL wygenerowane z silnie hydrofobowych bloków budulcowych kurczą się w wodzie poprzez zmiany konformacyjne w taki sposób, aby zminimalizować powierzchnię kontaktu z wodą i skompensować niekorzystny efekt hydrofobowy. Wykazano także, że podczas zbliżania się do siebie dwóch powierzchni hydrofobowych cząsteczki wody są pomiędzy nich

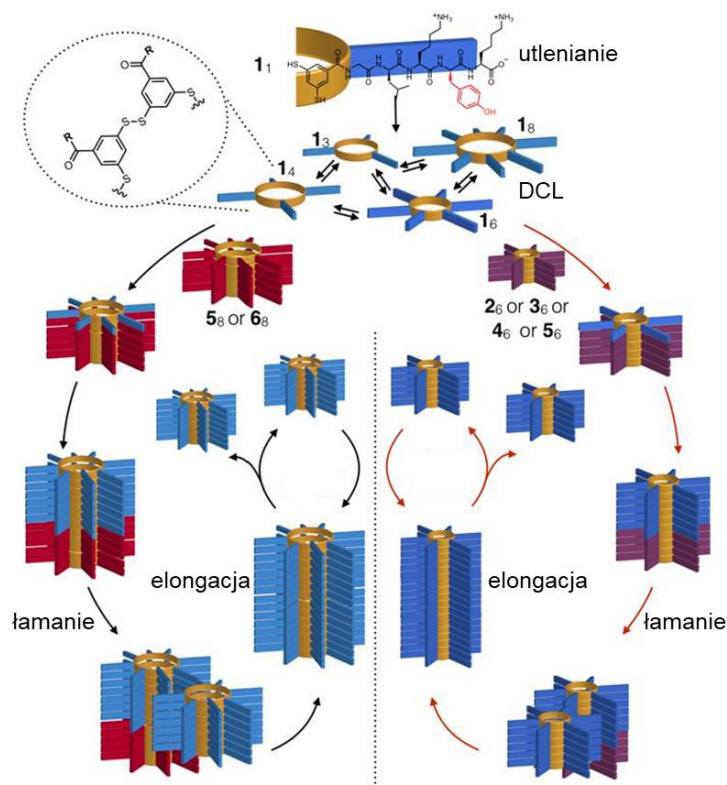
wypychane z niewielkim dodatnim efektem entropowym, który zasila agregację takich cząsteczek^{54, 55}.

Niezwykle bogatą rodzinę stanowią biblioteki disulfidowe oparte o difunkcyjne pochodne naftalenodiimidów (NDI). Naftalenodiimidy stanowią jeden z najważniejszych motywów molekularnych w chemii supramolekularnej. Dzięki swojej trwałej, płaskiej strukturze i właściwościach elektronowych są zdolne do interakcji z innymi cząsteczkami poprzez oddziaływania π - π stackingowe, kation- π , wiązania wodorowe itd⁵⁶. Wykazano, że dibezwodnik kwasu naftalenotetrakarboksylowego (NDA) można w łatwy sposób modyfikować aminokwasami białkowymi, w syntezie mikrofalowej otrzymując odpowiednie mono- lub diimidy z zachowaniem konfiguracji absolutnej układu^{57, 58}. Połączenie hydrofobowych właściwości NDI z polarnymi resztami cysteiny i łącznikami aminowymi doprowadziło do syntezy licznych, złożonych struktur na drodze DCC takich jak katenany⁵⁹⁻⁶², węzły molekularne (Rys. 15)⁶³⁻⁶⁵ czy nanorurki⁶⁶.



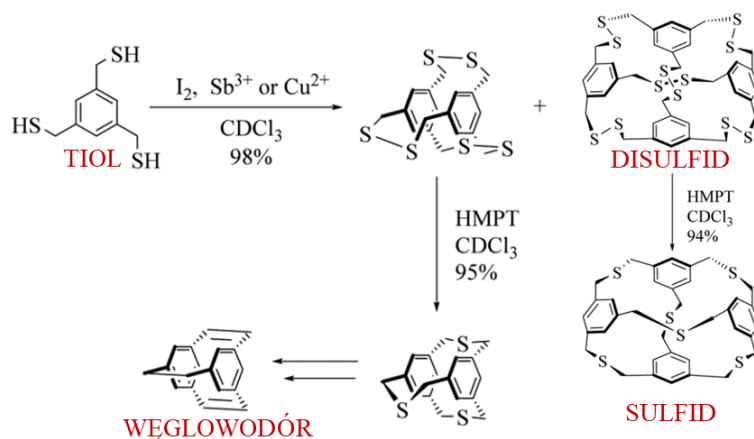
Rys. 15. Skomplikowany węzeł molekularny otrzymany z difunkcyjnego bloku budulcowego. Schemat DCL, struktura produktu i widmo ^1H NMR⁶³

Grupa prof. Sijbrena Otto rozwinęła zastosowanie dynamicznych disulfidów w chemii molekularnych replikatorów^{67, 68}. Difunkcyjne bloki budulcowe oparte o pochodne kwasu 3,5-dimerkaptobenzoesowego łączą się w heksameryczne makrocykle, które następnie poprzez oddziaływania niekowalencyjne układają się w drabinkowe stopy. Układy te zachowują się jak molekularne replikatory, które dziedziczą informację o rozmiarze danego stosu i promują powstawanie kolejnych (Rys. 16)⁶⁹⁻⁷³.



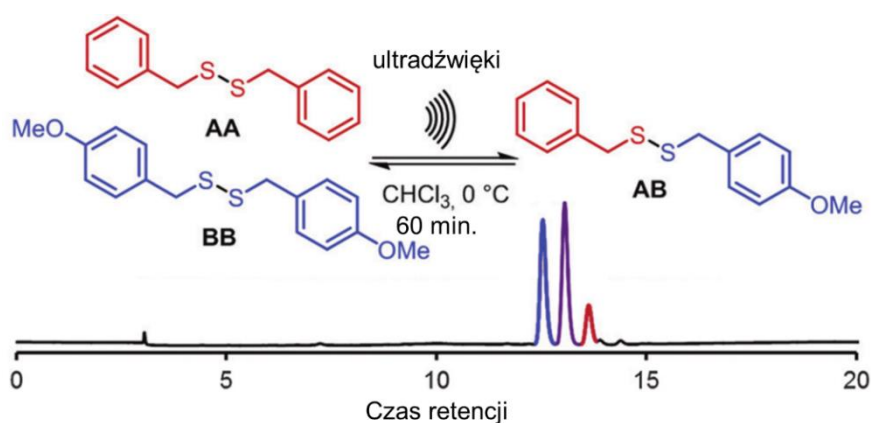
Rys. 16. Zastosowanie DCC w chemii replikatorów molekularnych⁷³

Grupa prof. Darrena Johnsona opracowała metodologię DCC w środowiskach niewodnych, takich jak chloroform, THF czy metanol, opartą na prostych tiofenolach lub tiolowych pochodnych ksylenów⁷⁴. Wykazała, że wybrane chlorki półmetali (AsCl_3 , SbCl_3) są efektywnymi katalizatorami utleniania tioli do disulfidów elementarnym jodem poprzez utworzenie przejściowych, *S*-koordynacyjnych związków kompleksowych⁷⁵. Metodę tę zastosowano do wygenerowania złożonej biblioteki disulfidowych makrocykli, które zostały następnie zredukowane do odpowiednich sulfidów (tioeterów) w reakcji z HMPT (Rys. 17)⁷⁶. Autorzy sugerują, że istnieje możliwość dalszej modyfikacji tak otrzymanych sulfidów do czystych węglodorów poprzez całkowite usunięcie siarki ze struktury produktu. Stanowiłoby to narzędzie do otrzymywania nieznanych do tej pory wielowymiarowych szkieletów węglodorowych.



Rys. 17. Disulfidowa DCC w chloroformie. Schemat reakcji i struktura produktów⁷⁶

Stosunkowo słabo poznanym aspektem jest korzystanie z metatezy disulfidowej w DCC. Przyczynia się do tego większy stopień skomplikowania eksperymentalnego i wymóg ostrzejszych warunków prowadzenia reakcji, np. poprzez katalizę fosfinami⁷⁷. Z powodzeniem zastosowano także mechanochemiczne podejście do metatezy disulfidów, którego wynikiem były disulfidowe produkty krzyżowe otrzymane w procesie syntezy w ciele stałym przy wykorzystaniu młynów kulowych^{78, 79}. Znane jest także doniesienie o tym, że metatezę disulfidową można przeprowadzić mechanochemicznie poprzez sonikację ultradźwiękami roztworu symetrycznych disulfidów aromatycznych (Rys. 18)⁵.



Rys. 18. Efektywna wymiana disulfidowa wywołana sonikacją ultradźwiękami⁵

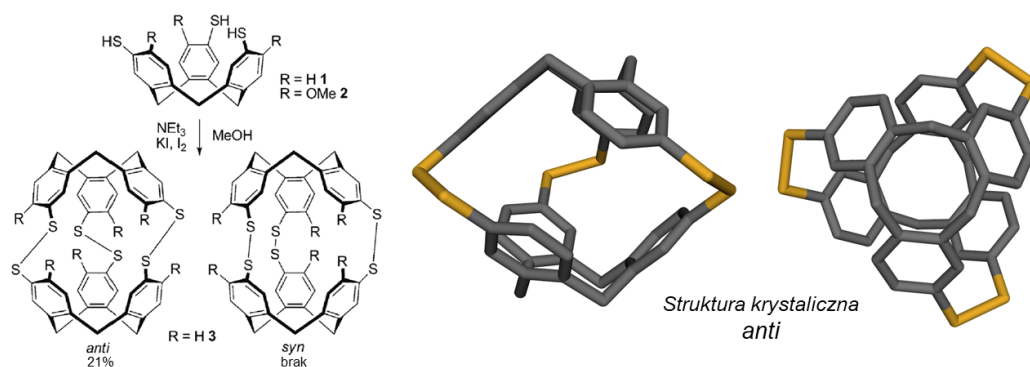
Istotnym zagadnieniem jest zastosowanie DCC w nowoczesnej chemii materiałowej do otrzymywania inteligentnych materiałów funkcjonalnych. Projektowanie i synteza takich materiałów wymaga wykorzystania wszystkich dostępnych w DCC

narzędzi. Przykładem takiego podejścia jest synteza fotorezponywnego hydrożelu (Rys. 19)⁸⁰. Wykazano, że ditiolowe bloki budulcowe oparte o diazobenzen tworzą biblioteki disulfidowych produktów makrocyklicznych, a dodatek soli magnezu powoduje żelowanie roztworu. Jony Mg^{2+} tworzą liczne wiązania koordynacyjne z dostępnymi resztami $-COO^-$, wiążąc ze sobą w sieć hydrofobowe cząsteczki makrocykli. Proces żelowania odbywa się z samosortowaniem składników DCL. Wyłącznie produkty zbudowane z bardziej hydrofobowego komponentu wchodzą w usieciowaną strukturę hydrożelu.



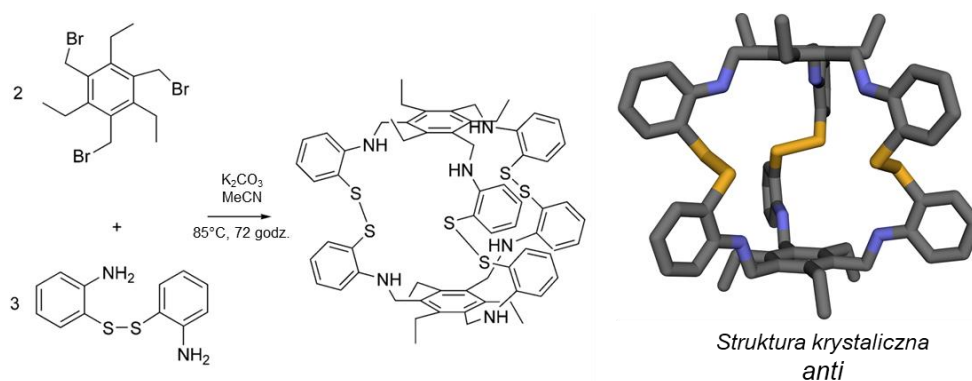
Rys. 19. Synteza fotorezponywnego hydrożelu na drodze disulfidowej DCC. Struktura komponentów, schemat produktów DCL i schemat struktury hydrożelu⁸⁰

Do dzisiaj przedstawiono nieliczne przykłady dobrze zdefiniowanych struktur klatkowych lub pseudo klatkowych opartych na disulfidach^{81, 82}. Istotną przeszkodą w otrzymywaniu trójwymiarowych i symetrycznych struktur disulfidowych są czynniki geometryczne wynikające z kątów torsyjnych wiązania disulfidowego⁸³. Kąt ten zawiera się w przedziale 90° - 100° co powoduje, że grupy R_1 i R_2 znajdujące się za atomami siarki są obrócone względem siebie o ok 90° . Konsekwencją takiego ułożenia jest to, że w strukturach klatkowych wiązania disulfidowe muszą ustawić się w przestrzeni pomiędzy dwoma reagującymi komponentami lub na zewnątrz ich ogólnej struktury, co prowadzi do utraty symetrii układu. Wykazano, że utlenianie jodem tritiolowego kaliksarenu katalizowane jodkiem potasu prowadzi do otrzymania struktury klatkowej⁸³. Zaobserwowano wyłącznie produkt o konfiguracji *anti*, czyli taki, którego struktura pozwala na ułożenie się wiązań S-S w przestrzeni zgodnie z preferowanym kątem (Rys. 20). Zastosowanie zmodyfikowanego komponentu o większym zatłoczeniu sterycznym, które wymusza konfigurację *syn*, spowodowało, że w układzie nie powstała żadna struktura klatkowa.



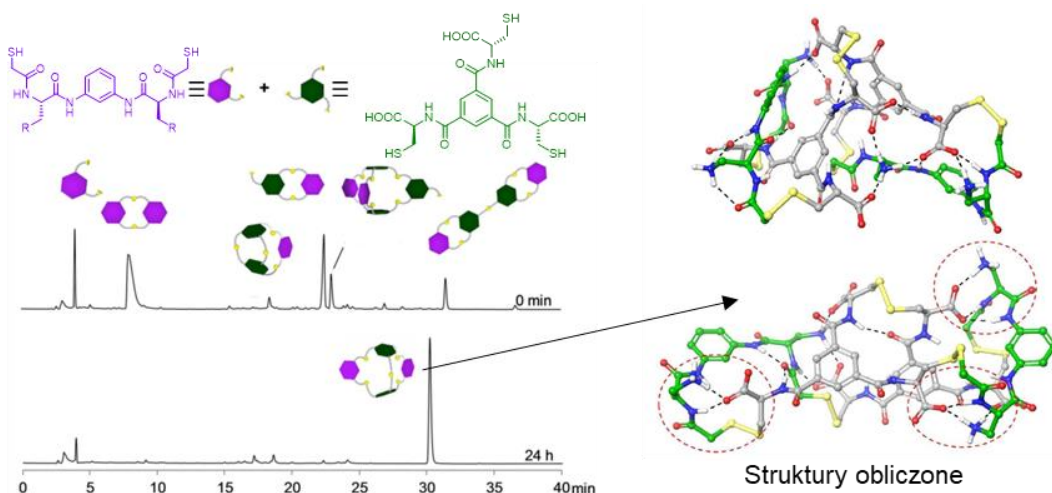
Rys. 20. Otrzymywanie trisdysulfidowego klatratu. Schemat reakcji, struktura substratu i struktury krystaliczne klatki (rzut z boku i z góry)⁸³

Analogiczna sytuacja została zaobserwowana w układzie klatkowym opartym o aromatyczną pochodną 1,3,5-tris(aminometylo)benzenu⁸⁴. W tym przypadku klatka powstała w wyniku reakcji bromku benzyloвого z już utlenioną o-merkaptoaniliną. Analiza krystalograficzna wykazała charakterystyczne ułożenie trzech wiązań disulfidowych (kąt $96,7^\circ$) w przestrzeni pomiędzy dwiema platformami (Rys. 21).



Rys. 21. Schemat reakcji syntezy klatki disulfidowej i struktura krystaliczna pojedynczej cząsteczki⁸⁴

Z powodu tych ograniczeń geometrycznych stosunkowo trudno jest otrzymać symetryczne wieloskładnikowe klatki disulfidowe o bardziej skomplikowanej strukturze. Niemniej w wyniku reakcji mieszaniny di- i tritiolowego komponentu otrzymano z dużą wydajnością (90%) pseudo-klatkowy produkt zbudowany z dwóch cząsteczek tritiolu i dwóch cząsteczek ditiolu (Rys. 22)^{85, 86}. Modelowanie molekularne wykazało, że produkt ten ma bardzo skomplikowaną strukturę o niskiej symetrii. Autorzy postulują, że za stabilność termodynamiczną tego produktu odpowiadają liczne wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe.



Rys. 22. Synteza disulfidowej struktury pseudo-klatkowej poprzez wieloskładnikową DCL. Struktury komponentów, chromatogramy HPLC i obliczone modele wybranej struktury⁸⁶

Opisane czynniki geometryczne i strukturalne powodują, że takie związki są niezwykle trudne do krystalizacji. Nieliczne przedstawione dotąd struktury krystaliczne dotyczą wyłącznie wysoce symetrycznych i niepolarnych układów pozbawionych dodatkowych grup funkcyjnych. Natomiast powszechną praktyką jest stosowanie modelowania molekularnego do częściowego zwizualizowania otrzymywanych produktów dynamicznych. Modele takie nie zastępują analizy krystalograficznej, są jednak wystarczająco dobrym kompromisem pozwalającym na analizę podstawowych właściwości strukturalnych cząsteczek (kształt, rozmiar, objętość).

6 CEL PRACY I UZASADNIENIE TEMATYKI BADAWCZEJ

Jak przedstawiono we wstępie, dynamiczne i kowalencyjne architektury molekularne oparte o wiązania disulfidowe stanowią intrygujące wyzwanie badawcze ze względu na swoje unikatowe właściwości, takie jak stabilność, rozpuszczalność w wodzie i biokompatybilność, a także na perspektywę możliwych zastosowań. Pomimo znacznego postępu w rozwoju tego typu systemów wciąż znane są jedynie nieliczne przykłady dobrze zdefiniowanych strukturalnie disulfidowych architektur makrocyklicznych i klatkowych. To właśnie te układy ze względu na swoje właściwości mają największy potencjał aplikacyjny.

CELEM NAUKOWYM tej pracy były synteza i analiza nowych dynamicznych układów makrocyklicznych i klatkowych zawierających odwracalne wiązania disulfidowe, ze szczególnym uwzględnieniem układów rozpuszczalnych i stabilnych w wodzie. Na tę rozprawę składa się cykl czterech prac naukowych, które mają wypełnić cel naukowy poprzez odniesienia do wymienionych poniżej aspektów chemii dynamicznych disulfidów.

ARCHITEKTURA produktów dynamicznych w otrzymywanych DCL to właściwość trudna do uzyskania i kontrolowania. Zastosowanie bloku budulcowego o odpowiedniej strukturze i geometrii potrafi wpłynąć na układ dynamiczny w taki sposób, że spośród wielu możliwych produktów kombinatorycznych obserwuje się formowanie tylko danego typu architektur lub nawet pojedynczego produktu dynamicznego. W pracy D1 opisano dynamiczną bibliotekę pięciu dimerycznych klatek molekularnych otrzymanych z trzech tritiołowych bloków budulcowych o symetrii C_3 , które wykazują wysoką selektywność formowania i ze względu na swój rozmiar częściowe samosortowanie strukturalne.

ROZPUSZCZALNOŚĆ jest kluczową właściwością systemu molekularnego lub supramolekularnego warunkującą jego zastosowanie w danych warunkach. Dlatego też możliwość modulacji rozpuszczalności takiego układu bez naruszenia jego głównych funkcji i cech strukturalnych jest pożądana. Praca D2 jest poświęcona modyfikacji strukturalnej jednego z dwóch bloków budulcowych w taki sposób, aby multidynamiczna

asocjacja tego układu w wieloskładnikową i fluorescencyjną klatkę molekularną była możliwa w ekstremalnie różnych rozpuszczalnikach, takich jak chloroform czy woda.

SYNTEZA bloków budulcowych jest równie istotną częścią DCC, co analiza otrzymanych układów dynamicznych. Etap przygotowania wielofunkcyjnych i atrakcyjnych strukturalnie komponentów na drodze klasycznej syntezy organicznej jest często długim i żmudnym procesem. Dlatego też praca D3 została poświęcona rozwojowi metod syntetycznych pozwalających na skrócenie tego etapu. Przedstawiono w niej szybką i wydajną metodę otrzymywania zróżnicowanych strukturalnie wielofunkcyjnych diimidów modyfikowanych α -aminokwasami z wykorzystaniem syntezy mikrofalowej.

Zewnętrzna KONTROLA właściwości DCL poprzez modulację warunków fizykochemicznych środowiska jest trudna, ale i pożądana. W pracy D4 pojedynczy blok budulcowy został wykorzystany do wygenerowania biblioteki licznych dynamicznych architektur makrocyklicznych w jednoetapowym procesie, poprzez zastosowanie nieoczekiwanej hydrolizy diimidów *in situ*. Zaproponowano nową metodę podwójnej stymulacji DCL, która polega na zmianach pH środowiska i dodatku DMSO, co umożliwiła kontrolę nad różnorodnością strukturalną otrzymanych makrocykli.

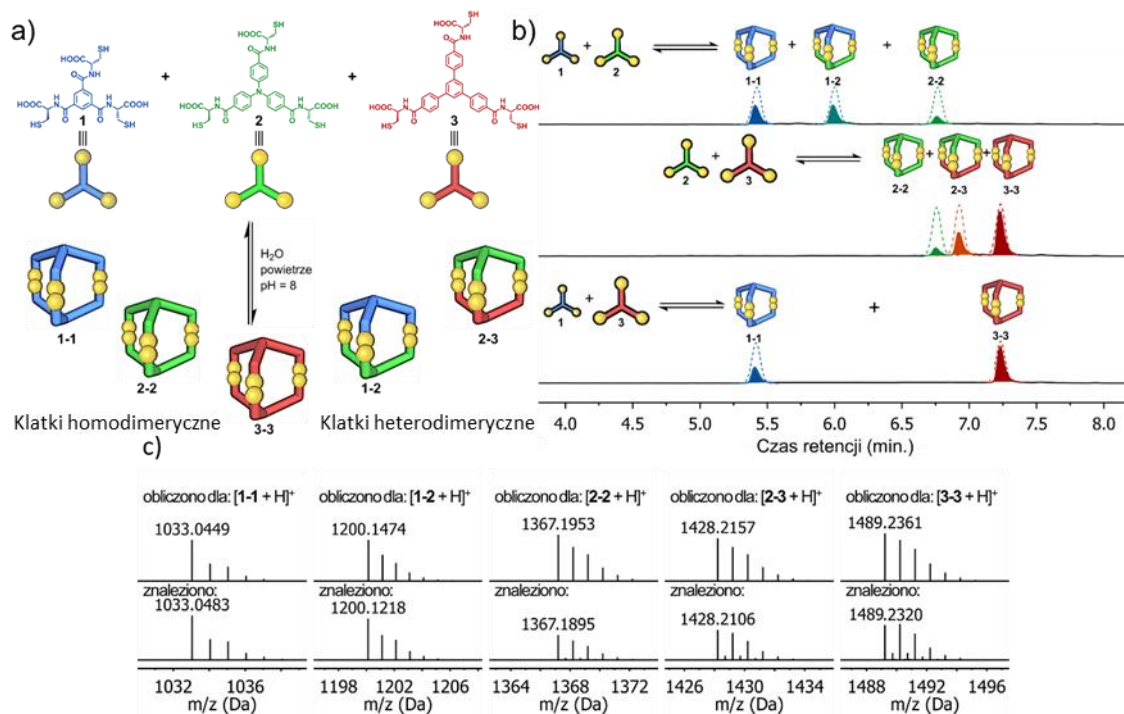
7 CZĘŚĆ BADAWCZA – OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

7.1 Strukturalne samosortowanie pseudopeptydowych, dimerycznych klatek disulfidowych w wodzie: badania mechanistyczne i wykrywanie kationów [D1]

Celem tej pracy było opracowanie wydajnej syntezy homo- i heterodimerycznych, stabilnych w wodzie klatek molekularnych przy użyciu różnych aromatycznych platform organicznych funkcjonalizowanych *L*-cysteiną. Założono, że zapewni to dobrą bazę do zbadania zjawiska samosortowania w dynamicznym układzie wielodisulfidowym. Podjęto również udaną próbę uzyskania nowych informacji na temat czynników strukturalnych i geometrycznych, które są kluczowe dla tworzenia się klatek disulfidowych. Wykonano również szereg badań kinetycznych pokazujących etapy formowania się klatek.

Zaprojektowano trzy platformy organiczne oparte o aromatyczne kwasy trikarboksylowe i *L*-cysteinę. Zestaw platform aromatycznych został dobrany tak, aby stopniowo zwiększać rozmiar (średnicę) sztywnego rdzenia. Bloki budulcowe uzyskano za pomocą zmodyfikowanej trój etapowej syntezy⁴⁸ z odpowiednich trikwasów karboksylowych, w wyniku której otrzymano trzy tritiolowe komponenty **1**, **2** i **3**.

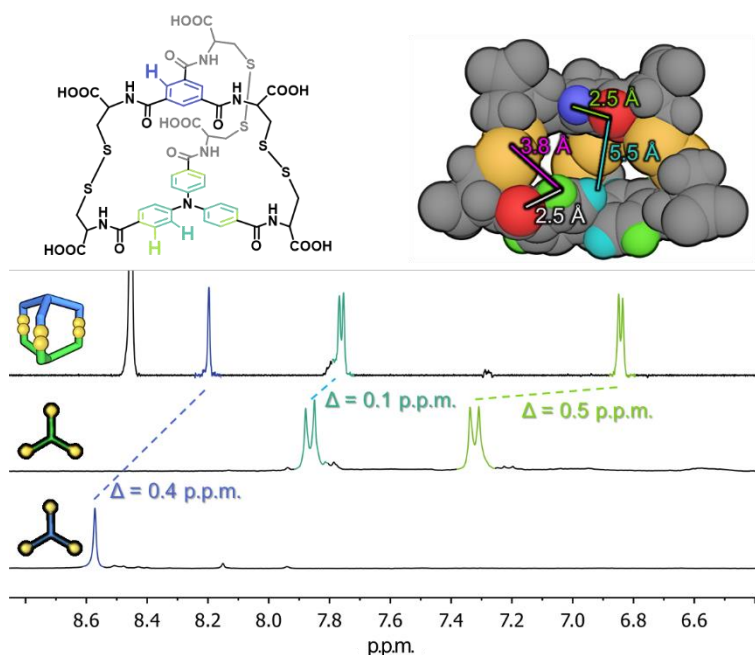
Przygotowano zasadowe roztwory każdego z trzech komponentów (pH 8,0, 5,0 mM), które umieszczono następnie w luźno zamkniętych fiolkach i pozostawiono do utlenienia przez 5 dni. Aby upewnić się, że wszystkie DCL osiągnęły równowagę termodynamiczną, każdą próbkę sprawdzono dodatkowo metodą HPLC tydzień i miesiąc po zakończeniu 5-dniowego czasu reakcji. Analiza LC-MS wykazała, że każda mieszanina poreakcyjna zawierała tylko jeden produkt (bardziej polarny niż substrat). Został on zidentyfikowany przez widma masowe jako monoprotonowany kation o masie dwukrotnie większej niż substrat, pomniejszony o masę 6 atomów wodoru odpowiadających tym utraconym podczas formowania trzech wiązań disulfidowych. Zaobserwowane masy odpowiadają zakładanym klatkom trisdysulfidowym (Rys. 23).



Rys. 23. a) Ogólny schemat przedstawionej DCL – trzy bloki budulcowe reagują ze sobą i tworzą pięć różnych klatek disulfidowych, trzy homodimeryczne (1-1, 2-2 i 3-3) i dwie heterodimeryczne (1-2 i 2-3). b) Chromatogramy HPLC (254 nm) pokazujące tworzenie heterodimerycznych klatek w mieszaninach par komponentów. Dla pary 1 + 3 nie zaobserwowano klatki 1-3. Ze względu na znaczne różnice w molowych współczynnikach ekstynkcji składników chromatogramy nie pokazują rzeczywistych ilości produktów. Linia przerywana przedstawia rzeczywistą zawartość każdej z nich. c) Porównanie eksperymentalnych i teoretycznych widm masowych (ESI-MS) wszystkich pięciu klatek

Następnie sprawdzono, czy różne bloki budulcowe mogą reagować między sobą i tworzyć heteroskładnikowe struktury klatkowe. Równomolowe roztwory zawierające pary komponentów poddano analogicznej procedurze przygotowania DCL. W mieszaninie poreakcyjnej pochodzącej ze składników 1 i 2 wykryto trzy różne produkty w równych proporcjach molowych (Rys. 23b). Na podstawie analizy LC-MS zidentyfikowano dwie homodimeryczne klatki, 1-1 i 2-2, podczas gdy trzeci produkt wykazał masę odpowiadającą heterodimerycznej klatce 1-2. Podobne wyniki uzyskano dla mieszaniny 2 + 3, która po reakcji zawierała klatki 2-2, 3-3 i heterodimeryczną klatkę 2-3. W przypadku mieszaniny 1 + 3 w mieszaninie poreakcyjnej wykryto tylko dwie klatki homodimeryczne 1-1 i 3-3, bez śladu oczekiwanej struktury 1-3. Można tu więc zaobserwować strukturalne samosortowanie oparte na symetrii komponentów i różnicach w ich rozmiarze. Układy te preferują formowanie bardziej symetrycznych produktów w DCL. W żadnej z DCL nie zaobserwowano produktów liniowych ani makrocyklicznych.

W celu wykonania analizy NMR klatki homodimeryczne zostały wyizolowane w postaci stałej poprzez strącenie ich w formie odpowiednich heksakwasów karboksylowych z zasadowego roztworu DCL poprzez zakwaszenie. Klatki heterodimeryczne wyizolowano metodą półpreparatywnego HPLC w skali kilku miligramów. Widma ^1H i COSY NMR potwierdziły oczekiwaną strukturę i symetrię klatki **1-2** (Rys. 24).

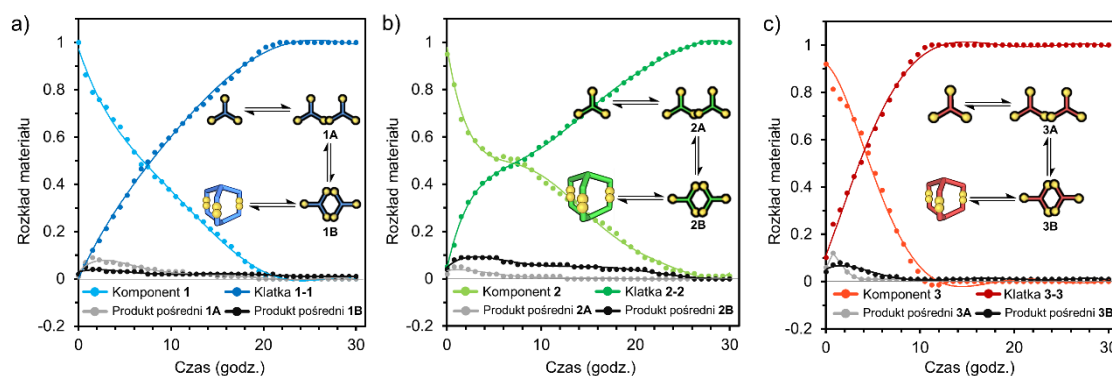


Rys. 24. Porównanie widm ^1H NMR klatki **1-2** z komponentami **1** i **2** (D_2O , 298 K, 600 MHz)

Przesunięcia pary dubletów w górę pola (turkusowy i zielony) z grup trifenyloaminowych i singletu (niebieski) z centralnego pierścienia fenylowego wskazują na oddziaływanie pomiędzy aromatycznymi atomami wodoru oraz bliskość platform organicznych **1** i **2**. Takie wyjaśnienie jest poparte analizą zoptymalizowanej struktury klatki **1-2**. Wszystkie aromatyczne atomy wodoru są w tej strukturze dodatkowo osłaniane przez sąsiedztwo bogatych w elektrony atomów siarki i tlenu.

W kolejnym etapie wykonano badania kinetyczne w celu lepszego zrozumienia procesu formowania się klatek. Zastosowano HPLC do monitorowania przebiegu reakcji, a także obserwowania zmian jakościowych i ilościowych DCL w czasie. Każdą mieszaninę reakcyjną obserwowano przez 30 godzin i monitorowano co 30 minut. W ten sposób otrzymano zestaw chromatogramów ilustrujących zanik bloku budulcowego i wzrost zawartości klatki w czasie, w oparciu o względną powierzchnię piku (RPA). Rozkład

zawartości produktów w czasie dla reakcji formowania się klatek homodimerycznych ilustruje Rys. 25 (produkty pośrednie przedstawiono na nim jako szare i czarne linie). Wykresy te pokazują, że w układach jednoskładnikowych całkowity czas konwersji był najkrótszy dla klatki **3-3** (10 godz.), dłuższy dla **1-1** (20 godz.) i najdłuższy dla **2-2** (26 godz.). Założono, że wpływ na to mają subtelne efekty, takie jak różnice w solwatacji polarnych reszt cysteiny, polarność powierzchni czy też wielkości bloków budulcowych.

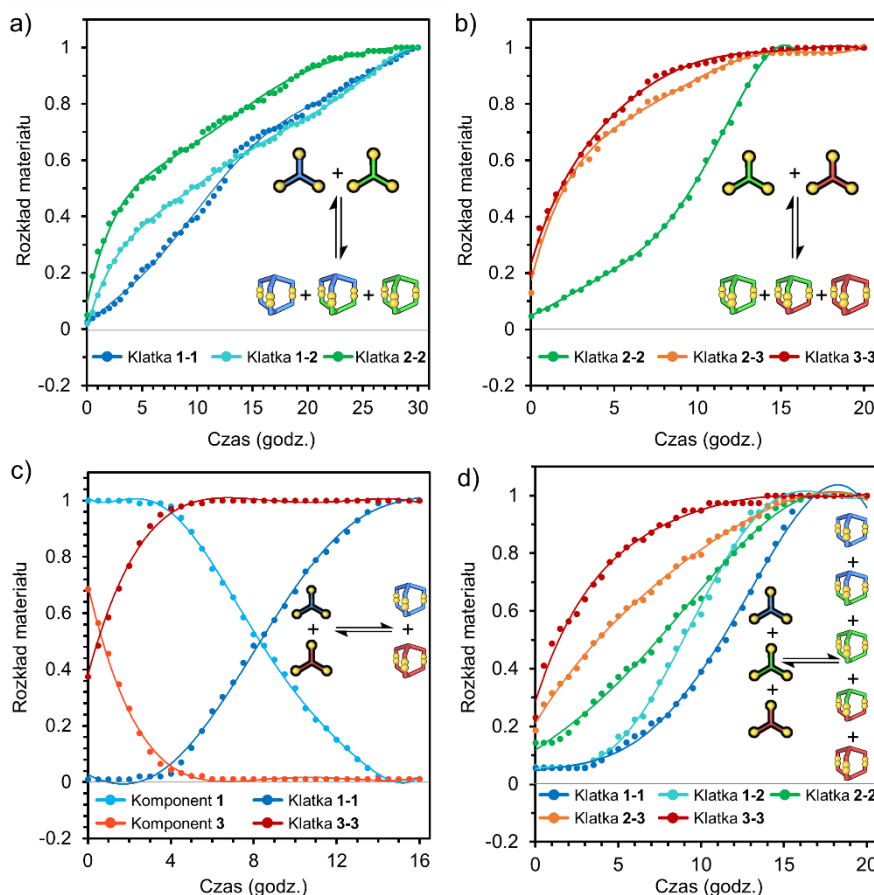


Rys. 25. Wykresy rozkładu materiału w czasie dla trzech klatek homodimerycznych: a) **1-1**, b) **2-2** i c) **3-3**

Dodatkowe pomiary LC-MS wykonane 60 minut po rozpoczęciu każdej z reakcji pozwoliły na poznanie składu mieszaniny reakcyjnej przed osiągnięciem stanu równowagi termodynamicznej i umożliwiły identyfikację produktów pośrednich. Eksperymenty te wykazały, że po 60 min. oprócz nieprzereagowanego tritiolu w mieszaninie są obecne związki będące połączeniem dwóch cząsteczek substratu przez jedno lub dwa wiązania disulfidowe. Nie wykryto żadnego związku o masie większej niż dwie jednostki tritiolowe.

W pierwszym etapie procesu dochodzi do międzycząsteczkowej reakcji utleniania dwóch cząsteczek tritiolu, które tworzą produkt z jednym wiązaniem disulfidowym (**1A**, **2A**, **3A**). Te produkty pośrednie ulegają następnie wewnątrzcząsteczkowej reakcji, która prowadzi do utworzenia kolejnego wiązania S-S i struktury makrocyklicznej (**1B**, **2B**, **3B**). W trzecim etapie następuje kolejna reakcja wewnątrzcząsteczkowa, która ostatecznie domyka strukturę klatki poprzez trzecie wiązanie disulfidowe (**1-1**, **2-2** i **3-3**). Z otrzymanych wykresów kinetycznych wynika, że szybkość powstawania produktu jest zasadniczo taka sama jak szybkość zaniku substratu. Stężenie produktów pośrednich jest niewielkie i stałe w najbardziej dynamicznym okresie reakcji. Można zatem wnioskować, że etapem limitującym szybkość tego procesu jest pierwsza międzycząsteczkowa reakcja utleniania pomiędzy dwoma cząsteczkami substratu prowadząca do powstania pierwszego

wiązania disulfidowego. Dwie kolejne wewnątrzcząsteczkowe reakcje są szybkie, co wskazuje na to, że produkty pośrednie są mniej stabilne niż ostateczny produkt klatkowy. W układach, w których powstają klatki heterodimersyjne, analiza jest znacznie bardziej skomplikowana, ponieważ dwa różne komponenty są zaangażowane w konkurencyjne reakcje. Pomiary LC-MS wykazały wszystkie oczekiwane heteroskładnikowe produkty pośrednie, jednakże w niższych stężeniach niż w układach jednoskładnikowych (Rys. 26).

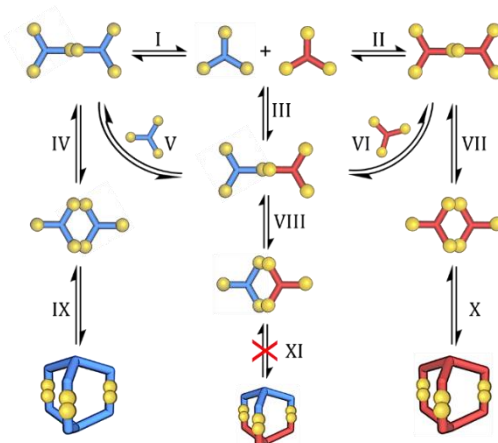


Rys. 26. Wykresy rozkładu materiału w czasie dla wieloskładnikowych DCL

W układzie **1 + 2** klatka **2-2** tworzy się najszybciej, następnie pojawia się **1-2**, a na końcu **1-1**. Całkowity czas reakcji jest znacznie dłuższy niż w układzie jednoskładnikowym **1** lub **2**, i wynosi około 30 godzin. Efekt ten jest jeszcze bardziej widoczny w układzie **2 + 3** (Rys. 26b). W tym przypadku szybkość formowania klatek **2-3** i **3-3** jest niemalże taka sama podczas całej reakcji. Także szybkość początkowa procesu jest około dwa razy wyższa niż w przypadku układu **1 + 2**. Dopiero gdy układ zostanie wysycony w ok. 80% przez produkty **2-3** i **3-3** (po około 4 godzinach), szybkość

tworzenia się **2-2** wzrasta. Obserwacja układu ze wszystkimi trzema komponentami na raz była zgodna z wynikami uzyskanymi dla mieszanin dwuskładnikowych, po raz kolejny pokazując wpływ rozmiaru bloku budulcowego na proces (Rys. 26d). Klatki zawierające największy komponent **3** tworzyły się znacznie szybciej niż te zawierające **2**. Natomiast najwolniej powstawały te zawierające komponent **1**. Szybkość tworzenia się klatek zbudowanych z **1** i **2** wzrasta istotnie dopiero wtedy, gdy układ zużył już większość dostępnego komponentu **3** (Rys. 26d).

W trakcie analizy kinetycznej układu **1 + 3** zaobserwowano, że homodimeryczne klatki **1-1** i **3-3** tworzą się prawie dwukrotnie szybciej w mieszaninie **1 + 3** niż w układach jednoskładnikowych (Rys. 26c). Całkowita konwersja **3** do **3-3** w tej mieszaninie zajmuje zaledwie ok. 4 godzin, podczas gdy pełne utworzenie **1-1** zajmuje ok. 10 godzin. Jak wykazano wyżej, utlenianie tioli jest procesem wolniejszym niż wymiana disulfidowa, dlatego tworzenie pierwszego wiązania S-S pomiędzy dwoma komponentami musi być etapem determinującym szybkość całego procesu tworzenia klatki (Rys. 27). Układ **1 + 3** wyróżnia obecność mieszanych związków pośrednich np. **1-3A** (reakcja III). Nukleofilowy atak tiolanu na disulfid **1-S-S-3** (**1-3A**) skutkuje powstaniem liniowego stanu przejściowego S-S-S, który rozkłada się do bardziej stabilnego produktu disulfidowego. Jeśli **1** jest słabszym kwasem niż **3**, to w tych samych warunkach pH stężenie tiolanu **1-S⁻** musi być niższe, co skutkuje zarówno wolniejszym formowaniem się rodników podczas utleniania, jak i korzystnym atakiem **3-S⁻** na związek pośredni **1-3A**. W tym przypadku syntezę **1-1** z **1-3A** (reakcje III i V) lub z **1B** (reakcja IV) można skutecznie spowolnić do czasu, dopóki układ nie zużyje dostępnego komponentu **3**. Jednakże biorąc pod uwagę złożoność tego systemu, zidentyfikowanie dokładnych przyczyn zwiększonej szybkości reakcji w układzie **1 + 3** jest trudne.

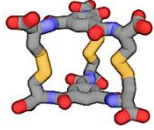
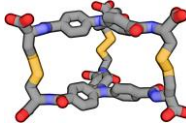
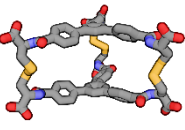
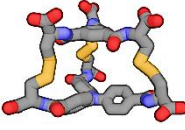
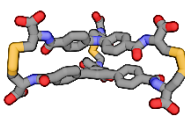


Rys. 27. Schematyczna reprezentacja możliwych reakcji wymian disulfidowych w dwuskładnikowej mieszaninie komponentów **1 + 3**

Pomimo wielu prób nie udało się otrzymać monokryształu z żadnej klatki. Zastosowano więc modelowanie molekularne w celu zoptymalizowania struktur klatek i porównano tak otrzymane wartości z danymi eksperymentalnymi (Tabela 1). Wartości promieni hydrodynamicznych wyznaczonych dla każdej z klatek na podstawie pomiarów DOSY dobrze korelują z promieniami obliczonymi z otrzymanych modeli, co dodatkowo uwiarygadnia zastosowaną metodę modelowania.

Właściwości zoptymalizowanych struktur klatek (DFT b3lyp (GD3) 6-31g+(d)) są spójne z danymi eksperymentalnymi. Odległość pomiędzy platformami aromatycznymi jest największa dla najbardziej polarnego rdzenia w klatce **2-2** (8,2 Å), a najmniejsza w **3-3** (4,0 Å). Jak wynika z wcześniejszych obserwacji, platforma **3** przez swoją dużą powierzchnię jest najbardziej hydrofobowa. Skutkiem niwelowania efektu hydrofobowego przez tę strukturę, jest więc płaski kształt klatki **3-3**. Obliczenia wykazały też, że we wszystkich klatkach wiązania disulfidowe przyjmują konfigurację *syn* względem reszty struktury.

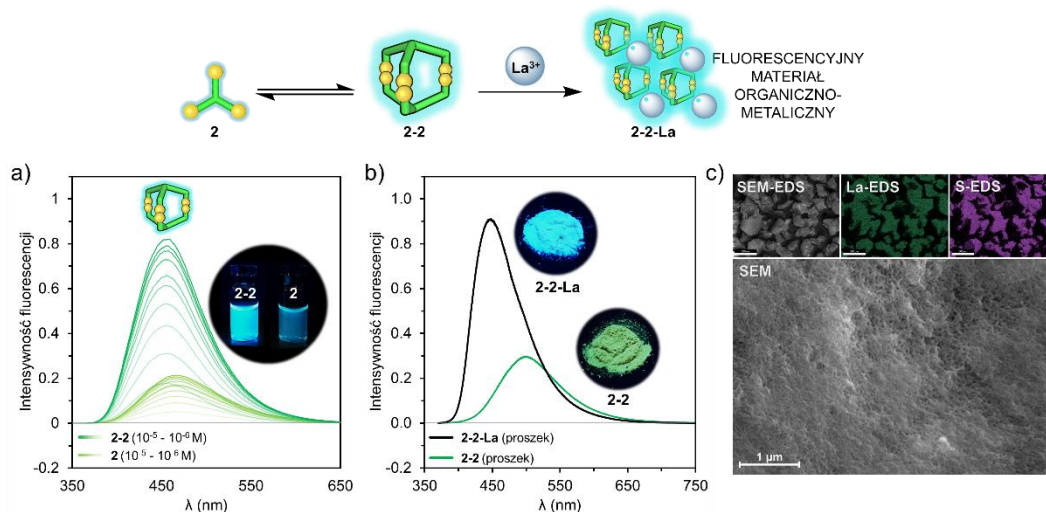
Tabela 1. Obliczone modele klatek dimerycznych i porównanie właściwości

Klatka	1-1	2-2	3-3	1-2	2-3
Obliczony model					
Symetria	D_3	D_3	D_3	C_3	C_3
r_{hyd} [Å] ^a	9,68	11,02	13,50	8,02	10,28
$r_{calc.}$ [Å] ^b	8,36	10,35	12,05	7,86	9,13
d [Å] ^c	7,9	8,2	8,1	7,5	4,0
φ ^d	107,0	136,6	105,5	105,4	85,5
θ ^e	4,9	9,7	5,2	8,1	1,5

^a promień hydrodynamiczny obliczony na podstawie DOSY, ^b promień hydrodynamiczny obliczony z modelu, ^c odległość pomiędzy platformami aromatycznymi, ^d kąt torsyjny wiązania S-S (obliczony), ^e kąt obrotu platform względem siebie wzdłuż osi Z

Podczas prac z **2-2** zaobserwowano, że dodatek soli lantanu $La(NO_3)_3$ do zasadowego roztworu klatki skutkuje ilościowym wytrąceniem się nierozpuszczalnego osadu **2-2-La**. Materiał ten został wyizolowany i poddany analizie w cieple stałym w celu wstępnego poznania jego właściwości (Rys. 28). W toku dalszych prac wykazano, że klatka **2-2** posiada silne właściwości fluorescencyjne, które są zachowane w nierozpuszczalnym w wodzie materiale **2-2-La**. Obrazowanie SEM tego materiału uwidocznilo bezpostaciową, porowatą strukturę, natomiast analiza SEM-EDS potwierdziła obecność lantanu w strukturze. Zaobserwowana właściwość klatki **2-2** do tworzenia

nierozpuszczalnych związków koordynacyjnych może zostać w przyszłości wykorzystana do spektroskopowego wykrywania wybranych kationów lub do wiązania lantanowców w wodzie.



Rys. 28. Analiza fluorescencyjnego materiału **2-2-La**: a) porównanie widm emisji pomiędzy **2** i **2-2** (wzbudzenie 345 nm, zakres stężeń 10^{-5} - 10^{-6} mol⁻¹ × dm³), b) porównanie widm emisji w ciele stałym pomiędzy **2-2** i materiałem **2-2-La** (wzbudzenie 345 nm), c) analiza SEM i SEM-EDS dla zawartości La i S

Pełen opis powyższego projektu został przedstawiony w pracy D1 (str. 69) i w Informacjach Uzupełniających S1 (str. 77) dołączonych do tej rozprawy.

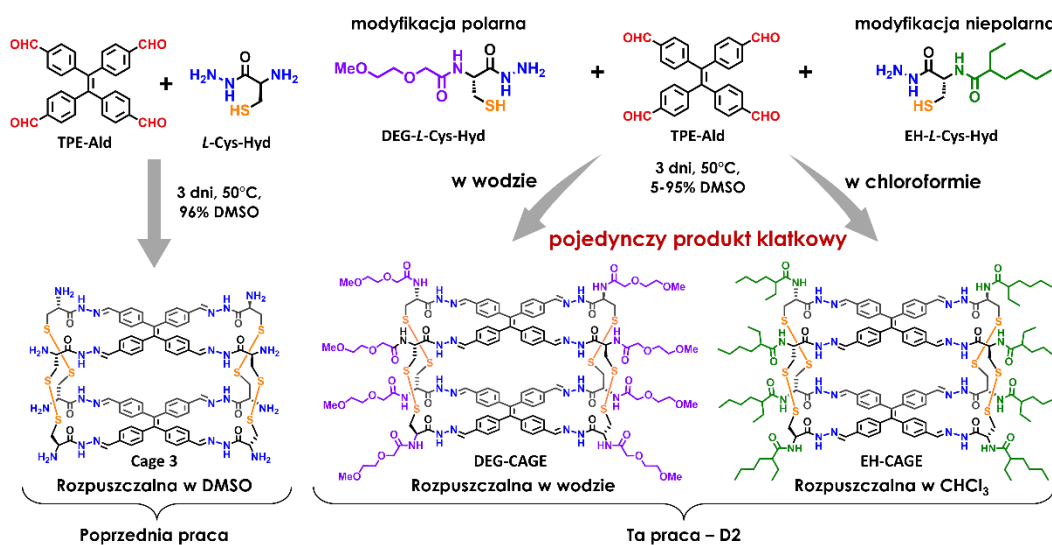
Konopka M., Cecot P., Harrowfield J.M., Stefankiewicz A.R., Structural self-sorting of pseudopeptide homo and heterodimeric disulfide cages in water: mechanistic insights and cation sensing, *Journal of Materials Chemistry C*, 2021, 9, 7607-7614.

Projekt zrealizowano we współpracy z prof. Jackiem M. Harrowfieldem z Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires, Université de Strasbourg (Francja).

7.2 Regulowanie rozpuszczalności fluorescencyjnych klatek aromatycznych przy użyciu bloków budulcowych funkcjonalizowanych aminokwasami [D2]

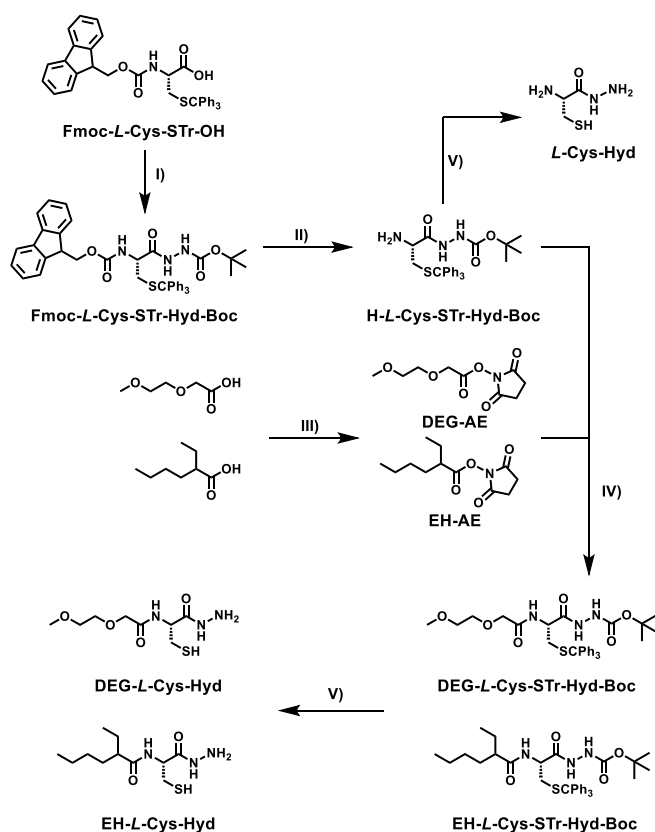
W drugiej pracy wchodzącej w skład tej rozprawy poruszono tematykę kontrolowania właściwości produktów dynamicznych poprzez modyfikację strukturalną bloków budulcowych. Jak przedstawiono we wstępie, możliwość kontrolowania rozpuszczalności danego systemu dynamicznego w danym środowisku często przesądza o możliwości jego późniejszego zastosowania. Dlatego też przedstawiona poniżej praca jest kontynuacją rozpoczętego wcześniej projektu²⁷ dotyczącego otrzymywania podwójnie dynamicznych, ortogonalnych klatek molekularnych.

Autorzy projektu pokazują aż dziesięć małych bloków budulcowych, które reagują jednocześnie w mieszaninie DMSO-woda 94%/6% i tworzą selektywnie pojedynczą strukturę klatkową. Opisana klatka powstaje z tetrakis-aldehydu tetrafenyletylenowego (**TPE-Ald**) oraz hydrazynu cysteiny (**Cys-Hyd**) (Rys. 29). Silnie solwatujący rozpuszczalnik, jakim jest DMSO, pozwala na jednoczesne rozpuszczenie w medium reakcyjnym tych dwóch, bardzo różnych pod względem polarności, substratów. Jednakże autorzy cytowanej pracy nie byli w stanie zmniejszyć zawartości DMSO lub wody bez wytrącania się któregoś z substratów. Przedstawiona na Rys. 29 klatka **Cage 3** zawiera osiem pierwszorzędowych grup aminowych -NH₂ w resztach cysteinowych, które dają możliwość funkcjonalizacji całej struktury.



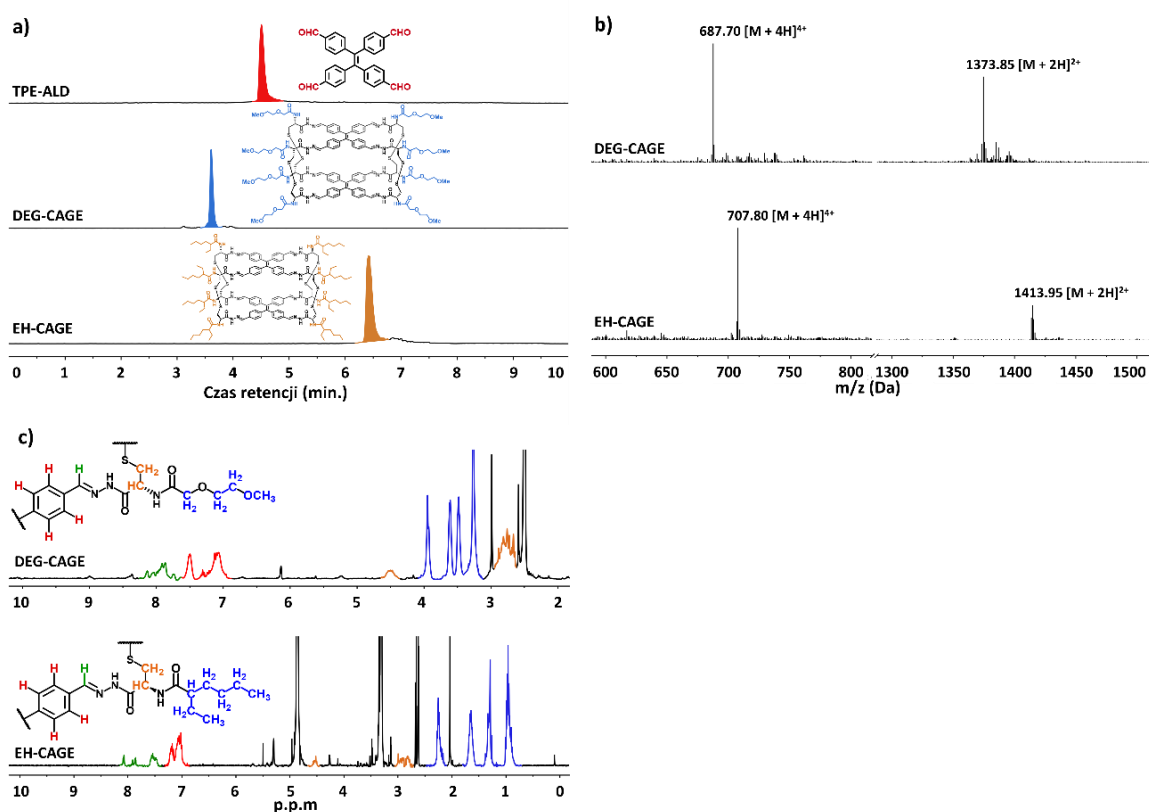
Rys. 29. Ogólny schemat reakcji tworzenia się zmodyfikowanych klatek molekularnych. Trzy grupy funkcyjne biorące udział w procesie samoorganizacji oznaczono kolorami: aldehyd – czerwonym, hydrazyd/amina – niebieskim, tiol – pomarańczowym

Właśnie ten fakt został wykorzystany w pracy D2. Grupy $-NH_2$ posłużyły jako miejsce modyfikacji **Cys-Hyd**, która miała na celu zmianę rozpuszczalności zarówno bloków budulcowych, jak i klatki. Projekt rozpoczęto od zaprojektowania i syntezy kilku strukturalnie dopasowanych komponentów molekularnych. Tetra-aldehyd (**TPE-Ald**) został użyty jako aromatyczny rdzeń klatek, aby zachować struktury opisanych wcześniej architektur. Do wstawienia strukturalnej modyfikacji grupy aminowej w hydrazydzie cysteiny zastosowano wiązanie amidowe, ponieważ reakcje sprzęgania aminokwasów są dobrze opisane i przebiegają w łagodnych warunkach. Następnie wybrano dwa kwasy organiczne do modyfikacji **Cys-Hyd**. Kwas 2-(2-metoksyetoksy)octowy (**DEG**) zawierający polarny i hydrofilowy fragment glikolowy został użyty, żeby uzyskać rozpuszczalność komponentu w wodzie. Do modyfikacji niepolarniej zastosowano racemiczny kwas 2-etyloheksanowy (**EH**), aby zwiększyć hydrofobowość układu i uzyskać klatki rozpuszczalne w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych. Na drodze przedstawionej syntezy otrzymano dwa nowe *N*-sfunkcjonalizowane hydrazidy cysteiny **DEG-L-Cys-HYD** i **EH-L-Cys-HYD** (Rys. 30).



Rys. 30. Synteza zmodyfikowanych hydrazydów cysteiny. Odczynniki i warunki: I) $(CH_3)_3COCONHNH_2$, EDC-HCl, HOBT, Et_3N , CH_2Cl_2 , $0^\circ C$ do temp. pokojowej; II) DMF/piperydyna (8:2 v.v.), temp. pokojowa; III) DCC, NHS, THF lub CH_2Cl_2 , temp. pokojowa; IV) Et_3N , DMF, temp. pokojowa; V) TIPS/TFA (90:10 v.v.)

Zmodyfikowane hydrazydy zostały oddzielnie poddane reakcji z **TPE-Ald** w stosunku 1:4 w mieszaninie rozpuszczalników (DMSO-woda 94%/6%, temp. 50°C). W obu przypadkach analiza LC-MS wykazała pojedynczy produkt w mieszaninie poreakcyjnej, a całkowita konwersja została osiągnięta po 3 dniach. Analiza masowa wykazała sygnały odpowiadające masom oczekiwanych klatek, które powstały ze zmodyfikowanych hydrazydów, odpowiednio **DEG-CAGE** i **EH-CAGE**. W ten sposób potwierdzono tworzenie się dwóch nowych klatek ze zmodyfikowanych bloków budulcowych za pomocą ortogonalnych dynamicznych reakcji kowalencyjnych (Rys. 31).



Rys. 31. Charakterystyka nowych klatek: a) porównanie chromatogramów HPLC (310 nm) **TPE-ALD**, **DEG-CAGE** i **EH-CAGE** ilustrujące tworzenie się pojedynczego produktu, b) widma masowe ESI-MS zmodyfikowanych klatek, c) widma ¹H NMR (DMSO-d₆, 298 K, 400 MHz) dla **DEG-CAGE** (u góry) i **EH-CAGE** (na dole)

Obie klatki scharakteryzowano za pomocą ¹H NMR. W celu otrzymania miarodajnej próbki „surową” mieszaninę poreakcyjną odparowano do sucha, a następnie pozostały osad rozpuszczono w rozpuszczalniku deuterowanym. Zarejestrowane widma potwierdziły obecność wszystkich oczekiwanych grup funkcyjnych w strukturze klatki (sygnały iminowe $\delta = 8$ p.p.m., sygnał diastereotopowy cysteiny $\delta = 4,5$ p.p.m. i sygnały grup bocznych). Klatki te istnieją jako mieszanina izomerów *cis* i *trans* wiązań iminowych

oraz izomerów *syn* i *anti* wiązań disulfidowych. W rezultacie powoduje to niską symetrię widm ^1H NMR (Rys. 31c).

Następnie zmieniono skład mieszaniny reakcyjnej. Najpierw zbadano formowanie się **DEG-CAGE** w układzie rozpuszczalników ze wzrastającą zawartością wody, od DMSO-woda 94%/6% do 100% wody. Analiza LC-MS wyraźnie wykazała tworzenie się klatek do zawartości 25% DMSO w wodzie. W próbkach zawierających mniej niż 25% DMSO analiza LC-MS wykazała obecność związków pośrednich, których masy odpowiadały czterem produktom kondensacji acylohydrazonów. W podobny sposób przebadano formowanie się klatki **EH-CAGE** w chloroformie (od 100% DMSO do 100% CHCl_3). W tym przypadku analiza LC-MS wykazała skuteczne tworzenie się tej klatki do 90% zawartości CHCl_3 . Zaobserwowano, że pewne minimalne stężenie DMSO (10%) jest niezbędne do całkowitego utworzenia się klatki. Reakcje te przebiegają w zamkniętych naczyniach, więc dostęp powietrza (utleniacza) jest niemożliwy i dlatego utleniaczem tioli jest DMSO. Wyniki przedstawiono w Tabeli. 2.

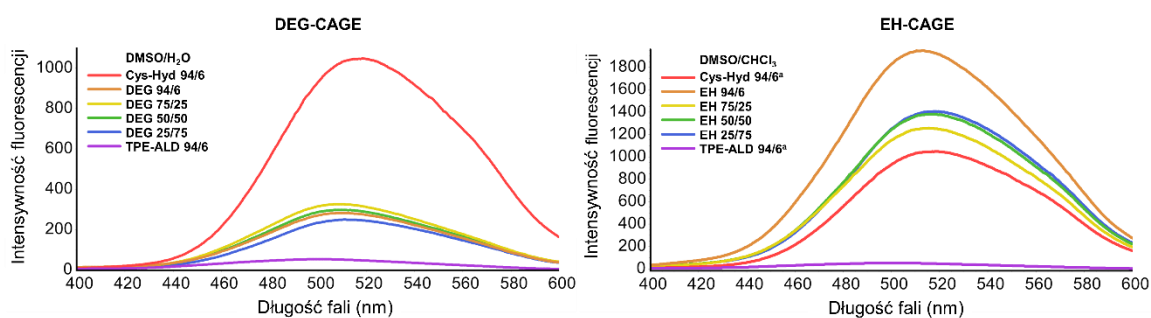
Tabela. 2. Badanie przesiewowe tworzenia się klatek w różnych mieszaninach rozpuszczalników

Lp.	Komponent ^a	Mieszanina rozpuszczalników (% obj.)			Powstanie klatki
		DMSO	H ₂ O	CHCl ₃	
1	<i>L</i> -Cys-Hyd	94	6	-	tak
2	DEG- <i>L</i> -Cys-Hyd	94	6	-	tak
3	DEG- <i>L</i> -Cys-Hyd	75	25	-	tak
4	DEG- <i>L</i> -Cys-Hyd	50	50	-	tak
5	DEG- <i>L</i> -Cys-Hyd	25	75	-	tak
6	DEG- <i>L</i> -Cys-Hyd	10	90	-	nie
7	DEG- <i>L</i> -Cys-Hyd	5	95	-	nie
8	DEG- <i>L</i> -Cys-Hyd	0	100	-	nie
9	EH- <i>L</i> -Cys-Hyd	100	-	0	tak
10	EH- <i>L</i> -Cys-Hyd	75	-	25	tak
11	EH- <i>L</i> -Cys-Hyd	50	-	50	tak
12	EH- <i>L</i> -Cys-Hyd	25	-	75	tak
13	EH- <i>L</i> -Cys-Hyd	10	-	90	tak
14	EH- <i>L</i> -Cys-Hyd	5	-	95	nie
15	EH- <i>L</i> -Cys-Hyd	0	-	100	nie

^a dotyczy hydrazynu, który został użyty do syntezy danej klatki

Jak wspomniano, oryginalne klatki wykazywały stosunkowo silną fluorescencję ze względu na właściwości TPE. Jednym z głównych celów tego projektu było zachowanie

tej właściwości w zmodyfikowanych architekturach. Widma fluorescencji obu nowych klatek zarejestrowano w różnych mieszaninach rozpuszczalników przy tym samym stężeniu (0,25 mM). Widma pozostały zasadniczo niezmienione we wszystkich mieszaninach, wykazując maksimum emisji przy ok. 510-520 nm. Obie klatki wykazały znaczną poprawę emisji względem wyjściowego aldehydu **TPE-ALD** (Rys. 32).



Rys. 32. Porównanie wykresów fluorescencji nowych klatek w odniesieniu do niezmodyfikowanej klatki (*L*-Cys-Hyd, krzywa czerwona) i TPE-Ald (krzywa fioletowa), roztwory 0,25 mM, długość fali wzbudzenia 320 nm, zakres pomiaru emisji 400-600 nm

Obserwowane wzmocnienie emisji wynika z usztywnienia struktury i tłumienia rotacji pierścieni fenylowych w dwóch jednostkach TPE w obrębie pojedynczej cząsteczki klatki⁸⁷. Zwiększenie zawartości wody zmniejsza około pięciokrotnie intensywność emisji fluorescencji **DEG-CAGE**. Z drugiej strony zwiększenie zawartości chloroformu zwiększa około dwukrotnie intensywność emisji fluorescencji **EH-CAGE**.

Pelen opis powyższego projektu został przedstawiony w pracy D2 (str. 124) i w Informacjach Uzupelniających S2 (str. 132) dołączonych do tej rozprawy.

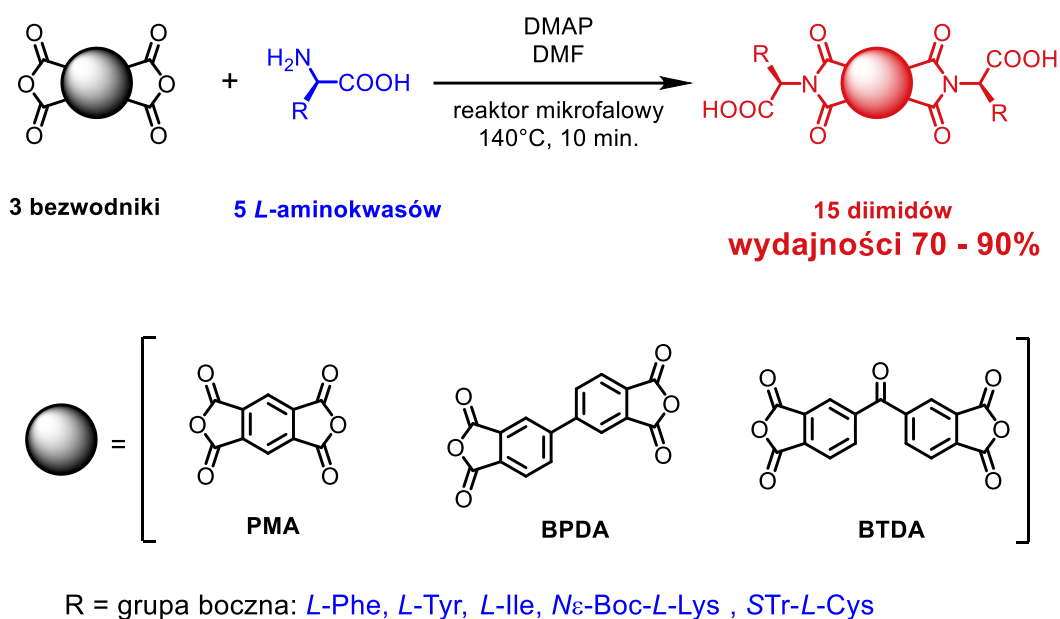
Konopka M., Cecot P., Ulrich S., Stefankiewicz A.R., *Tuning the Solubility of Self-Assembled Fluorescent Aromatic Cages Using Functionalized Amino Acid Building Blocks*, *Frontiers in Chemistry*, **2019**, 7, (503).

Projekt zrealizowano we współpracy z dr. Sébastienem Ulrichem z Institut des Biomolécules Max Mousseron w Montpellier (Francja) w ramach stażu naukowego w programie Erasmus+.

7.3 Wydajna synteza mikrofalowa zróżnicowanych strukturalnie diimidów modyfikowanych α -aminokwasami [D3]

Niezwykle ważnym aspektem każdego systemu w DCC są odpowiednio dobrane bloki budulcowe. Dlatego równoległe z eksploracją kolejnych systemów dynamicznych należy rozwijać również metody syntezy bloków budulcowych. Właśnie z tego powodu trzecia część rozprawy została poświęcona zagadnieniu wyłącznie syntetycznemu, to jest zastosowaniu syntezy mikrofalowej w otrzymywaniu atrakcyjnych strukturalnie wielofunkcyjnych platform molekularnych.

W tej pracy przedstawiono jednoetapowy proces mikrofalowej syntezy symetrycznych diimidów modyfikowanych naturalnymi α -aminokwasami w oparciu o trzy strukturalnie zróżnicowane rdzenie aromatyczne: dibezwodnik piromelitowy (**PMA**), dibezwodnik kwasu bifenylotetrakarboksyowego (**BPDA**) i dibezwodnik 3,3',4,4'-benzofenonetetrakarboksyowy (**BTDA**, Rys. 33).

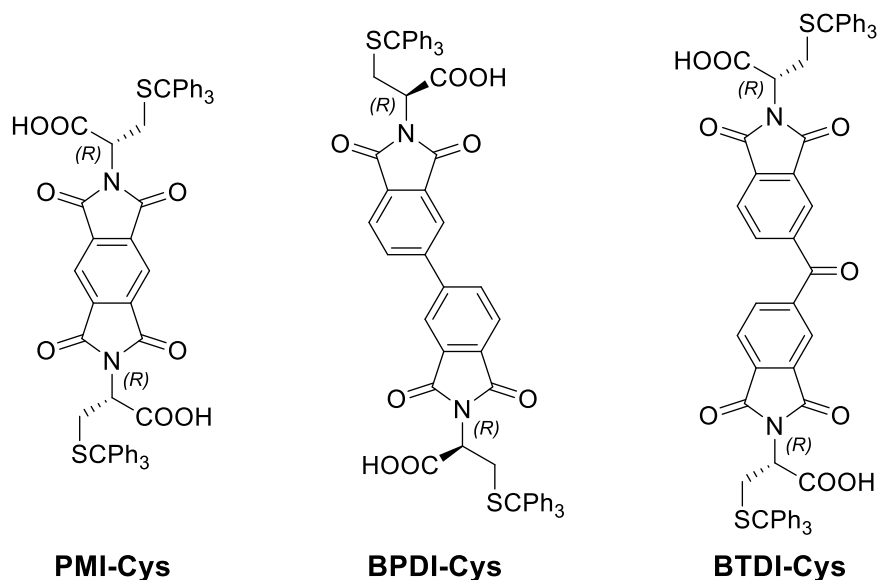


Rys. 33. Schemat metody syntezy mikrofalowej symetrycznych diimidów z trzech różnych dibezwodników aromatycznych i pięciu α -aminokwasów

Wybrano te bezwodniki ze względu na ich potencjał strukturalny do otrzymania nowych diimidów o właściwościach innych niż dobrze znane pochodne NDI i PBI^{56, 88}. Rdzeń **PMA** został uznany za interesującą platformę do projektowania n-kanałowych półprzewodników tranzystorowych opartych na diimidach

piromelitowych⁸⁹. **BPDA** wprowadza do struktury dodatkową swobodną oś obrotu w centrum cząsteczki diimidu, co daje możliwość otrzymania nowej klasy labilności konformacyjnej. **BTDA** posiada grupę ketonową w centrum cząsteczki, co zapewnia perspektywę dalszej modyfikacji i daje punkt przyłączenia do sprzęgania dwóch lub więcej cząsteczek diimidu w większe układy⁹⁰. Wymienione trzy dibezwodniki zostały poddane oddzielnym reakcjom z pięcioma wybranymi aminokwasami: *L*-fenyloalaniną, *L*-tyroziną, *L*-izoleucyną, *Nε*-Boc-*L*-lizyną i *S*Tr-*L*-cysteiną. Wybrano je, gdyż ze względu na swoje zróżnicowanie strukturalne reprezentują wszystkie naturalne *L*-aminokwasy. Stanowi to rygorystyczny test wrażliwości metody na jednoczesną obecność kilku grup funkcyjnych w reagentach. Wynikiem przeprowadzonych syntez jest grupa piętnastu diimidów otrzymanych z bardzo wysokimi wydajnościami (70-90%), niezależnie od skali reakcji i bez śladów racemizacji w centrach chiralnych.

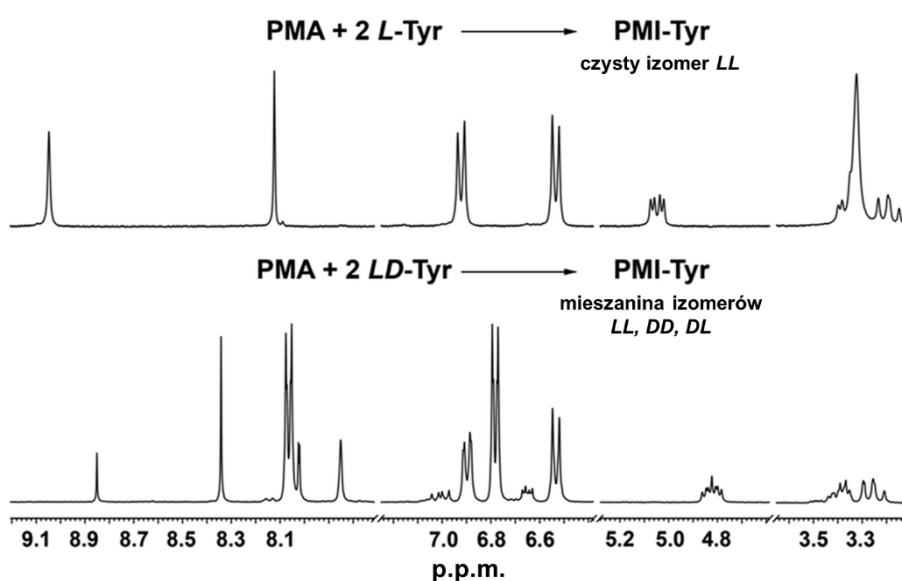
Z punktu widzenia tej rozprawy szczególnie interesujące są trzy diimidy zmodyfikowane *S*Tr-*L*-cysteiną. Stanowią potencjalne bloki budulcowe, które mogą posłużyć do tworzenia disulfidowych makrocykli lub jako elementy większych układów wieloskładnikowych (Rys. 34). Związek **BPDI-Cys** został prekursorem ditiolowego komponentu, któremu jest poświęcona kolejna praca cyklu - D4.



Rys. 34. Struktury trzech diimidów zmodyfikowanych *S*Tr-*L*-cysteiną jako potencjalne ditiolowe bloki budulcowe

Ze względu na obecność centrum chiralnego w dwóch reagujących cząsteczkach aminokwasu, możliwe jest powstanie mieszaniny trzech stereoizomerów o konfiguracji

LL, *DD* i *DL*⁹¹. Aby potwierdzić, że prezentowana metoda nie prowadzi do racemizacji, przeprowadzono reakcję testową pomiędzy dibezwodnikiem **PMA** i racemiczną *DL*-tyrozyną. Zgodnie z oczekiwaniami zastosowanie racemicznego substratu doprowadziło do otrzymania mieszaniny diastereoizomerów, których obecność zaobserwowano w zwielokrotnieniu sygnałów w widmie ¹H NMR (Rys. 35). W przypadku zastosowania chiralnie czystych aminokwasów zawsze obserwowano wyłącznie homochiralne izomery *LL*.



Rys. 35. Porównanie widm ¹H NMR (300 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) produktów wyizolowanych po reakcji dibezwodnika **PMA** z chiralnie czystą *L*-tyrozyną (góra) i racemiczną tyrozyną (dół)

Pierwszy etap metody syntetycznej polega na mikrofalowym ogrzewaniu roztworu substratów (5 mL DMF, 0,5 mmol dibezwodnika, 1,0 mmol aminokwasu i 2,0 mmol zasady) w dedykowanej probówce ciśnieniowej w temperaturze 140°C przez 10 minut. Następnie wystudzoną mieszaninę poreakcyjną wlewa się bez usuwania rozpuszczalnika do nadmiaru 1M HCl, co skutkuje natychmiastowym wytrąceniem się produktu, który łatwo oddziela się przez filtrację próżniową. W celu znalezienia optymalnych warunków reakcji wykonano testy krzyżowe na układzie substratów **PMA** + *L*-fenyloalanina z dwoma różnymi rozpuszczalnikami, DMF i MeCN oraz trzema zasadami, Et₃N, DMAP i DABCO. Najbardziej wydajnym układem okazała się para DMF i DMAP, która prowadzi do najwyższej wydajności reakcji testowej (88%).

W toku dalszych badań stwierdzono, że bezciśnieniowy układ DMF/DMAP sprawdza się równie dobrze w dziesięciokrotnie większej skali (10,0 mmol aminokwasu i 5,0 mmol dibezwodnika). Reakcje w dużej skali prowadzono w standardowej 100 ml kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w chłodnicę powietrzną, która zapewnia refluks wrzącego rozpuszczalnika. Przy zachowaniu standardowego czasu reakcji (10 min.) otrzymano oczekiwane produkty z zasadniczo takimi samymi wydajnościami, jak w małej skali i w wysokim ciśnieniu. W ten sposób można uzyskać do 5 g czystego diimidu w jednej partii i wykorzystać go do dalszych modyfikacji.

Wykazano zatem, że opracowana metoda jest wydajna i może być stosowana zarówno w warunkach wysokiego ciśnienia (mała skala), jak i w otwartym naczyniu (duża skala).

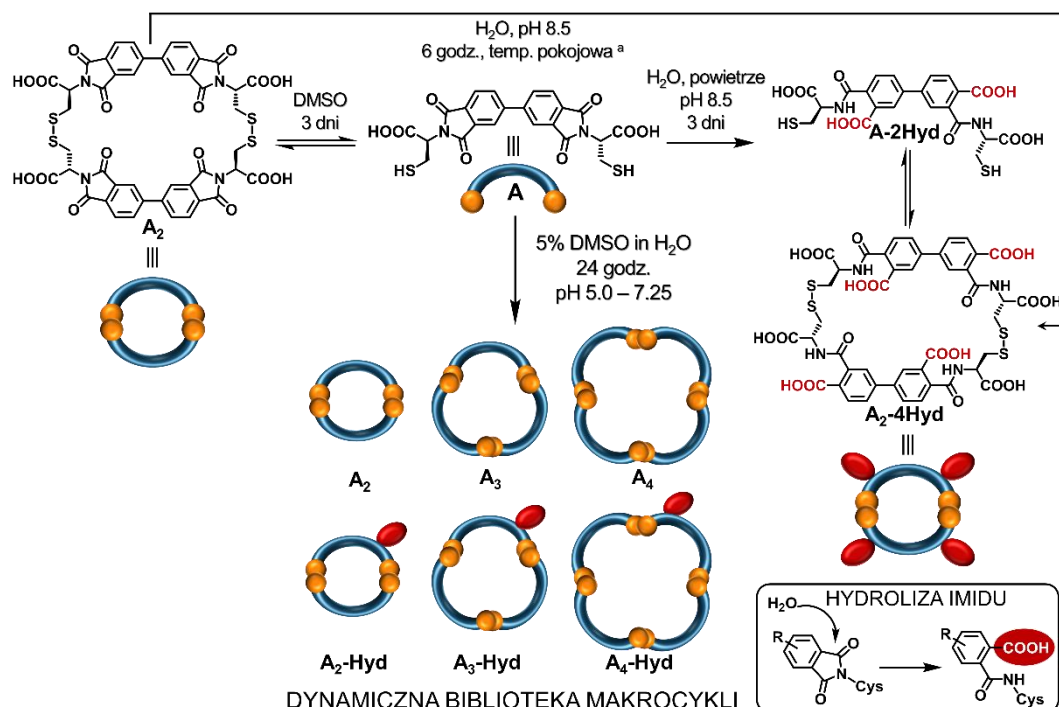
Pełen opis powyższego projektu został przedstawiony w pracy D3 (str. 156) i w Informacjach Uzupełniających S3 (str. 163) dołączonych do tej rozprawy.

Konopka M., Markiewicz G., Stefankiewicz A.R., *Highly efficient one-step microwave-assisted synthesis of structurally diverse bis-substituted α -amino acid derived diimides*, *RSC Advances*, **2018**, 8, 29840-29846.

7.4 Rozszerzanie różnorodności strukturalnej w dynamicznej bibliotece disulfidowych makrocykli poprzez hydrolizę imidów *in situ* [D4]

Czwarta część rozprawy prezentuje nieortodoksyjne podejście do dynamicznej chemii kombinatorycznej disulfidów poprzez zastosowanie hydrolizy imidów *in situ*. W toku badań opracowano przystępną metodę otrzymywania skomplikowanych bibliotek produktów makrocyklicznych. Ta metoda opiera się na mieszaninie buforu i DMSO, która stanowi doskonale środowisko do utleniania tioli w warunkach dynamicznych. Pokazano także sposób na kontrolę składu bibliotek poprzez zmiany pH i stężenia DMSO. Zaowocowało to zwiększeniem różnorodności strukturalnej bibliotek dynamicznych i otrzymaniem większych produktów makrocyklicznych.

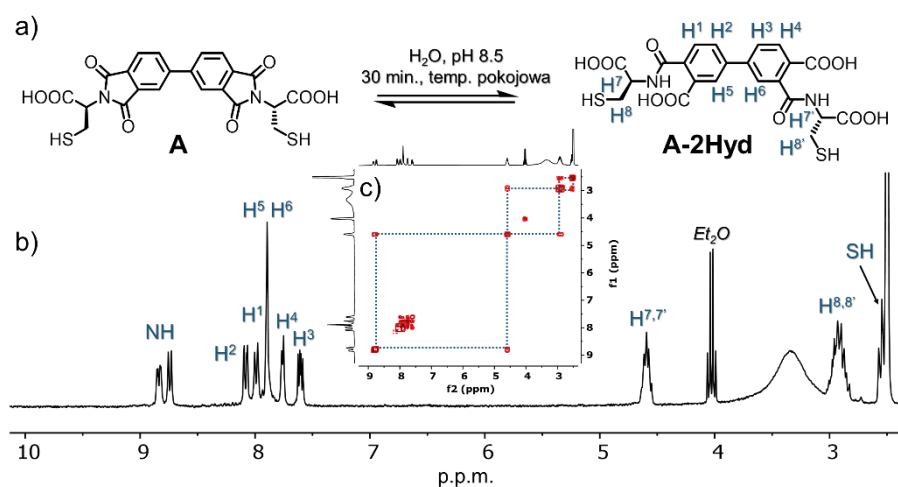
Punktem wyjściowym tego projektu była opisana wyżej praca D3. Jednym z przedstawionych w niej związków jest diimid **BPDI-Cys** o rdzeniu bifenyłowym wyposażony w dwie reszty cysteinowe, których grupy tiolowe są zablokowane grupami trityłowymi (Rys. 34). Odblokowanie tych grup prowadzi do otrzymania nowego ditiolowego bloku budulcowego **A** (Rys. 36).



Rys. 36. Schematyczne przedstawienie DCL utworzonych z komponentu **A** w trzech różnych warunkach: w DMSO, w wodzie o pH 8,5 i w mieszaninie 5% DMSO w buforze AcONH₄. Grupa -COOH powstała w wyniku hydrolizy imidu została zaznaczona na schematach blokowych jako czerwona elipsa. ^a wszystkie reakcje przedstawione na schemacie przebiegają w temperaturze pokojowej

Podczas standardowej procedury DCC z komponentu **A** (woda, pH 8,0, temp. pokojowa) zamiast oczekiwanej biblioteki makrocyklicznych oligomerów zaobserwowano produkty powstałe w wyniku hydrolizy **A**. Dane literaturowe dotyczące hydrolizy imidów cyklicznych wskazały, że warto zbadać potencjał tego zjawiska w połączeniu z disulfidową DCC^{92, 93}. Okazało się, że w zasadowym wodnym roztworze **A** podczas tworzenia się wiązań disulfidowych zachodzi także hydroliza imidów. Powoduje ona otwarcie się pięcioczłonowego pierścienia, zapewniając w ten sposób dodatkowe właściwości, elastyczność konformacyjną, polarność (nowe grupy karboksylowe) i wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe przez donor amidowy – NH.

Projekt rozpoczęto od prostego eksperymentu z zasadowym roztworem **A** o pH 8,5 w otwartej fiołce. Za pomocą HPLC po kilkunastu minutach zaobserwowano całkowity rozkład **A** i powstanie pojedynczego, nowego produktu. Na podstawie analizy NMR i MS wykazano, że jest to niesymetryczny produkt podwójnej hydrolizy **A**, w której nowo utworzone dwie grupy amidowe są umieszczone w pozycji *para* i *meta* do wiązania C-C pomiędzy pierścieniami **A-2Hyd** (Rys. 37).

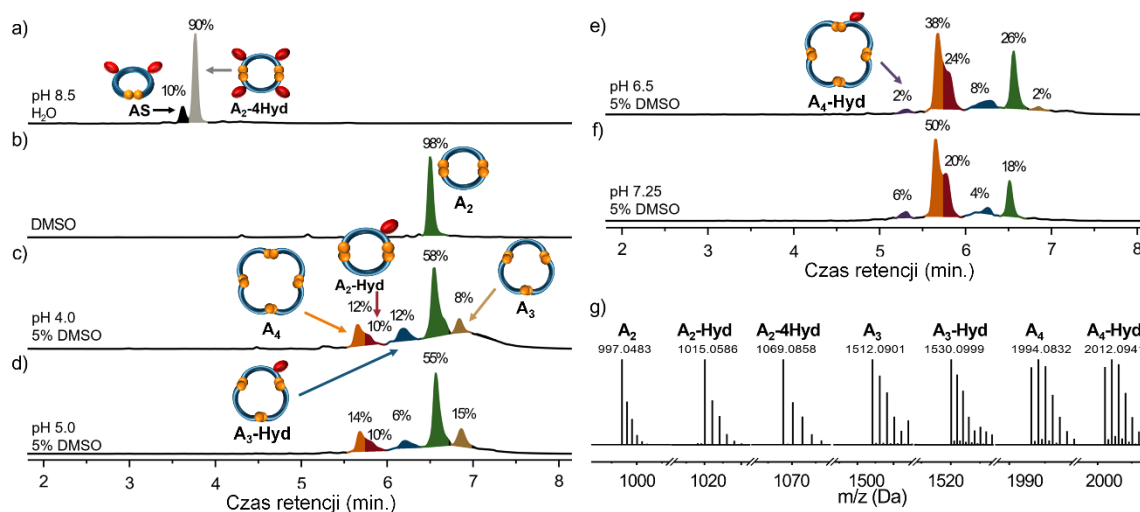


Rys. 37. a) Schemat asymetrycznej hydrolizy **A** do **A-2Hyd**, b) widmo ¹H NMR **A-2Hyd** (300 MHz, 298K, DMSO-d₆), c) widmo COSY **A-2Hyd**

Analiza widm ¹H i COSY wyraźnie wykazała obecność pary sygnałów amidowych N-H ($\delta = 8,83$ i $\delta = 8,75$ p.p.m.) sprzężonych z parą sygnałów metinowych C-H cysteiny. Tymczasem intuicja chemiczna podpowiada, że należałoby oczekiwać produktu symetrycznego z podwójną konfiguracją *meta* lub *para*. Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą taka kierunkowa hydroliza nie została wcześniej odnotowana dla pochodnych BPDA.

Ta nieoczekiwanie czysta i selektywna reakcja może być użytecznym narzędziem syntetycznym oraz inspirować do projektowania nowych bloków budulcowych.

Aby sprawdzić, jak ta nowa właściwość **A-2Hyd** wpływa na tworzenie się disulfidów, utleniono nowy roztwór **A** o pH 8,5. Po trzech dniach reakcji z ekspozycją na powietrze, przeprowadzono analizę LC-MS. Mieszanina poreakcyjna zawierała głównie jeden produkt (90%), który został zidentyfikowany przez ESI-MS jako monoprotonowany kation $[M + H]^+$ odpowiadający masie cyklicznego dimeru z dwoma wiązaniami disulfidowymi (**A₂-4Hyd**) powstałego z dwóch cząsteczek **A-2Hyd**. Drugi produkt **AS** (10%) został zidentyfikowany jako pochodna **A-2Hyd** zamknięta w strukturę cykliczną poprzez pojedyncze wewnątrzcząsteczkowe wiązanie disulfidowe (Rys. 38a).



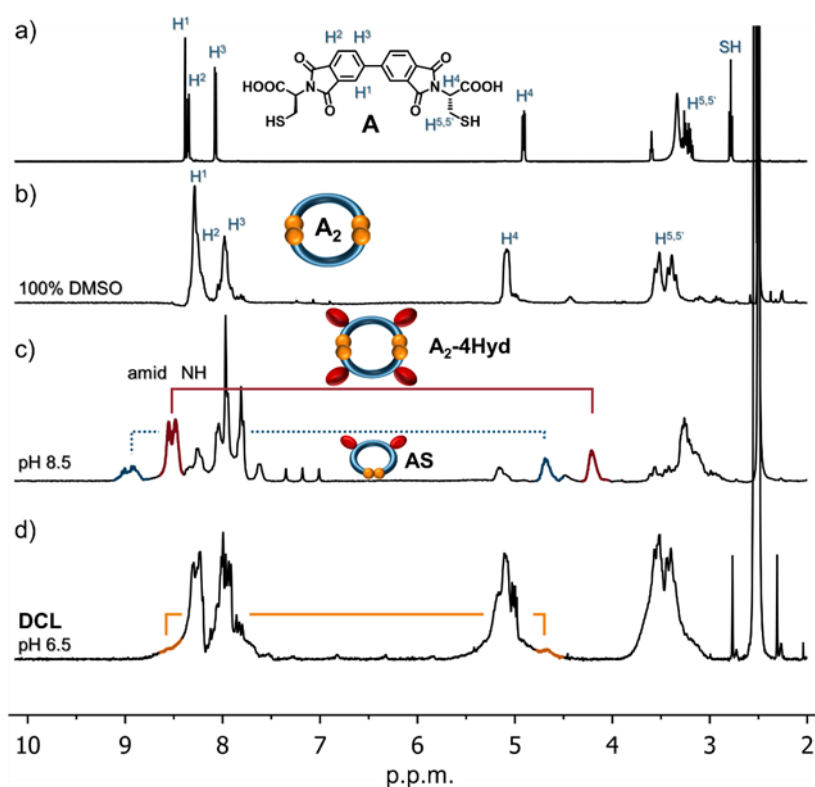
Rys. 38. a-f) Chromatogramy HPLC (254 nm) 3-dniowych DCL z **A** w różnych warunkach stężenia DMSO i pH. Rozkład materiału z każdej biblioteki jest przedstawiony jako wartości procentowe obok odpowiednich pików (RPA). Kolor pików wskazuje dany makrocykl. g) Widma masowe HR-MS makrocykli

Na podstawie tych wyników zdecydowano się zastosować kontrolę układu poprzez dobór pH i dodatek DMSO jako akceleratora utleniania tioli⁹⁴. Aby znaleźć odpowiednie warunki reakcji, zbadano wpływ stężenia tak DMSO, jak i pH, bazując na buforze z octanu amonu.

Stało się jasne, że największy wpływ na dystrybucję produktów w DCL ma pH. W prezentowanym układzie najciekawsze wyniki występują dla pH 6,5 i 7,25, co odpowiada optymalnym warunkom utleniania tioli⁹⁵. Zastosowanie 5% roztworu DMSO w buforze z octanu amonu o pH 6,5 zapewnia znacznie lepsze warunki utleniania tioli niż pH 8,5 i powietrze. W toku dalszych badań okazało się, że stężenie DMSO

ma jednak drugorzędne znaczenie, ponieważ nie zaobserwowano żadnych znaczących zmian w składzie biblioteki (pH 6,5) w zakresie 5-50% DMSO. Zastosowanie tej metody z odpowiednim pH i 5% dodatkiem DMSO jako akcelerorem utleniania zaowocowało wieloskładnikową biblioteką. Na podstawie analizy LC-MS stwierdzono, że w większości przypadków (pH 5,0-7,25) powstawała DCL sześciu produktów, które zidentyfikowano jako makrocykliczne dimery, trimery i tetramery (Rys. 38a-g). Trzy ze zidentyfikowanych związków posiadają masy odpowiadające hydrolyzie jednej z grup imidowych w strukturze całego makrocyklu (**A₂-Hyd**, **A₃-Hyd** i **A₄-Hyd**).

Ze względu na znaczne podobieństwo w polarności składników biblioteki, pomimo wielu prób nie udało się wyizolować analitycznych ilości poszczególnych produktów. Dlatego zdecydowano się wyodrębnić całą DCL, poprzez odparowanie mieszaniny poreaakcyjnej do sucha i zbadanie tak otrzymanego materiału techniką NMR (Rys. 39).

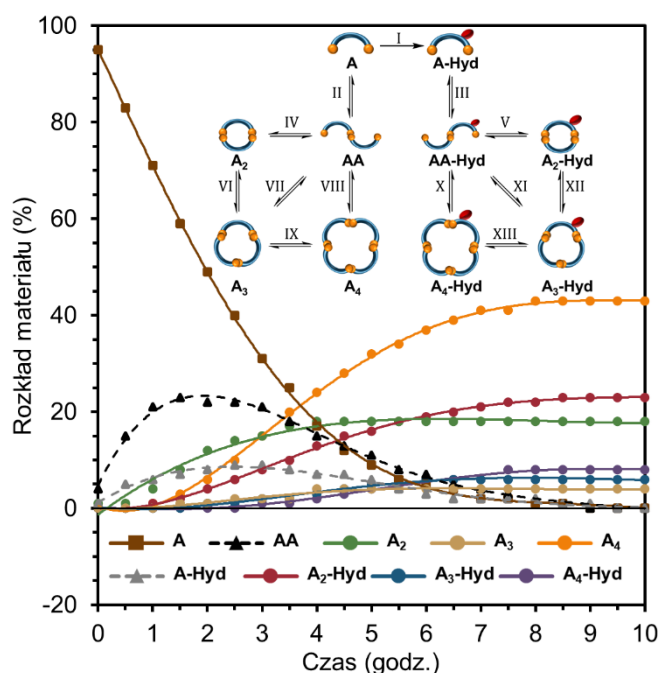


Rys. 39. Porównanie widm ^1H NMR (300 MHz, 298K, DMSO-d_6): a) **A**, b) **A₂**, c) **A₂-4Hyd** (zanieczyszczona **AS**), d) mieszanina **DCL**. Kolorowe klamry przedstawiają sprzężone sygnały N-H z sygnałami C-H na podstawie widm COSY

Na widmie ^1H NMR **A₂** są widoczne charakterystyczne przesunięcia sygnałów aromatycznych w górę pola oraz przesunięcia alifatycznych sygnałów CH i CH_2 w dół

pola. Brak jakichkolwiek sygnałów amidowych wskazuje na to, że nie zaszła tam hydroliza. Widmo ^1H NMR DCL zawiera znacznie więcej sygnałów w porównaniu z widmami **A** i **A₂** co wskazuje na utratę symetrii produktów trimerycznych i tetramerycznych. W widmie COSY obserwuje się subtelne sprzężenia sygnałów N-H z sygnałami C-H (podobne do **A₂-Hyd**). Jest to dodatkowy dowód na obecność amidów w strukturach niektórych monohydrolizowanych makrocycli w DCL.

Następnie postanowiono monitorować przebieg reakcji DCL w czasie za pomocą HPLC. Próbkę analizowano co 30 minut przez 24 godziny w temperaturze pokojowej (1 ml, pH 6,5, 5% DMSO, 5 mM **A**). Pierwszy nastrzyk (t_0) wykonano natychmiast po rozpuszczeniu się **A** w buforze reakcyjnym. Na podstawie integracji względnych powierzchni pików (RPA) z zebranych chromatogramów wykreślono krzywe dystrybucji poszczególnych produktów od czasu trwania reakcji (Rys. 40).

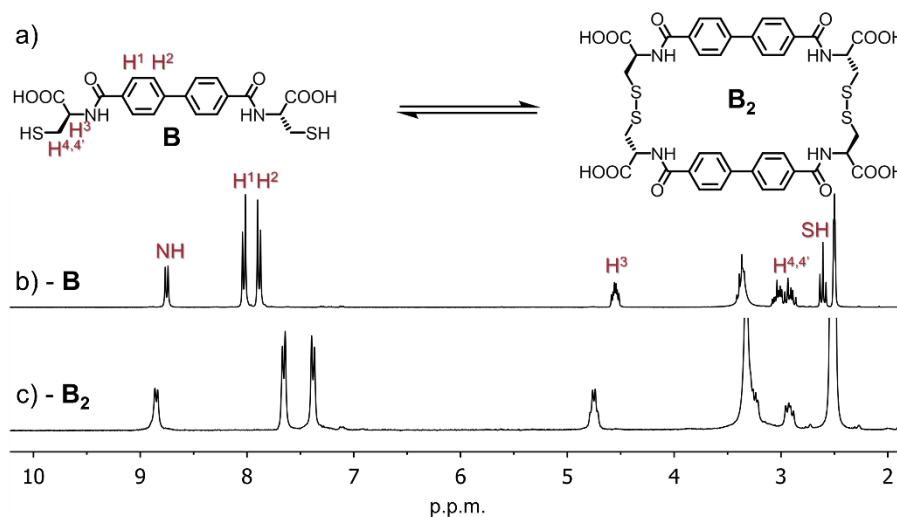


Rys. 40. Krzywe rozkładu składników DCL w czasie przy pH 6,5 (substraty i produkty) oraz schemat kluczowych reakcji

Zaobserwowano, że układ osiąga równowagę termodynamiczną już po ok. 10 godz. Na tej podstawie można wyciągnąć kilka wstępnych wniosków dotyczących kinetyki tego złożonego procesu i jego mechanizmu. Po pierwsze substrat **A** (Rys. 40, krzywa brązowa) nieodwracalnie hydrolizuje do **A-Hyd** (reakcja I, krzywa szara) i osiąga zawartość 10% po ok. 1 godz. Jednocześnie **A** dimeryzuje do liniowego związku

pośredniego **AA** (reakcja II, krzywa czarna) z pojedynczym wiązaniem S-S i osiąga maksymalną zawartość 20% po ok. 1,5 godz. Następnie **AA** ulega cyklizacji wewnątrzcząsteczkowej do makrocyklicznego **A₂** (reakcja IV, krzywa zielona). Można założyć, że synteza większych makrocykli **A₃** (krzywa złota) i **A₄** (krzywa żółta) zależy od obecności **AA** i **A₂** (reakcje VI-IX), ponieważ pojawiają się one w mieszaninie dopiero po dwóch godzinach. W otrzymanych danych HPLC-MS nie znaleziono śladów oczekiwanych liniowych związków pośrednich **AAA** i **AAAA**. Jednakże związki pośrednie **AAA** i **AAAA** wydają się być oczywistym krokiem w procesach wydłużania łańcucha i zamykania pierścienia. Dlatego należy przyjąć, że związki te powstają w mieszaninie z mniejszych cząsteczek (**A** i **AA**) i są natychmiast zużywane w reakcji cyklizacji do produktów makrocyklicznych (**A₃** i **A₄**). Podobne wyniki zaobserwowano dla monohydrolizowanych makrocykli, których formowanie wydaje się silnie zależne od stężenia **A-Hyd**. **A-Hyd** reaguje z dostępnym substratem **A** i tworzy związek pośredni **AA-Hyd** (reakcja III), który jest szybko międzycząsteczkowo cyklizowany do głównego monohydrolizowanego makrocyklu **A₂-Hyd** (reakcja V, krzywa czerwona). Synteza **A₃-Hyd** (krzywa niebieska) i **A₄-Hyd** (krzywa fioletowa) może przebiegać różnymi drogami (reakcje X-XIII). Niskie stężenie nieparzystych produktów (**A₃**, **A₃-Hyd**) jest prawdopodobnie spowodowane wysokim stężeniem parzystomerycznych produktów pośrednich **AA**, które wymuszają tworzenie parzystomerycznych produktów makrocyklicznych. Można również zaobserwować, że przyspieszone przez DMSO utlenianie i hydroliza imidów przebiegały równolegle z niewielką przewagą utleniania w ciągu pierwszych dwóch godzin. Potwierdza to główną hipotezę tej pracy, że obie reakcje zachodzą ortogonalnie podczas całego procesu równowagowania DCL.

Wykazano zatem, że zastosowanie komponentu **A** daje DCL niezwykle właściwości i umożliwia tworzenie się wielocząsteczkowych dynamicznych makrocykli. Aby udowodnić, że właściwości opisywanego układu zależą od hydrolizy imidów, a nie od bifenylovej struktury komponentu **A**, przeprowadzono eksperyment kontrolny. Zsyntezowano nowy komponent **B** na bazie zmodyfikowanego kwasu bifenylo-4,4'-dikarboksylowego z dwoma resztami cysteinowymi (Rys. 41).



Rys. 41. a) Schemat syntezy dimerycznego makrocyklu **B**₂ i porównanie widm ¹H NMR (300 MHz, 298K, DMSO-d₆), b) **B** i c) **B**₂

Związek ten jest liniowy i nie zawiera grup imidowych, lecz poza tym jest analogiczny strukturalnie do komponentu **A**. Wszystkie eksperymenty, które wykonano wcześniej z **A**, powtórzono z **B**. We wszystkich opisanych wyżej warunkach pH i DMSO w wyniku utleniania otrzymano wyłącznie cykliczny dimer **B**₂ (Rys. 41). Eksperymenty te jednoznacznie potwierdziły korelację między obecnością grup imidowych a aktywnością komponentu **A**.

Pełen opis powyższego projektu został przedstawiony w pracy D4 (str. 179) i w Informacjach Uzupelniających S4 (str. 187) dołączonych do tej rozprawy.

Konopka M., Stefankiewicz A.R., *Expanding structural diversity in a library of disulfide macrocycles through in-situ imide hydrolysis*, *Scientific Reports*, **2022**, 12, 38.

8 PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Celem naukowym tej pracy doktorskiej była synteza i analiza nowych architektur makrocyclicznych i klatkowych zawierających odwracalne wiązania disulfidowe o określonych właściwościach.

W pracy D1 przedstawiono oryginalny układ pięciu dimerycznych klatek molekularnych rozpuszczalnych w wodzie opartych o wiązania disulfidowe, które otrzymano z odpowiednio zaprojektowanych tritiolowych bloków budulcowych o symetrii C_3 . Każda z klatek została wyizolowana i w pełni scharakteryzowana spektroskopowo. Przedstawiono selektywną metodę syntezy i analizy trzech homodimerycznych klatek molekularnych. Wykazano, że spośród licznych możliwych produktów kombinatorycznych, w układach z mieszanymi parami komponentów powstają wyłącznie trzy struktury klatkowe, dwie homo- i jedna heterodimeryczna. Otrzymano dwie heterodimeryczne klatki, które zostały wyizolowane z mieszaniny i w pełni scharakteryzowane. Zaprezentowano także oryginalne badania kinetyczno-mechanistyczne, które dały wgląd w mechanizm formowania się klatek dimerycznych z tritiolowych komponentów. Wcześniej jedynie domniemywano przebieg tego procesu, a opisane w tej pracy badania go potwierdziły. Dodatkowo przedstawiono wstępne dowody na potencjał aplikacyjny otrzymanych układów. Mogą one zostać wykorzystane jako fluorescencyjne sensory wybranych lantanowców lub substrat do otrzymywania nierozpuszczalnych w wodzie fluorescencyjnych materiałów organiczno-metalicznych.

W pracy D2 zaprezentowano i w pełni scharakteryzowano dwie nowe podwójnie dynamiczne, wieloskładnikowe klatki molekularne. Pokazano oryginalną metodę syntetycznej modyfikacji bloku budulcowego przy użyciu wiązania amidowego. Wprowadzenie dodatkowej grupy bocznej do komponentu spowodowało zmianę rozpuszczalności całej architektury klatkowej i umożliwiło rezygnację z dotychczasowego uciążliwego układu reakcyjnego. Uzyskana w ten sposób kontrola rozpuszczalności umożliwiła wprowadzenie klatek do chloroformu i wody, co znacznie rozszerzyło możliwości zastosowania tych klatek. Przedstawiono także dowody na to, że wprowadzone modyfikacje nie wpływają na selektywny proces formowania się klatek molekularnych w tym układzie. Zmodyfikowane klatki zachowały swoje właściwości fluorescencyjne, a w przypadku jednej z nich intensywność fluorescencji wzrosła.

W pracy D3 przedstawiono zastosowanie syntezy mikrofalowej do efektywnego otrzymywania zróżnicowanej rodziny symetrycznych diimidów opartych na trzech

strukturalnie odmiennych rdzeniach aromatycznych i pięciu różnych α -aminokwasach. W toku badań dowiedziono, że syntezy te są równie wydajne pod wysokim ciśnieniem (mała skala), jak i w otwartych naczyniach pod ciśnieniem atmosferycznym (duża skala). Reakcje przebiegają bez racemizacji aminokwasów i prowadzą do enancjomerycznie czystych produktów. Krótkie czasy reakcji, łatwa izolacja i wysoka wydajność sprawiają, że opracowana metoda jest niezwykle użytecznym narzędziem do otrzymywania nowych wielofunkcyjnych bloków budulcowych.

W pracy D4 zaprezentowano oryginalny sposób stymulacji dynamicznej biblioteki disulfidów na drodze hydrolizy imidów *in situ*. Wykazano, że odpowiednio zaprojektowany ditiolowy blok budulcowy, który zawiera w swojej strukturze dwa pięcioczłonowe pierścienie imidowe, poprzez ich hydrolizę w warunkach zasadowych może efektywnie promować formowanie nowych produktów disulfidowych. W pracy zaprezentowano także nową metodę modyfikowania składu strukturalnego DCL przez dobieranie odpowiedniego pH i stężenia DMSO, które jest akceleratorem utleniania tioli. Wykazano, że zmiana pH mieszaniny reakcyjnej pozwala kontrolować szybkość hydrolizy grup imidowych, co wpływa na różnorodność strukturalną i dystrybucję produktów w bibliotece dynamicznej. Przeprowadzone badania kinetyczne dały wgląd w złożony mechanizm reakcji tego skomplikowanego procesu.

Podsumowując, w toku przeprowadzonych badań zaprezentowano szereg oryginalnych architektur makrocyklicznych i klatkowych opartych o dynamiczne wiązania disulfidowe. W układach tych uzyskano kontrolę nad rozpuszczalnością, architekturą i różnorodnością strukturalną produktów w DCL. Opracowano także szybką i wydajną metodę syntezy mikrofalowej, która może być użytecznym narzędziem w otrzymywaniu nowych wielofunkcyjnych diimidowych bloków budulcowych.

9 CYTOWANA LITERATURA

1. P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J. L. Wietor, J. K. M. Sanders and S. Otto, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 3652-3711.
2. J. M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 151-160.
3. S. Sobczak, W. Drożdż, G. I. Lampronti, A. M. Belenguer, A. Katrusiak and A. R. Stefankiewicz, *Chem. Eur. J.*, 2018, **24**, 8769-8773.
4. L. A. Ingerman and M. L. Waters, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 111-117.
5. U. F. Fritze and M. von Delius, *Chem. Comm.*, 2016, **52**, 6363-6366.
6. A. M. Valdivielso, F. Puig-Castellví, J. Atcher, J. Solà, R. Tauler and I. Alfonso, *Chem.: Eur. J.*, 2017, **23**, 10789-10799.
7. K. Wang, C. C. Yee and H. Y. Au-Yeung, *Chem Sci*, 2016, **7**, 2787-2792.
8. F. B. L. Cougnon, N. A. Jenkins, G. D. Pantoş and J. K. M. Sanders, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, **51**, 1443-1447.
9. L. Tapia, Y. Perez, M. Bolte, J. Casas, J. Sola, R. Quesada and I. Alfonso, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, **58**, 12465-12468.
10. M. E. Dehkordi, V. Luxami and G. D. Pantoş, *J. Org. Chem.*, 2018, **83**, 11654-11660.
11. C. D. Meyer, R. S. Forgan, K. S. Chichak, A. J. Peters, N. Tangchaivang, G. W. Cave, S. I. Khan, S. J. Cantrill and J. F. Stoddart, *Chem. - Eur. J.*, 2010, **16**, 12570-12581.
12. M. Kołodziejcki, A. R. Stefankiewicz and J.-M. Lehn, *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 1836-1843.
13. J. W. Nial, R. B. Craig, J. G. Collins, K. Sharon and R. A.-W. Janice, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2007, **7**, 627-648.
14. C. Bravin, A. Guidetti, G. Licini and C. Zonta, *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 3523-3528.
15. G. Markiewicz, A. Jenczak, M. Kołodziejcki, J. J. Holstein, J. K. M. Sanders and A. R. Stefankiewicz, *Nat. Commun.*, 2017, **8**, 15109.
16. S. Durot, J. Taesch and V. Heitz, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 8542-8578.
17. H. Jędrzejewska and A. Szumna, *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 4412-4421.
18. S. Ulrich, *Acc. Chem. Res.*, 2019, **52**, 510-519.
19. S. Otto, R. L. Furlan and J. K. Sanders, *Drug Discov. Today*, 2002, **7**, 117.
20. Y. Zhang, Y. Qi, S. Ulrich, M. Barboiu and O. Ramström, *Mater. Chem. Front.*, 2020, **4**, 489-506.
21. M. Mondal and A. K. H. Hirsch, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 2455-2488.
22. N. Roy, B. Bruchmann and J. M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 3786-3807.
23. J.-M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54**, 3276-3289.
24. N. Laroui, M. Coste, L. Lichon, Y. Bessin, M. Gary-Bobo, G. Pratviel, C. Bonduelle, N. Bettache and S. Ulrich, *Int. J. Pharm.*, 2019, **569**, 118585.
25. V. Goral, M. I. Nelen, A. V. Eliseev and J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, **98**, 1347.
26. S. Lascano, K.-D. Zhang, R. Wehlauch, K. Gademann, N. Sakai and S. Matile, *Chem. Sci.*, 2016, **7**, 4720-4724.
27. W. Drożdż, C. Bouillon, C. Kotras, S. Richeter, M. Barboiu, S. Clement, A. R. Stefankiewicz and S. Ulrich, *Chem. Eur. J.*, 2017, **23**, 18010-18018.
28. R. J. Cremllyn and R. J. W. Cremllyn, *An Introduction to Organosulfur Chemistry*, Wiley, 1996.
29. M. Kirihara, J. Yamamoto, T. Noguchi and Y. Hirai, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 1180-1183.
30. H. Firouzabadi, N. Iranpoor and M. Abbasi, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 508-509.
31. J. K. Vandavasi, W.-P. Hu, C.-Y. Chen and J.-J. Wang, *Tetrahedron*, 2011, **67**, 8895-8901.
32. N. Taniguchi, *Tetrahedron*, 2017, **73**, 2030-2035.
33. W. Wang, Y. Lin, Y. Ma, C.-H. Tung and Z. Xu, *Org. Lett.*, 2018, **20**, 3829-3832.
34. K. Görmer, H. Waldmann and G. Triola, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 1811-1813.
35. L. Stryer, J. Berg, J. Tymoczko and G. Gatto, *Biochemistry*, Macmillan Learning, 2019.

36. C. S. Sevier and C. A. Kaiser, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002, **3**, 836-847.
37. A. Krężel and W. Bal, *Org. Biomol. Chem.*, 2003, **1**, 3885-3890.
38. D. Luo, S. W. Smith and B. D. Anderson, *J. Pharm. Sci.*, 2005, **94**, 304-316.
39. R. Singh and G. M. Whitesides, in *Sulphur-Containing Functional Groups*, eds. P. Saul and R. Zvi, 1993, DOI: 10.1002/9780470034408.ch13, ch. 13, pp. 633-658.
40. S. R. Beeren, M. Pittelkow and J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 7359-7361.
41. M. Trujillo, B. Alvarez and R. Radi, *Free Radic. Res.*, 2016, **50**, 150-171.
42. S. Otto, R. L. E. Furlan and J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 12063-12064.
43. S. P. Black, J. K. M. Sanders and A. R. Stefankiewicz, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 1861-1872.
44. S. Otto, R. L. E. Furlan and J. K. M. Sanders, *Science*, 2002, **297**, 590.
45. R. T. Lam, A. Belenguer, S. L. Roberts, C. Naumann, T. Jarrosson, S. Otto and J. K. Sanders, *Science*, 2005, **308**, 667-669.
46. K. R. West, K. D. Bake and S. Otto, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 2615-2618.
47. R. Pérez-Fernández, M. Pittelkow, A. M. Belenguer, L. A. Lane, C. V. Robinson and J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.*, 2009, -, 3708-3710.
48. A. R. Stefankiewicz, M. R. Sambrook and J. K. M. Sanders, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 2326.
49. F. Ulatowski, A. Sadowska-Kuzioła and J. Jurczak, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**, 9762-9770.
50. P. Muller, *Pure Appl. Chem.*, 1994, **66**, 1077-1184.
51. D. Chandler, *Nature*, 2005, **437**, 640-647.
52. W. Blokzijl and J. B. F. N. Engberts, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1993, **32**, 1545-1579.
53. S. Otto and J. B. F. N. Engberts, *Org. Biomol. Chem.*, 2003, **1**, 2809-2820.
54. K. Lum, D. Chandler and J. D. Weeks, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 4570-4577.
55. W. M. Nau, M. Florea and K. I. Assaf, *Isr. J. Chem.*, 2011, **51**, 559-577.
56. M. Al Kobaisi, S. V. Bhosale, K. Latham, A. M. Raynor and S. V. Bhosale, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 11685-11796.
57. P. Pengo, G. D. Pantos, S. Otto and J. K. Sanders, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 7063-7066.
58. K. Tambara, N. Ponnuswamy, G. Hennrich and G. D. Pantoş, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 3338-3347.
59. H. Y. Au-Yeung, G. Dan Pantos and J. K. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 16030-16032.
60. A. R. Stefankiewicz and J.-M. Lehn, *Chem.: Eur. J.*, 2009, **15**, 2500-2503.
61. H. Y. Au-Yeung, G. D. Pantoş and J. K. M. Sanders, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 5331-5334.
62. K. R. West, R. F. Ludlow, P. T. Corbett, P. Besenius, F. M. Mansfeld, P. A. G. Cormack, D. C. Sherrington, J. M. Goodman, M. C. A. Stuart and S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 10834.
63. N. Ponnuswamy, F. B. L. Cougnon, J. M. Clough, G. D. Pantoş and J. K. M. Sanders, *Science*, 2012, **338**, 783-785.
64. N. Ponnuswamy, F. B. L. Cougnon, G. D. Pantoş and J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 8243-8251.
65. R. S. Forgan, J. J. Gassensmith, D. B. Cordes, M. M. Boyle, K. J. Hartlieb, D. C. Friedman, A. M. Slawin and J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 17007-17010.
66. N. Ponnuswamy, G. D. Pantoş, M. M. J. Smulders and J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 566-573.
67. R. A. R. Hunt, R. F. Ludlow and S. Otto, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 5110-5113.
68. S. Otto, *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**, 2200-2210.
69. J. M. A. Carnall, C. A. Waudby, A. M. Belenguer, M. C. A. Stuart, J. J. P. Peyralans and S. Otto, *Science*, 2010, **327**, 1502.
70. J. Li, J. M. A. Carnall, M. C. A. Stuart and S. Otto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 8384-8386.
71. B. Bartolec, M. Altay and S. Otto, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 13096-13098.
72. D. Komáromy, M. C. A. Stuart, G. Monreal Santiago, M. Tezcan, V. V. Krasnikov and S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 6234-6241.
73. Y. Altay, M. Altay and S. Otto, *Chem. - Eur. J.*, 2018, **24**, 11911-11915.

74. N.-M. Phan, E. G. Percástegui and D. W. Johnson, *ChemPlusChem*, 2020, **85**, 1270-1282.
75. M. S. Collins, N.-M. Phan, L. N. Zakharov and D. W. Johnson, *Inorg. Chem.*, 2018, **57**, 3486-3496.
76. N.-M. Phan, E. P. K. L. Choy, L. N. Zakharov and D. W. Johnson, *Chem. Commun.*, 2019, **55**, 11840-11843.
77. R. Caraballo, M. Rahm, P. Vongvilai, T. Brinck and O. Ramström, *Chem. Commun.*, 2008, DOI: 10.1039/B815710C, 6603-6605.
78. A. M. Belenguer, T. Friščić, G. M. Day and J. K. M. Sanders, *Chem. Sci.*, 2011, **2**, 696-700.
79. A. M. Belenguer, G. I. Lampronti, D. J. Wales and J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 16156-16166.
80. J. Li, I. Cvrtila, M. Colomb-Delsuc, E. Otten and S. Otto, *Chem. - Eur. J.*, 2014, **20**, 15709-15714.
81. F. Beuerle and B. Gole, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, **57**, 4850-4878.
82. G. Zhang and M. Mastalerz, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 1934-1947.
83. M. A. Little, J. Donkin, J. Fisher, M. A. Halcrow, J. Loder and M. J. Hardie, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, **51**, 764-766.
84. Y.-C. Horng, T.-L. Lin, C.-Y. Tu, T.-J. Sung, C.-C. Hsieh, C.-H. Hu, H. M. Lee and T.-S. Kuo, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, **2009**, 1511-1514.
85. J. Solà, M. Lafuente, J. Atcher and I. Alfonso, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 4564-4566.
86. M. Lafuente, I. Alfonso and J. Solà, *ChemSystemsChem*, 2019, **1**, 25-31.
87. D. A. Shultz and M. A. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 6311-6320.
88. F. Wurthner, C. R. Saha-Moller, B. Fimmel, S. Ogi, P. Leowanawat and D. Schmidt, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 962-1052.
89. Q. Zheng, J. Huang, A. Sarjeant and H. E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 14410-14411.
90. T. Abdinejad, M. R. Zamanloo, T. Alizadeh and N. O. Mahmoodi, *Dyes Pigments*, 2017, **146**, 203-209.
91. J. C. Sheehan, D. W. Chapman and R. W. Roth, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 3822-3825.
92. S. K. Hasan and S. A. Abbas, *Can. J. Chem.*, 1975, **53**, 2450-2453.
93. M. N. Khan and A. A. Khan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1979, -, 796-798.
94. J. Atcher and I. Alfonso, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 25605.
95. P. Nagy, *Antioxid. Redox Signal.*, 2012, **18**, 1623-1641.

Poznań, 17.01.2022

mgr Marcin Konopka
Zakład Syntezy Nanostruktur Funkcjonalnych
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8,
61-614 Poznań

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższych artykułach:

1. Konopka M., Stefankiewicz A. R., *Expanding structural diversity in a library of disulfide macrocycles through in-situ imide hydrolysis*, Scientific Reports, **2022**, 12, 38.
2. Konopka M., Cecot P., Harrowfield J. M., Stefankiewicz A.R., *Structural self-sorting of pseudopeptide homo and heterodimeric disulfide cages in water: mechanistic insights and cation sensing*, Journal of Materials Chemistry C, **2021**, 9, 7607-7614.
3. Konopka M., Cecot P., Ulrich S., Stefankiewicz A.R., *Tuning the Solubility of Self-Assembled Fluorescent Aromatic Cages Using Functionalized Amino Acid Building Blocks*, Frontiers in Chemistry, **2019**, 7, (503).
4. Konopka M., Markiewicz G., Stefankiewicz A. R., *Highly efficient one-step microwave-assisted synthesis of structurally diverse bis-substituted α -amino acid derived diimides*, RSC Advances, **2018**, 8, 29840-29846.

mój własny udział obejmował:

- we wszystkich pracach:
 - Synteza organiczna i charakteryzacja spektroskopowa wszystkich komponentów
 - Rejestracja i interpretacja widm NMR
 - Opracowanie wyników danych eksperymentalnych
 - Przygotowanie grafik do manuskryptów
 - Współudział w przygotowaniu koncepcji pracy
 - Współudział w przygotowaniu manuskryptu
 - Współudział w korespondencji z edytorem i recenzentami
- w pracach nr 1, 2 i 3:
 - Zaplanowanie i wykonanie eksperymentów DCC
 - Rejestracja i interpretacja widm UV-Vis, Fluorescencji, HPLC
 - Opracowanie i wykonanie pomiarów czasowo-zależnych HPLC
- w pracy nr 4:
 - Synteza mikrofalowa komponentów
 - Optymalizacja warunków metody syntezy


.....
mgr Marcin Konopka

Poznań, 24.01.2022 r.

Prof. dr hab. Artur R. Stefankiewicz
Zakład Syntezy Nanostruktur Funkcjonalnych
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8,
61-614 Poznań


OŚWIADCZENIE PROMOTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższych artykułach:

1. Konopka M., Stefankiewicz A. R., *Expanding structural diversity in a library of disulfide macrocycles through in-situ imide hydrolysis*, Scientific Reports, **2022**, 12, 38.
2. Konopka M., Cecot P., Harrowfield J. M., Stefankiewicz A.R., *Structural self-sorting of pseudopeptide homo and heterodimeric disulfide cages in water: mechanistic insights and cation sensing*, Journal of Materials Chemistry C, **2021**, 9, 7607-7614.
3. Konopka M., Cecot P., Ulrich S., Stefankiewicz A.R., *Tuning the Solubility of Self-Assembled Fluorescent Aromatic Cages Using Functionalized Amino Acid Building Blocks*, Frontiers in Chemistry, **2019**, 7, (503).
4. Konopka M., Markiewicz G., Stefankiewicz A. R., *Highly efficient one-step microwave-assisted synthesis of structurally diverse bis-substituted α -amino acid derived diimides*, RSC Advances, **2018**, 8, 29840-29846.

Byłem bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pracy doktorskiej mgra Marcina Konopki, a mój własny udział obejmował:

- Współdział w opracowaniu koncepcji badawczej i zaplanowaniu pracy
- Współdział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników
- Współdział w przygotowaniu manuskryptów oraz korespondencja z edytorem i recenzentami


Prof. dr hab. Artur R. Stefankiewicz



Poznań, dnia 17.01.2022

dr Grzegorz Markiewicz
Laboratorium Nanostruktur Funkcjonalnych
e-mail: grzegorz.markiewicz@amu.edu.pl

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Niniejszym oświadczam, że w artykule:

Konopka M., Markiewicz G., Stefankiewicz A. R., *Highly efficient one-step microwave-assisted synthesis of structurally diverse bis-substituted α -amino acid derived diimides*, *RSC Advances*, **2018**, *8*, 29840-29846.

mój udział obejmował:

- Współdział w opracowaniu koncepcji pracy
- Współdział w syntezie mikrofalowej komponentów
- Współdział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników
- Współdział w przygotowaniu grafik do manuskryptu
- Współdział w przygotowaniu manuskryptu
- Współdział w korespondencji z edytorem i recenzentami


.....
dr Grzegorz Markiewicz

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 10, 61-614 Poznań

www.wczt.pl

strona 1 z 1

Poznań, 17.01.2022

mgr Piotr Cecot
Zakład Syntezy Nanostruktur Funkcjonalnych
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8,
61-614 Poznań

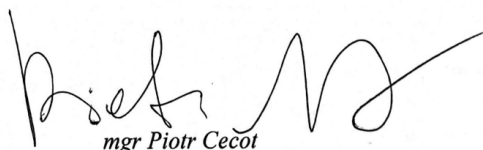
OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Niniejszym oświadczam, że w poniższych artykułach:

- Konopka M., Cecot P., Ulrich S., Stefankiewicz A.R., *Tuning the Solubility of Self-Assembled Fluorescent Aromatic Cages Using Functionalized Amino Acid Building Blocks*, *Frontiers in Chemistry*, **2019**, 7, (503).
- Konopka M., Cecot P., Harrowfield J. M., Stefankiewicz A.R., *Structural self-sorting of pseudopeptide homo and heterodimeric disulfide cages in water: mechanistic insights and cation sensing*, *Journal of Materials Chemistry C*, **2021**, 9, 7607-7614.

mój własny udział obejmował:

- Wykonanie optymalizacji wybranych struktur i wykonanie obliczeń DFT
- Współdziałanie w analizie i interpretacji uzyskanych wyników obliczeniowych
- Współdziałanie w przygotowaniu manuskryptów do publikacji



mgr Piotr Cecot

Strasbourg, 16/08/2021

Prof. Jack M. Harrowfield
Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires,
Université de Strasbourg,
8 allée Gaspard Monge,
67083 Strasbourg

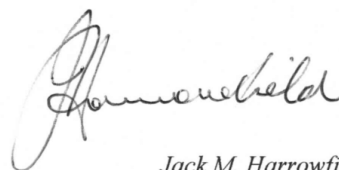
DECLARATION

I hereby declare that in the following paper:

Konopka M., Cecot P., Harrowfield J. M., Stefankiewicz A.R., *Structural self-sorting of pseudopeptide homo and heterodimeric disulfide cages in water: mechanistic insights and cation sensing*, Journal of Materials Chemistry C, **2021**, 9, 7607-7614.

my own contribution includes:

- co-interpreting results and data analysis
- co-authoring and revision of the manuscript



Jack M. Harrowfield

Montpellier, 10/05/2021

Dr Sébastien Ulrich
Institut des Biomolécules Max Mousseron
Université de Montpellier

DECLARATION

I hereby declare that in the following paper:

Konopka M., Cecot P., Ulrich S., Stefankiewicz A.R., *Tuning the Solubility of Self-Assembled Fluorescent Aromatic Cages Using Functionalized Amino Acid Building Blocks*, *Frontiers in Chemistry*, **2019**, 7, (503)

my own contribution includes:

- co-development of the research objectives
- co-interpreting and data analysis
- co-authoring and revision of the manuscript

Sébastien Ulrich



Cite this: *J. Mater. Chem. C*, 2021,
9, 7607**Structural self-sorting of pseudopeptide homo
and heterodimeric disulfide cages in water:
mechanistic insights and cation sensing†**Marcin Konopka,^{ab} Piotr Cecot,^{ab} Jack M. Harrowfield ^c and
Artur R. Stefankiewicz ^{*ab}

The molecular components of biological systems self-sort via different mechanisms to act in a cooperative manner and to avoid interfering with each other. Herein we describe mechanistic insights and a versatile strategy for the synthesis of water-soluble, pseudopeptide molecular cages based on disulfide bonds. The use of trifunctional thiols led to a dynamic combinatorial library (DCL) of readily isolable, multi-component homo and hetero cage-like architectures showing a degree of self-sorting related to the symmetry and size of the trithiol. The work provided detailed kinetic studies and DFT molecular modeling giving original insights into the disulfide cages' properties. We also applied the selected cage system in the fluorometric detection of La³⁺ cations, which led to the generation of a strongly luminescent metal–organic assembly.

Received 29th March 2021,
Accepted 12th May 2021

DOI: 10.1039/d1tc01445e

rsc.li/materials-c

Introduction

The synthesis of functional molecular cages continues to pose an intriguing challenge due to the numerous applications of such structures¹ as chemical receptors,^{2–4} nanocapsules for molecular transport,^{5–7} or in molecular recognition.⁸ Despite enormous progress in the development of this type of architecture,^{9–12} examples of stable, yet dynamic and water-soluble structures are still very scarce.^{13–16} Dynamic combinatorial chemistry (DCC) of disulfides is an effective approach to generate artificial biocompatible systems in water.^{17,18} Disulfides have been extensively studied with linear,^{19,20} macrocyclic^{21–25} or interlocked topologies^{26–31} but far less is known about disulfide cages. To date, several examples have been reported of disulfide cages based on trifunctional thiols,^{32–35} although only a few are water-soluble.^{36–39} There is a real lack of information regarding the impact of the thiol component structure on the tendency of dynamic system to favor exclusive formation of cage-like structures through self-assembly and self-sorting in water-soluble systems.^{40–42} Hetero-component cages seem to be particularly understudied, a situation, which is probably due to the difficulties

in isolating pure cages from post-reaction mixtures. Our objective thus was to fill these gaps by developing an efficient synthesis of pure homo- and hetero-dimeric pseudopeptide, water-stable molecular cages, by using thio-amino-acid functionalized organic platforms. This was expected to provide a robust workshop to explore the phenomenon of self-assembly and self-sorting in a dynamic multi-disulfide system. We also attempted to draw some new insights into the structural and geometric factors crucial for disulfide cage formation based on experimental data and DFT calculations. Based on this, we propose a theoretical model that could be applied for the effective design of next mono and bicomponent disulfide cages. In addition, we describe a preliminary investigation of a strongly fluorescent metal–organic material obtained using a disulfide cage as poly-anionic ligand on La(III).

Results and discussion**Design of building blocks**

The three core platforms used were based on triamides formed from aromatic tricarboxylic acids and L-cysteine. The use of natural L-cysteine ensured the absence of diastereomeric products and the formation of chiral cages with stable absolute configurations. The set of aromatic platforms was selected to gradually increase the size (diameter) of the rigid core. Each was functionalised by amide formation with L-cysteine in order to introduce –SH (for disulfide formation) and –COOH (for water solubility) groups. All building blocks were obtained

^a Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland. E-mail: ars@amu.edu.pl^b Center for Advanced Technologies, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 10, 61-614 Poznań, Poland^c Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires, Université de Strasbourg, 8 allée Gaspard Monge, 67083 Strasbourg, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental details, synthetic protocols, NMR, LC-MS, HPLC data. See DOI: 10.1039/d1tc01445e



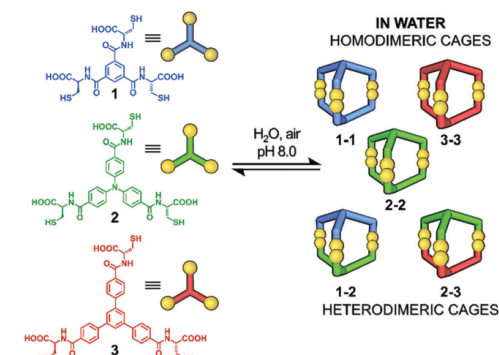


Fig. 1 General scheme of the dynamic covalent DCL. Three building blocks react together and give five different disulfide cages, three homodimeric (1-1, 2-2 and 3-3) and two heterodimeric cage-like architectures (1-2 and 2-3).

by a slightly modified three-step synthetic route³⁶ (see ESI,† Fig. S1). In the first stage, the reaction of each tricarboxylic acid with *N*-hydroxysuccinimide (NHS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC-HCl) provided the corresponding NHS activated esters. Next, formation of the amides by reaction with *L*-5-trityl-cysteine followed by hydrolysis of the trityl-moieties in acidic conditions led to the desired trifunctional components 1, 2 and 3, which have planar sizes in the order 3 > 2 > 1 (Fig. 1).

Synthesis of homodimeric cages

Solutions of each component (5 mM) were prepared in an aqueous 0.01 M NaOH solution and its pH was adjusted to 8.0 by addition of dilute HCl. The presence of thiolates in solution is obligatory for their oxidation to disulfides as well as for disulfide dynamic exchange. These solutions of the basic components were then placed in loosely capped 2 mL vials and allowed to oxidize and equilibrate for 5 days. To ensure that all DCLs reached thermodynamic equilibrium, each sample was further analysed by HPLC one week and one month after the end of the 5 day reaction time. Control analyses showed no quantitative or qualitative changes in any DCL. After this time, LC-MS analysis was performed. This showed that each post-reaction mixture contained only one product (more polar than the substrate), which was identified by mass spectroscopy as the monoprotonated species with a mass of twice that of the reactant less the 6 hydrogen atoms corresponding to those lost in formation of 3 disulfide links, *i.e.* the tris-disulfide dimeric cage. The compound 1-1 is a known species, identified previously by LC-MS and ¹H NMR.³⁷ However, we decided to include cage 1-1 in our studies for comparison and to establish its full characteristics. Further details of the structure 1-1 were established from its ¹H NMR spectrum, which showed the *D*₃ symmetry expected for the homodimeric product (see ESI,† Fig. S19 and S20). The ¹H NMR spectra of the dimeric cages, 2-2 and 3-3 showed the same symmetry. Comparison of the

¹H NMR spectra of the respective components with those of the cages and analysis of optimised structures revealed that the aromatic proton signals of the cages are shifted upfield, presumably as a result of close proximity of the aromatic platforms in the cage structure. In contrast, the signals originating from cysteine CH and CH₂ groups were found to be deshielded due to their position outside the cages (see ESI,† Fig. S19, S24, S29 and S60–S65). Acidification to pH 2 of the post-reaction mixtures yielded the three cages as the water-insoluble hexa-carboxylic acids, which could be easily isolated by filtration. However, down to the slightly acidic region of pH 5–6 the cages remained soluble, which extends the range of their applications.

Synthesis of heterodimeric cages

The next step was to investigate if the different building blocks would react with each other and form the hetero-component cage structures. Equimolar solutions containing pairs of components were prepared at pH 8.0 and then stirred for five days in air. Three different products in equal proportions were detected in the post-reaction mixture derived from components 1 and 2 (Fig. 2). Based on the LC-MS analysis two homodimeric cages, 1-1 and 2-2, were identified while the third product had the composition expected for the heterodimeric cage 1-2. Similar results were obtained for the mixture of 2 and 3, which after the reaction contained cages 2-2, 3-3 and heterodimeric cage 2-3. For the mixture of 1 and 3, only homodimeric structures were found in the post-reaction mixture, with none

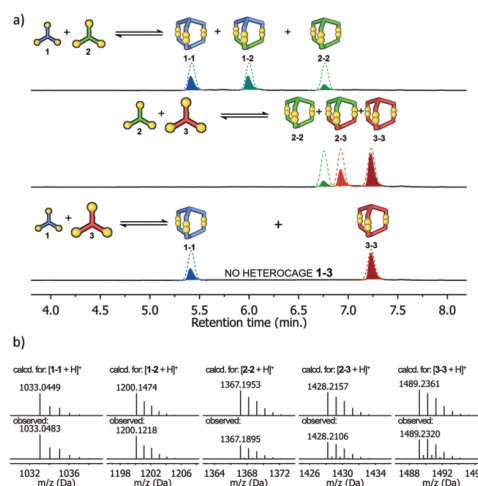


Fig. 2 (a) HPLC chromatograms showing the formation of heterodimeric cages (1-2 and 2-3) in the component pairs mixtures. For the pair of 1 + 3, cage 1-3 was not observed. Due to significant differences in molar extinction coefficients of the components, the chromatograms do not show the real amounts of the products. The dashed line shows the actual content of each (see ESI,† Fig. S57 and S58). (b) comparison of experimental and simulated mass spectra (ESI-MS) of all five cages.



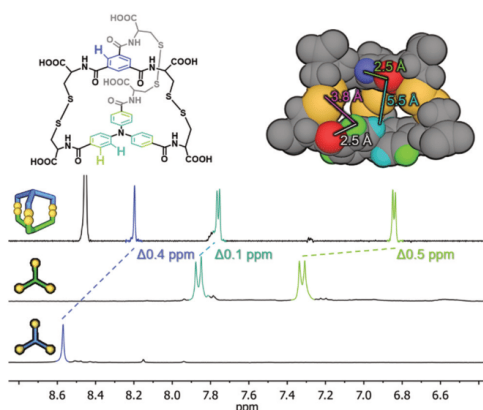


Fig. 3 Comparison of ^1H NMR spectra (D_2O , 298 K, 600 MHz) of heterodimeric cage **1-2** and components **1** and **2**. Dashed lines show chemical shifts of analogous signals from aromatic hydrogens from both organic platforms.

of the possible cage **1-3**. We observe here a kind of structural self-sorting based on the components' C_3 symmetry and size factors favoring the formation of the more symmetrical products in the final DCL. No linear or macrocyclic products were observed in any of the post-reaction mixtures. Each of the DCL samples was completely transparent before and after the reaction and was not additionally filtered before LC-MS analysis. For this reason, we exclude the possibility that polymeric or insoluble products have formed in the DCL that might not be detected by the HPLC DAD detector. To isolate the heterodimeric cages, the experiment with pairs of components **1 + 2** and **2 + 3** was repeated on a larger scale and at a higher concentration (10 mM). Heterodimeric cages were isolated by semi-preparative HPLC on a few milligrams scale and characterized by NMR spectroscopy. ^1H and COSY NMR spectra confirmed their expected structures and C_3 symmetry. Comparison of the

^1H NMR spectra of the hetero cage **1-2** and the components **1** and **2** is also in line with the cage structure (Fig. 3). The upfield shifts of the doublets (cyan-green) from the triphenylamine moieties and the singlet (blue) from the central phenyl ring clearly indicate a strong interaction between aromatic hydrogens and the proximity of organic platforms of **1** and **2**. This explanation is supported by analysis of the optimized structure of the **1-2** cage. In this structure, all of the aromatic hydrogens are additionally shielded by the accumulation of electron-rich sulfur (S-S bonds) and oxygen (amides) atoms.

The hydrodynamic radii deduced from DOSY experiments (see ESI † for details) coincide closely with the calculated results (Table 1). Finally, we performed an experiment with an equimolar mixture of all three components at once to check if in this three component DCL any new architectures would emerge. The resulting DCL contained an almost equimolar mixture of all five cages, without any traces of new species (see ESI † Fig. S44). As in previous experiments, no products with a different architecture were found. This clearly established that our system based on well-defined C_3 symmetric components spontaneously selects the stable cage-like structures from the numerous possibilities of combinatorial connections between the three trifunctional components (see ESI † Fig. S70).

Although we have obtained pure products, we have been unable to obtain crystals suitable for X-ray structure determinations. For this reason, we decided to use computational tools to optimize the cages' structures (Table 1 and ESI † Fig. S60–S65).^{43–45} Based on this it can be concluded that the cage molecules prefer an “open” conformation, where a small internal space of the molecule is present and the disulfide groups are directed towards the inside of the molecule. The S-S torsion angles are typical for this binding in all optimized cages and averaged 107° (in the range 85° to 136°). One structure with a “closed” conformation and disulfide groups directed outwards turned out to be that of the cage **2-3**, which can be explained by the significant differences in the size of aromatic-organic platforms that enforce such arrangement of cysteine arms and disulfide bonds. Also, we found that this structure is

Table 1 List of the 3D models and the comparison of experimental and calculated dimensions of cages

Cage	1-1	2-2	3-3	1-2	2-3	1-3 ^a
Calculated structure						
Symmetry	D_3	D_3	D_3	C_3	C_3	C_3
D [$\text{m}^2 \text{s}^{-1} \times 10^{-10}$]	2.05	1.80	1.47	2.25	1.93	n/a
r_{hyd}^b [\AA]	9.68	11.02	13.50	8.02	10.28	n/a
r_{calc}^c [\AA]	8.36	10.35	12.05	7.86	9.13	10.22
V_{sph}^d [\AA^3]	3971	5612	10 304	2873	4553	4341
d^d [\AA]	7.9	8.2	8.1	7.5	4.0	3.5
ϕ^e	107.0	136.6	105.5	105.4	85.5	101.7
ζ^f	95.1	93.7	96.3	106.9	99.8	120.8
ϑ^g	4.9	9.7	5.2	8.1	1.5	14.5

^a For cage **1-3** only calculated properties are available. ^b Calculated from DOSY diffusion coefficients using the standard Stokes–Einstein equation. ^c Measured from optimised models using Gaussian software. ^d d – distance between platforms. ^e ϕ – average disulfide bonds dihedral angle. ^f ζ – rotation angle between organic platforms. ^g ϑ – trapezoidal angle.



additionally stabilized by stacking interactions, due to the very close proximity of the aromatic cores (3.0–4.0 Å). The cage 3-3 composed of two large aromatic platforms should also be stabilized in this way, since the angles between the arms and platforms are close to 90°, favoring extensive close overlap. For this reason, we have defined two geometric factors that can influence the structure.

One, termed the trapezoidal angle ζ (zeta), is the angle between the platform plane and the cysteine arm, which defines the relationship between the size of the platform and the angle imposed on the binding arm. The second, ϑ (theta), is the degree of rotation between the platforms about the principal z-axis. This angle is important for the measure of structural stress caused by the differences in the size of the platforms and for geometric considerations, e.g., steric hindrance. The angles were determined for four points: centroid of the smaller platform – carbon alpha of the arm of the smaller platform – alpha carbon of the larger platform – centroid of the larger platform. Centroids have been designated as the central nitrogen atom in platform 2 or the geometric center of the benzene ring in platforms 1 and 3. So, high values for both of these angles seem to be universal factors for determining the geometric barriers to formation of a given cage structure. For each homodimeric cage, the values of those angles are very similar (ϑ near 5° and ζ near 95°) and those compounds are formed smoothly. This two-angle factor is slightly more complicated for two observed heterodimeric cages 1-2 and 2-3, but the values do not exceed 8° theta and 115° zeta. Cage 1-3 is the only one not formed during the experiments, and the reason for this may be the difficulty involved in attaining the cage geometry. The zeta angle takes on the highest value of 121° due to the significant difference between the sizes of the aromatic platforms of 1 and 3. The platforms can rotate about the z-axis to compensate for this stretching effect but the optimal theta angle then turns out to be large enough to stop the cage from forming (Fig. 4).

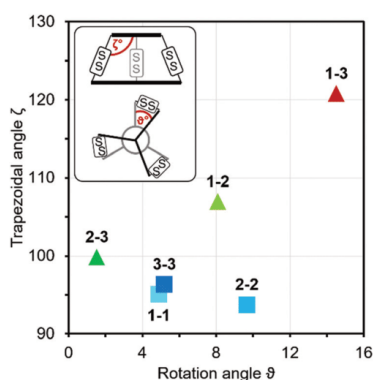


Fig. 4 Diagram of ϑ (theta) and ζ (zeta) angles for the six optimized dimeric cages (blue squares – homodimeric cages, triangles – heterodimeric cages, green – observed cages, red indicates no cage formation for 1-3).

Kinetic studies

Because the calculations indicated that the formation of cage 1-3 is the least preferred for geometric reasons, but structurally possible, we decided to supplement our work with kinetic studies to find any additional reasons for the absence of 1-3. We employed HPLC to monitor cage formation over time. Reactions were performed in 2 mL vials at pH 8 in 5 mM concentration in room temperature. Each reaction mixture was observed for 30 hours and monitored every 30 minutes. The first HPLC injection (t_0) for every sample was done immediately after dissolving the component in basic water and setting the pH to 8.0. Thus, we obtained a set of chromatograms illustrating component decay and cage growth over time based on the relative peak area (RPA). To ensure that the method was quantitative, absorption spectra were recorded from the solutions of each component and the corresponding cage at the same concentration. The difference in registered absorbance between the component/cage pairs did not exceed 5%. Each reaction was repeated and monitored three times to ensure that results were the same. For the homodimeric cages, the material distribution curves are shown in Fig. 5a–c. These show that in mono-mixtures the time for conversion to

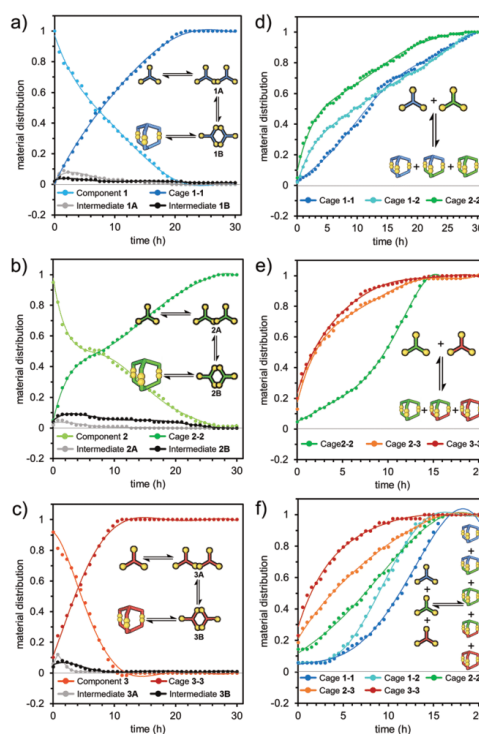


Fig. 5 Normalized rate plots of mono-component DCL (a–c) and multi-component DCL equilibration (d) 1 + 2 mixture, (e) 2 + 3 and (f) 1 + 2 + 3.



100% product within experimental error was shortest for cage 3-3 (10 h), followed by 1-1 (20 h) and longest for 2-2 (26 h). We attribute this to the influence of subtle effects such as the differences in solvation of polar cysteine moieties, in surface polarity and in the size of each component. Cooperativity between these factors appears to result in the largest aromatic species 3 having the fastest cage formation.^{46–48}

LC-MS measurements taken 60 minutes after the start of reactions provided a deeper understanding of the cage formation process. These measurements (ESI,† Fig. S45–S50) showed that aside from unreacted trithiol, the dominant species present corresponded to the linkage of two trithiol molecules through one, two or three disulfide bonds. No species derived from more than two trithiol units were detectable. This is consistent with an initially intermolecular reaction to give the mono-disulfide being followed by rapid intramolecular reactions giving the macrocyclic bis(disulfide) and then the cage tris(disulfide). Competition by intermolecular processes after the first step appears to be ineffective. The fact that the cage dominates over the macrocycle at a time when the mono-disulfide is still present indicates that restrictions of motion in the macrocycle must lead to faster disulfide formation relative to that giving the macrocycle. Thus, in the first step, two molecules of trithiol form open-chain mono-disulfide adducts (**1A**, **2A**, **3A**). These are then further oxidized to the macrocyclic bis-disulfide products (**1B**, **2B**, **3B**), which in the third step are finally oxidized to the cages. (Intermediates are shown as gray and black lines in Fig. 5a–c). In the case of cage 2-2, the bis(disulfide) intermediate was more abundant than the mono-(disulfide) intermediate at all points where the reaction mixture was sampled (Fig. 5b). This is consistent with acceleration in rate due to the intramolecular nature of the second reaction step, which is largely dependent on the chemical structure and shape of the component employed. This is supported by the molecular modeling results that showed smaller conformational restrictions in the macromonocyclic bis(disulfide) intermediate **2B** than those found for **1B** and **3B**, see ESI,† Fig. S66–S69). For cages **1-1** and **3-3**, the observations are less complicated and the disappearance of the reactant in both cases can be well fitted to a single exponential decay. This implies that the reactant loss is a first-order process (seemingly irreversible), a situation which might arise if the rate-determining step of the reaction were to be the very first step involving the trithiol and dissolved oxygen. Although formally a second order process, if the agitation of the solution and its contact with the normal atmosphere were sufficient to maintain a constant concentration of dissolved oxygen, it would obey pseudo-first-order kinetics. Once the first species is formed and then dimerizes, all subsequent reaction steps, as noted above, would be intramolecular and probably greatly accelerated as a result. Examination of the kinetics of cage formation in the mixed **1 + 3** DCL (Fig. 6a) provided evidence for one of the complications in these reactions. In this system cage 3-3 is exclusively formed first, then **1-1**. Formation of **1-1** shows an induction period lasting until the essentially complete conversion of **3** to **3-3**, and an intermediate species decaying to **3-3** is very rapidly formed in a substantial amount.

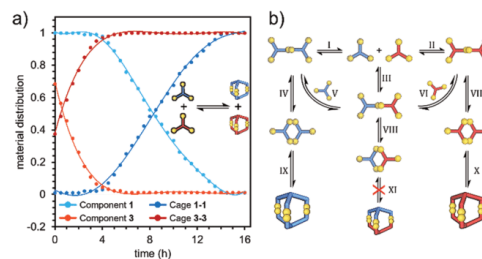


Fig. 6 (a) normalized kinetics plot of **1 + 3** DCL equilibration (substrates and products), (b) schematic representation of possible disulfide exchanges in the **1 + 3** mixture.

More significantly, the homodimeric cages **1-1** and **3-3** form almost twice as fast as in the single component systems. Complete conversion of **3-3** takes about 4 h, while, once initiated, complete formation of **1-1** takes about 10 h. Since the thiol oxidation is slower process than the disulfide exchange,^{49,50} formation of the first S–S linkage between two tri-thiols must be the rate-determining step in the entire cage formation process.⁵¹ What distinguishes both systems (single vs. mixed component) is the formation of intermediate species e.g. **1-3A** (reaction III, Fig. 6b), and we assume that the presence of the latter is related to observed acceleration of cage formation. Thus, the nucleophilic attack of thiolate on the **1-S-3** disulfide (**1-3A**), results in the formation of linear S–S transition state, which decomposes to a more stable disulfide product.⁵⁰ If **1** is a weaker acid than **3** then under the same pH conditions, there must be a lower $1-S^-$ thiolate concentration, which results in both a slower radical formation during oxidation and a preferred attack of **3**-thiolate on the intermediate **1-3A**. In this case, the synthesis of **1-1** through either the **1-3A** path (reactions III and V) or path IV can be effectively stopped until the system is essentially drained of **3**. However, considering the complexity of this system, identifying the exact cause of this phenomenon is very challenging.⁵²

Where hetero-cage formation occurs as in reactions involving **2**, the kinetics become more complicated to analyze because both reactants are involved in competitive processes. By LC-MS analysis we also observed all the expected hetero-component intermediates, but at much lower concentrations (<5% RPA, LS-MS, ESI,† Fig. S51–S56). A schematic representation of possible reactions between a pair of different components leading to a mixture of homo and heterodimeric cages is shown in Fig. 6a. We assume that for pairs **1 + 2** and **2 + 3**, reactions IV, VII and XI occur with a similar probability, resulting in the observed equimolar mixture of homo and hetero products. In the case of the pair **1 + 3**, reaction intermediates III (**1-3A**) and VIII (**1-3B**) were found at a low concentration (<2% RPA, LC-MS). Normalized concentration-time plots for the reactions **1 + 2** and **2 + 3** are shown in Fig. 5d and e. In the **1 + 2** system, cage **2-2** forms most rapidly, then comes **1-2** and the slowest is **1-1**. The total reaction time is much longer than in the **1 + 3** DCL and takes about 30 hours. **2-2** reaches 50% of the target conversion after 4 hours compared to 8 hours in the DCL with only **2**.



As in the 1 + 3 system, the products involving a geometrically larger component (1-2 and 2-2) are created at higher rates. This effect is even more visible in the 2 + 3 system (Fig. 5e). Here, cages 2-3 and 3-3 are formed at almost the same rate and the initial rate is much higher than in the 1 + 2 DCL. Only when the DCL is dominated 80% by 2-3 and 3-3 (after about 4 hours), does the rate of formation of 2-2 increase.

Observations on the system with all three components present (1 + 2 + 3) were consistent with the results from the two-component systems, once again showing an apparent size effect on the cage formation (Fig. 5d-f). Products containing the largest component 3 formed faster than those containing 2 and the slowest formed were those with 1. Cages built of 1 and 2 form preferentially only when the DCL has already consumed most of the available 3.

Fluorometric detection of La^{3+} cations and generation of a strongly luminescent metal-organic material

While working with the cages, we noticed that both 2 and cage 2-2, due to the triphenylamine core, show strong fluorescence. We decided to further explore this feature of 2-2 to preliminary investigate some useful properties for potential application of this particular cage. Comparison of the emission spectra of 2 and 2-2 shows almost four times stronger fluorescence of the cage (max. 456 nm) than that of the component (max. 466 nm) and the blue-shift of the maximum emission of 2-2 by 10 nm (Fig. 7a). We assume that this is due to an AIE-like effect (aggregation-induced emission) because the closed cage structure prevents the chromophore NPh_3 rings from rotating freely, which results in increased emission intensity. Moreover, each cage is a polyanion with six CO_2^- groups concentrated on a small molecule area and available for coordination through O-donors.

Encouraged by these cage features, we decided to synthesize a metal complex based on 2-2. Mixing an aqueous solution of 2-2 as sodium salt with aqueous $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ results in the quantitative precipitation of highly insoluble, amorphous metal-organic 2-2-La material (see ESI† for details). Taking into account the number and location of the cage chelating groups as well as coordination preferences of La^{3+} cation, formation of cross-linked coordination assembly was expected. The composition and purity of the generated material in the solid state was confirmed by the elemental (NHCS) analysis, which indicated 1:1 metal:cage ratio (see ESI† Fig. S72). This was further supported by the ICP-MS analysis, which showed 10.6 wt% of La in 2-2-La for expected 12.6 wt% (see ESI† page 45). Unfortunately, despite many attempts, the solubility of the obtained material prevented the mass spectrum to be registered. To determine the thermal stability of 2-2-La, TGA in the range of 30–600 °C was conducted and showed high stability of this material, which lost only 40 wt% with fairly linear weight loss. In comparison, organic compounds 2 and 2-2 turned out to be much less stable and already at 250 °C showed a major weight loss of about 30 wt% (over the full range of heating lost of 65 wt% and 50 wt%, respectively was recorded; Fig. 7c). While the volatile products from thermal decomposition were not

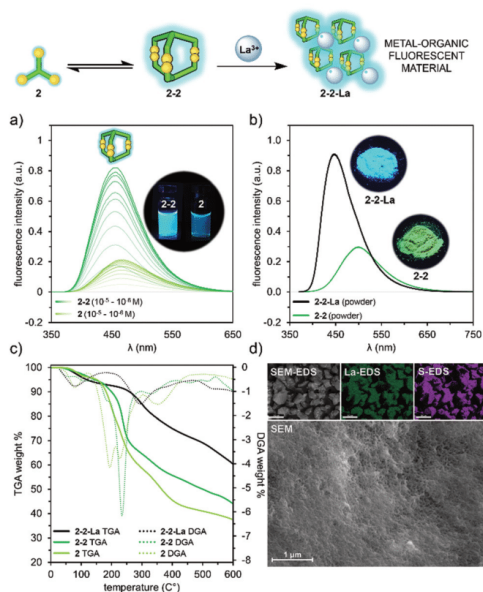


Fig. 7 Synthesis of a fluorescent 2-2-La material: (a) normalized emission spectra of the cage 2-2 and 2 (10^{-5} – 10^{-6} M, 1×1 cm cuvette, ex: 345 nm, water pH 8.0), (b) normalized solid-state emission spectra of 2-2 and 2-2-La (ex: 345 nm), images taken under 325 nm UV lamp, (c) TGA/DGA analysis of 2, 2-2 and 2-2-La, (d) SEM and SEM-EDS analysis of 2-2-La. See ESI† for details (Fig. S71 and S72).

characterised, it would be expected that the organic parts of the materials would undergo progressive decomposition, probably in multiple steps, to give a residue of La_2O_3 plus, possibly, Na_2SO_4 or Na_2CO_3 from the 2-2-La and the sodium salts alone from 2-2, so that the overall % changes in mass should be different. To get visual insights into the morphology of the 2-2-La complex, SEM imaging was performed and revealed the amorphous state of the powdered material. The close-ups show a spongy porous structure with numerous pores, about 0.1 μm in diameter, presumably due to the three-dimensional architecture of cage 2-2 with internal hydrophobic voids (Fig. 7d). Additionally SEM-EDS analysis was used to map the surface distribution of elements in the 2-2-La. The obtained results confirmed the presence of all elements expected in the investigated material (Fig. 7d and ESI† Fig. S71, S72). Since in aqueous solution, 2-2 exhibits interesting fluorescence behavior, we decided to examine and compare this property with metal-organic 2-2-La measured in the solid state. These measurements show that described system is photo-responsive, which opens several avenues towards their application in various technological fields. As presented in Fig. 7b, after excitation at 345 nm, the emission spectrum of 2-2-La shows a broad band with its maximum at 445 nm, while in the emission spectrum of 2-2 apart from seemingly lower intensity, there is a notable blue-shift (55 nm) in the band maximum = 500 nm (for absorbance spectra see ESI† Fig. S59).



The difference in solid-state fluorescence of both materials under excitation at 325 nm is also clearly visible to the naked eye as a significant difference in color (Fig. 7b insets).

Conclusions

We have described here a facile approach to the synthesis of pure disulfide, water-soluble molecular cages based on trifunctional organic platforms, and which can be formed easily in a one-pot reaction under very mild conditions. We have shown that high symmetry of its components pushes a DCL to a self-sorted selection of cage species. If the difference in component size is small, the DCL self-sorts into a mixture of homo and heterodimeric cages. The loss of geometrical compatibility with large size differences results in self-sorting of a mixture of two trithiols into a pair of two homodimeric cages, with no other products detectable. Based on these observations and DFT calculations, we created a two-factor theoretical model to predict the tendencies of trifunctional thiols to self-assemble into homo- or heterodimeric cages. We have also provided original kinetic studies giving new insight into the disulfide cages' formation mechanism through careful analysis of every intermediate product. As shown by the synthesis of 2-2-La in aqueous conditions, they have potential applications as novel lanthanides complexing agents and functional fluorescent materials. It has been shown that the cage-like structure of these compounds is very stable in aqueous conditions, a highly desirable property for applications in molecular transport and drug delivery. The anionic form of described cages at basic pH could be potentially used as an ionic receptor for molecular recognition. The applications of the cages could be easily extended to non-aqueous solvents by choosing the appropriate organic counter-ions while maintaining the ionic character of the entire system. Our methodological approach described here allows for easy and quick design of multi-functional disulfide cages with the promise of a wide range of applications in numerous branches of chemistry.

Author contributions

MK performed all organic synthesis, all LC-MS, HPLC, NMR analysis and co-wrote the paper. PC performed molecular modeling, optimization of the dimeric cages and co-wrote the paper. JMH co-wrote the paper. ARS designed the project, interpreted the results and co-wrote the paper.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

MK and PC thank the grant INNCHM no. POWR.03.02.00-00-1023/17 co-financed by the European Union through the European Social Fund under the Operational Program

Knowledge Education Development. PC thanks the Poznań Supercomputing and Networking Center (grant no. 401) for granting super-computers access. ARS thanks the National Science Centre (grant SONATA BIS 2018/30/E/ST5/00032) for financial support. We thank Prof. Tomasz Grzyb for his help with the solid-state fluorescence measurements.

References

- 1 S. Ulrich, *Acc. Chem. Res.*, 2019, **52**, 510–519.
- 2 J. W. Nial, R. B. Craig, J. G. Collins, K. Sharon and R. A.-W. Janice, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2007, **7**, 627–648.
- 3 C. Bravin, A. Guidetti, G. Licini and C. Zonta, *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 3523–3528.
- 4 A. Brzechwa-Chodzyńska, W. Drożdż, J. Harrowfield and A. R. Stefankiewicz, *Coord. Chem. Rev.*, 2021, **434**, 213820.
- 5 G. Markiewicz, A. Jenczak, M. Kolodziejewski, J. J. Holstein, J. K. M. Sanders and A. R. Stefankiewicz, *Nat. Commun.*, 2017, **8**, 15109.
- 6 S. Durot, J. Taesch and V. Heitz, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 8542–8578.
- 7 H. Jedrzejewska and A. Szumna, *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 4412–4421.
- 8 W. Drożdż, A. Walczak, Y. Bessin, V. Gervais, X.-Y. Cao, J.-M. Lehn, S. Ulrich and A. R. Stefankiewicz, *Chem. – Eur. J.*, 2018, **24**, 10802–10811.
- 9 M. Mastalerz, *Acc. Chem. Res.*, 2018, **51**, 2411–2422.
- 10 G. Zhang and M. Mastalerz, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 1934–1947.
- 11 S. R. Seidel and P. J. Stang, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 972–983.
- 12 F. Beuerle, S. Klotzbach and A. Dhara, *Synlett*, 2016, 1133–1138.
- 13 L. Catti, N. Kishida, T. Kai, M. Akita and M. Yoshizawa, *Nat. Commun.*, 2019, **10**, 1948.
- 14 J. H. Jordan and B. C. Gibb, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 547–585.
- 15 I. Pisagatti, L. Barbera, G. Gattuso, M. F. Parisi, S. Geremia, N. Hickey and A. Notti, *Org. Chem. Front.*, 2019, **6**, 3804–3809.
- 16 B. Setner and A. Szumna, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2019, **15**, 1913–1924.
- 17 P. T. Corbett, J. Leclair, L. Vial, K. R. West, J. L. Wietor, J. K. M. Sanders and S. Otto, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 3652–3711.
- 18 S. P. Black, J. K. M. Sanders and A. R. Stefankiewicz, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 1861–1872.
- 19 A. R. Stefankiewicz and J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 5820–5822.
- 20 W. Drożdż, A. Walczak and A. R. Stefankiewicz, *Org. Lett.*, 2021, **23**, 3641–3645.
- 21 T. M. Postma, W. R. J. D. Galloway, F. B. L. Coughon, G. D. Pantoş, J. E. Stokes and D. R. Spring, *Synlett*, 2013, 765–769.
- 22 S. Otto, R. L. E. Furlan and J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 12063–12064.



- 23 S. Otto, R. L. E. Furlan and J. K. M. Sanders, *Science*, 2002, **297**, 590.
- 24 F. Ulatowski, A. Sadowska-Kuziola and J. Jurczak, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**, 9762–9770.
- 25 W. Drożdż, M. Kołodziejcki, G. Markiewicz, A. Jenczak and R. A. Stefankiewicz, *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, **16**.
- 26 F. B. L. Cougnon, N. A. Jenkins, G. D. Pantoş and J. K. M. Sanders, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 1443–1447.
- 27 N. Ponnuswamy, F. B. L. Cougnon, J. M. Clough, G. D. Pantoş and J. K. M. Sanders, *Science*, 2012, **338**, 783–785.
- 28 L. Tapia, Y. Perez, M. Bolte, J. Casas, J. Sola, R. Quesada and I. Alfonso, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2019, **58**, 12465–12468.
- 29 M. Lafuente, I. Alfonso and J. Solà, *ChemSystemsChem*, 2019, **1**, 25–31.
- 30 M. E. Dehkordi, V. Luxami and G. D. Pantoş, *J. Org. Chem.*, 2018, **83**, 11654–11660.
- 31 B. Bartolec, M. Altay and S. Otto, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 13096–13098.
- 32 M. S. Collins, N.-M. Phan, L. N. Zakharov and D. W. Johnson, *Inorg. Chem.*, 2018, **57**, 3486–3496.
- 33 M. S. Collins, M. E. Carnes, B. P. Nell, L. N. Zakharov and D. W. Johnson, *Nat. Commun.*, 2016, **7**, 11052.
- 34 F. Brégier, J. Lavalle and J.-C. Chambron, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, 2666–2671.
- 35 M. A. Little, J. Donkin, J. Fisher, M. A. Halcrow, J. Loder and M. J. Hardie, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 764–766.
- 36 A. R. Stefankiewicz, M. R. Sambrook and J. K. M. Sanders, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 2326.
- 37 K. R. West, K. D. Bake and S. Otto, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 2615–2618.
- 38 F. Brégier, O. Hudeček, F. Chaux, M.-J. Penouilh, J.-C. Chambron, P. Lhoták, E. Aubert and E. Espinosa, *Eur. J. Org. Chem.*, 2017, 3795–3811.
- 39 L. Krejčí, M. Buděšínský, I. Čísařová and T. Kraus, *Chem. Commun.*, 2009, 3557–3559.
- 40 F. Wang, C. Han, C. He, Q. Zhou, J. Zhang, C. Wang, N. Li and F. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 11254–11255.
- 41 S. Dong, X. Yan, B. Zheng, J. Chen, X. Ding, Y. Yu, D. Xu, M. Zhang and F. Huang, *Chem. – Eur. J.*, 2012, **18**, 4195–4199.
- 42 F. Wang, B. Zheng, K. Zhu, Q. Zhou, C. Zhai, S. Li, N. Li and F. Huang, *Chem. Commun.*, 2009, 4375–4377.
- 43 G. B. Rocha, R. O. Freire, A. M. Simas and J. J. Stewart, *J. Comput. Chem.*, 2006, **27**, 1101–1111.
- 44 J. J. Stewart, *J. Mol. Model.*, 2007, **13**, 1173–1213.
- 45 S. Grimme, S. Ehrlich and L. Goerigk, *J. Comput. Chem.*, 2011, **32**, 1456–1465.
- 46 D. Komáromy, M. C. A. Stuart, G. Monreal Santiago, M. Tezcan, V. V. Krasnikov and S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 6234–6241.
- 47 S. Otto, *Chem. Sci.*, 2013, **4**, 2953–2959.
- 48 W. Blokzijl and J. B. F. N. Engberts, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1993, **32**, 1545–1579.
- 49 D. Luo, S. W. Smith and B. D. Anderson, *J. Pharm. Sci.*, 2005, **94**, 304–316.
- 50 P. Nagy, *Antioxid. Redox Signaling*, 2012, **18**, 1623–1641.
- 51 J. Atcher and I. Alfonso, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 25605.
- 52 M. Trujillo, B. Alvarez and R. Radi, *Free Radical Res.*, 2016, **50**, 150–171.



Electronic Supplementary Information

Structural self-sorting of pseudopeptide homo and heterodimeric disulfide cages in water: mechanistic insights and cation sensing.

Marcin Konopka ^{a,b}, Piotr Cecot ^{a,b}, Jack M. Harrowfield ^c and Artur R. Stefankiewicz ^{a,b}

a) Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland.

b) Centre for Advanced Technologies, Adam Mickiewicz University, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 10, 61-614 Poznań, Poland.

c) Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires, Université de Strasbourg, 8 allée Gaspard Monge, 67083 Strasbourg, France.

Table of contents:

Materials and methods	2
Synthesis and characterisation of thiol components	3
Synthesis and characterisation of homodimeric cages	18
Homodimeric cage 1-1	18
Homodimeric cage 2-2	21
Homodimeric cage 3-3	24
Synthesis and characterisation of heterodimeric cages	27
Heterodimeric cage 1-2	27
Heterodimeric cage 2-3	30
HPLC-MS Data	33
UV-Vis Data	40
Computational data	42
Solid state analysis of 2-2-La	45
References	47

Materials and methods

All chemicals and solvents were purchased from commercial sources. NMR solvents were purchased from Deutero GmbH (Germany).

NMR spectra were acquired on a Bruker Fourier 300 spectrometer equipped with $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 5 mm DUAL EasyProbe, Bruker Ascend 600 MHz equipped with a $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 5 mm probe and Bruker AVANCE III 700MHz equipped with a $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 5 mm probe, and referenced on solvent residual peaks or TMS- Na internal reference for D_2O measurements.

ESI-MS spectra were recorded on a Bruker Impact HD Q-TOF spectrometer. HPLC measurements were performed on a Hewlett Packard 1050 Series HPLC system coupled to a diode array detector.

LC-MS measurement were performed on a UHPLC UltiMate 3000 Thermo Scientific/Dionex conjugated with Bruker Impact HD Q-TOF spectrometer. All LC separations were performed on a Symmetry C8 Column, 100Å, 5 μm , 4.6 mm X 250 mm, 1/pkg, with a flow rate 1 mL/min in a solvent gradient of 40% MeOH in 60% H_2O to 100% MeOH in 20 min. Solvents (water and MeOH) were acidified with 0.1% HCOOH. Chromatograms were monitored using 254 nm absorption.

The semipreparative separations for obtaining heterodimeric cages were performed on a Eurospher II 100-5, column C8, 250x8mm, with a flow rate 5 mL/min. in a solvent gradient of 40% MeOH in 60% H_2O to 100% MeOH in 20 min.

A typical analytical DCL was prepared in a 0.5 mL scale by dissolving an equimolar mixture of thiol components (5 mM) in 10 mM aqueous NaOH, followed by titration with 100 mM aqueous 0.1M NaOH/HCl to pH = 8. The DCL was stirred in a close-capped HPLC vial at room temperature until being analysed after 5 days. The pH of each library was checked before and after equilibration process to make sure it remained unchanged. The HPLC traces remained unchanged after 7 days indicating that a final state had been reached.

Due to the high structural diversity in the chromophores of the three building blocks, the molar extinction coefficients were determined for each of them. The appropriate conversion factor was then used in quantitative calculations, to obtain the real amount of species in each DCL.

The UV-Vis measurements were performed on a Jasco V750 Spectrophotometer in 1cm quartz cuvettes.

The emission spectra were recorded on an Agilent Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer in 1cm quartz cuvettes with 345 nm excitation wavelength, with 5 mm slits and PMT 550 V.

The solid-state emission spectra were recorded on a Hitachi F-7000 FL Spectrophotometer in solid sample holder with 345 nm excitation wave, on 2.5 mm slits open and PMT 600 V.

The ICP-MS measurements were performed on a NexION 300D instrument. A 0.0308 g sample was dissolved in the mineralizer, aqua-regia. Then it was transferred quantitatively to a 250 mL volumetric flask and diluted to volume with distilled water.

The NCHS elemental analysis was performed on a Thermo Scientific FLASH 2000 instrument. Each sample was measured twice.

TGA/DGA scans were performed on a PerkinElmer TGA 4000 instrument in the 30 – 600°C range.

Synthesis and characterisation of thiol components

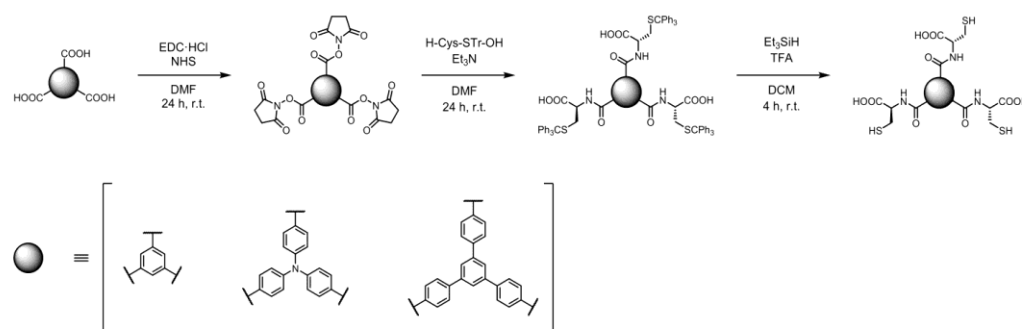
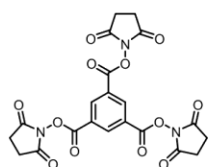


Figure S1: The main scheme for the synthesis of thiol components and structures of the organic platforms used. General synthesis methods were taken from previously reported work.^[1]

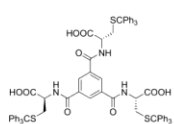
Synthesis of **1_AE**.



1,3,5-benzenetricarboxylic acid (210 mg, 1 mmol, 1 equiv.), N-hydroxy succinimide (NHS) (580 mg, 5 mmol, 5 equiv.) and EDC-HCl (960 mg, 5 mmol, 5 equiv.) were dissolved in anhydrous DMF (30 mL) and stirred at room temperature for 24h under argon atmosphere. The solvent was removed and acetone (2 mL) was added into the oily residue and stirred to give a clear solution before adding it to 1M HCl (100 mL). A white solid precipitated. It was filtered off, washed with H₂O and Et₂O, and dried under high vacuum. Yield 84%.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.93 (s, 3H), 2.92 (s, 12H). ¹³C NMR (125.75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 170.33, 160.12, 136.72, 127.77, 25.99. **ESI-MS:** m/z calc. for [M-H]⁻ 501.0661, found 501.0511.

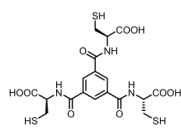
Synthesis of **1_STR**.



Activated ester **1_AE** (501 mg, 1 mmol, 1 equiv.) and L-Cys-STR-OH (1820 mg, 5 mmol, 5 equiv.) were dissolved in anhydrous DMF (80 mL), and Et₃N (1.0 mL, excess) was added. The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature before the solvent was removed and acetone (2 mL) added to the oily residue. The resulting solution was poured dropwise into 1M HCl (100 mL) causing precipitation of a white solid. It was filtered off, washed with H₂O, and dried under high vacuum. Yield 72%.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.83 (s, 3H), 9.30 – 9.01 (d, 3H), 7.35 – 7.20 (m, 45H), 4.35 (m, 3H), 2.81 (m, 3H), 2.57 (m, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 171.54, 144.26, 129.12, 128.11, 126.84, 66.39, 52.34, 39.52. **ESI-MS:** m/z calc. for: [M-H]⁻ 1244.3650, found 1244.9631.

Synthesis of 1.



The **1_STR** (1245 mg, 1 mmol, 1 equiv.) was placed in an argon-purged flask and dissolved in 10 mL of DCM. 3 mL of TFA was added and after 30 min. of stirring, Et₃SiH (1.0 mL, 6 mmol, 6. equiv.) was added and stirring was continued for an additional 5 h. The liquids were removed under high vacuum and the solid residue suspended in 10 mL of Et₂O, sonicated and filtered off. It was washed well with additional portions of Et₂O (5 x 20 mL) and dried under high vacuum. Yield 93%.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.95 (s, 3H), 9.04 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H), 8.52 (s, 3H), 4.58 (td, *J* = 8.4, 4.5 Hz, 3H), 3.12 – 2.82 (m, 6H), 2.62 (t, *J* = 8.4 Hz, 3H). **¹³C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 171.65, 165.84, 134.42, 129.37, 55.73, 39.52, 25.12. **ESI-MS**: *m/z* calc. for: [M-H]⁻ 518.1286, found 518.0360.

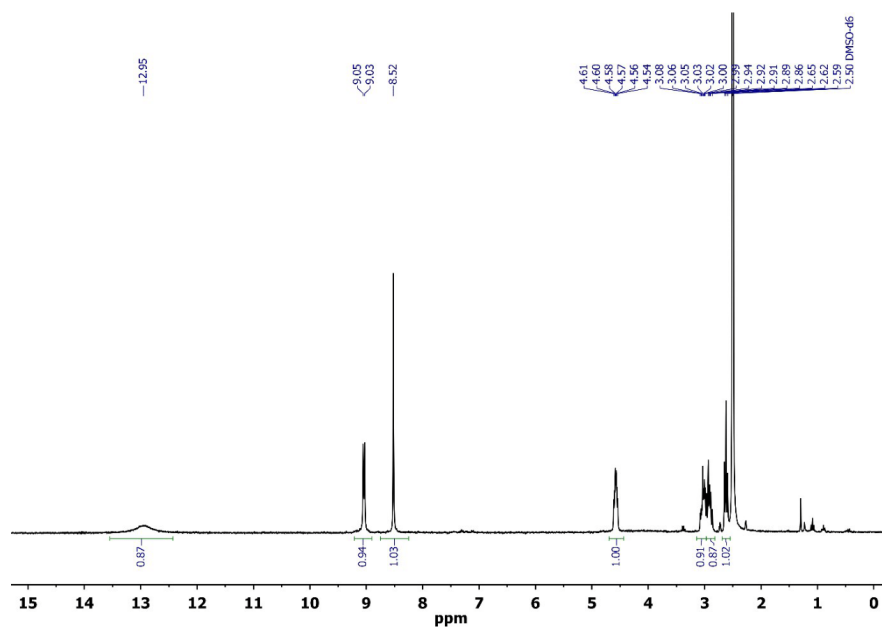


Figure S2: ¹H NMR spectrum of component 1 in DMSO-*d*₆ at 298 K (300 MHz).

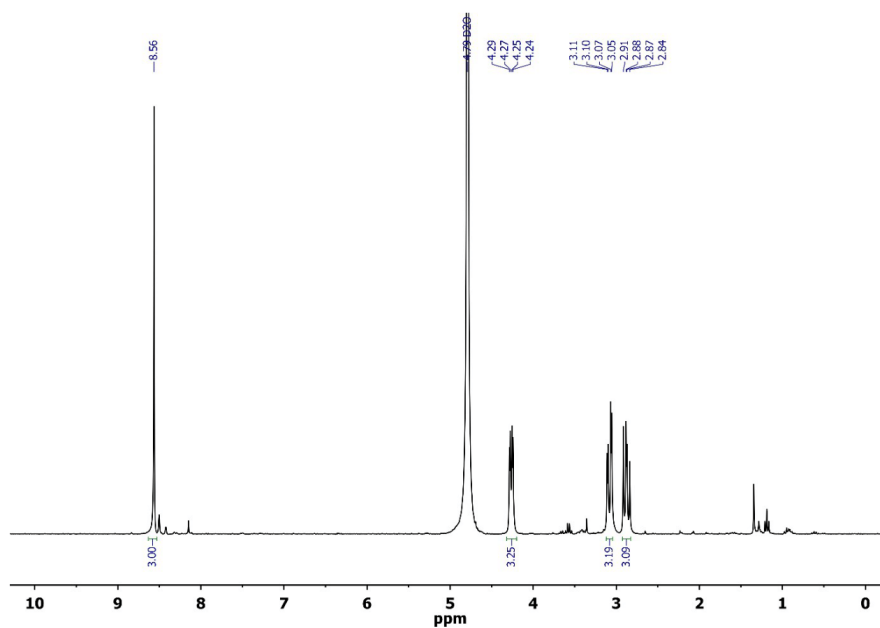


Figure S3: ^1H NMR spectrum of component 1 in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (300 MHz).

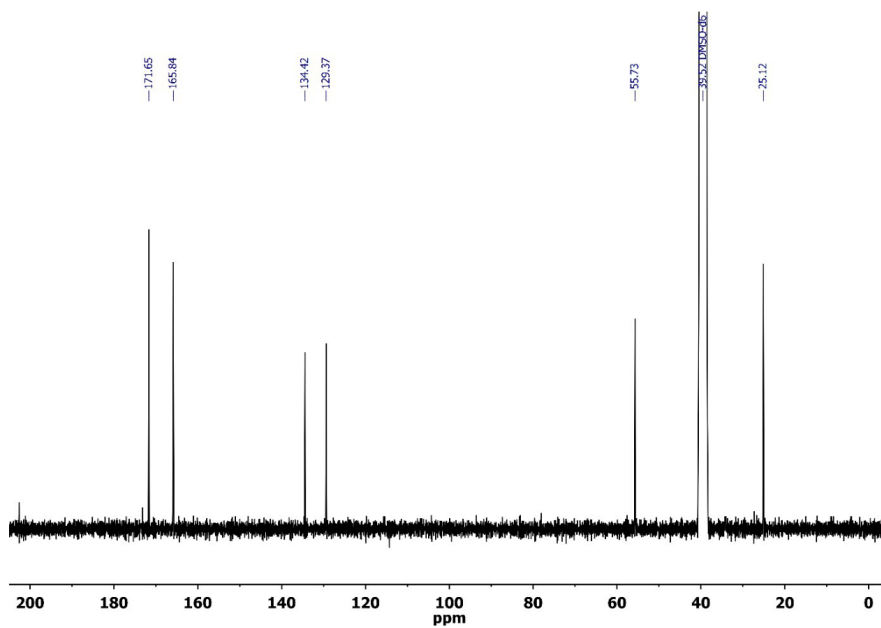
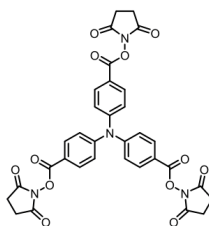


Figure S4: ^{13}C NMR spectrum of component 1 in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (75 MHz).

S5

Synthesis of **2_AE**.



4,4'-nitrotriphenylmethane (378 mg, 1 mmol, 1 equiv.), N-hydroxy succinimide (NHS) (580 mg, 5 mmol, 5 equiv.) and EDC-HCl (960 mg, 5 mmol, 5 equiv.) were dissolved in anhydrous DMF (50 mL) and stirred at room temperature for 24h under argon. The solvent was evaporated off and acetone (2 mL) added into the oily residue. After stirring to give a clear solution, it was poured into 1M HCl (100 mL). A white solid precipitated and was filtered off, washed with H₂O and Et₂O, and dried under high vacuum. Yield 74%.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.08 (d, *J* = 8.8 Hz, 6H), 7.40 (d, *J* = 8.8 Hz, 6H), 2.89 (s, 12H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 170.38, 151.22, 132.12, 124.86, 119.83, 39.52, 25.57. ESI-MS: *m/z* calc. for [M+H]⁺ 669.1463, found 669.2107.

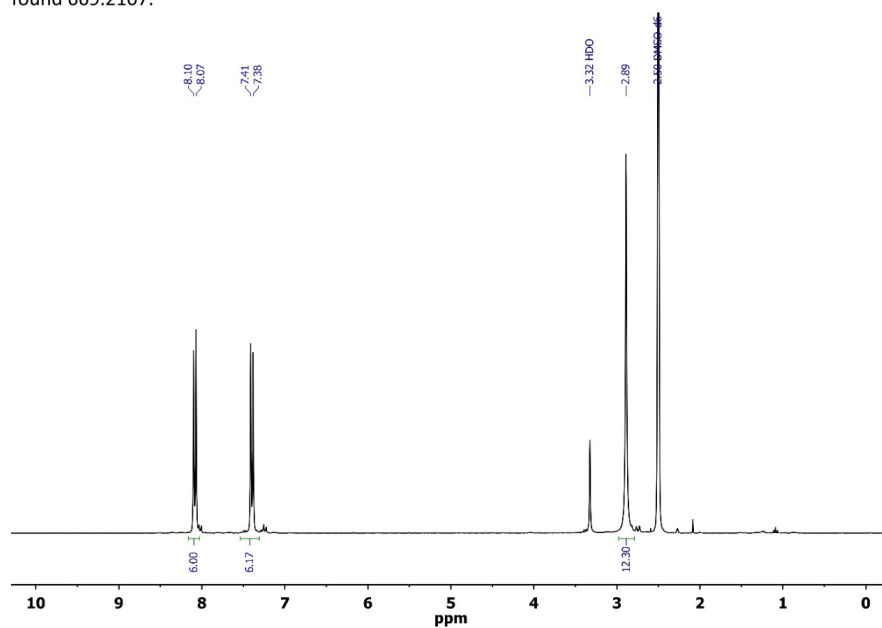


Figure S5: ¹H NMR spectrum of component **2_AE** in DMSO-*d*₆ at 298 K (300 MHz).

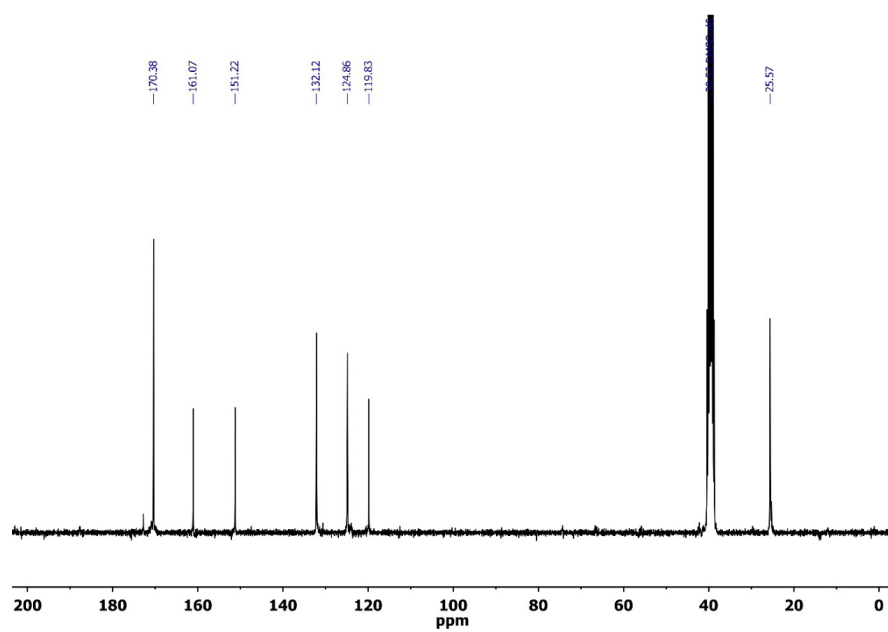
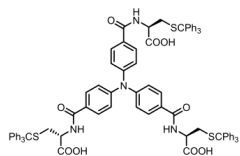


Figure S6: ^{13}C NMR spectrum of component **2_AE** in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (75 MHz).

Synthesis of **2_STR**



Activated ester **2_AE** (669 mg, 1 mmol, 1 equiv.) and *L*-Cys-STR-OH (1820 mg, 5 mmol, 5 equiv.) were dissolved in anhydrous DMF (100 mL), and Et₃N (1.0 mL, excess) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, then the solvent was removed and acetone (2 mL) was added to the oily residue. The resulting solution was poured dropwise into 1M HCl (100 mL) causing precipitation of a white solid. It was filtered off, washed with H₂O, and dried under high vacuum. Yield 74%.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.64 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 7.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 6H), 7.40 – 7.20 (m, 45H), 7.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 6H), 4.31 (dt, *J* = 13.0, 6.9 Hz, 3H), 2.79 – 2.68 (m, 3H), 2.55 (m, *J* = 7.5 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.82, 165.22, 148.96, 144.35, 129.11, 128.05, 127.77, 127.52, 126.77, 126.63, 66.09, 59.54, 39.52, 26.53. ESI-MS: *m/z* calc. for: [M-H]⁻ 1412.6405, found 1412.4407.

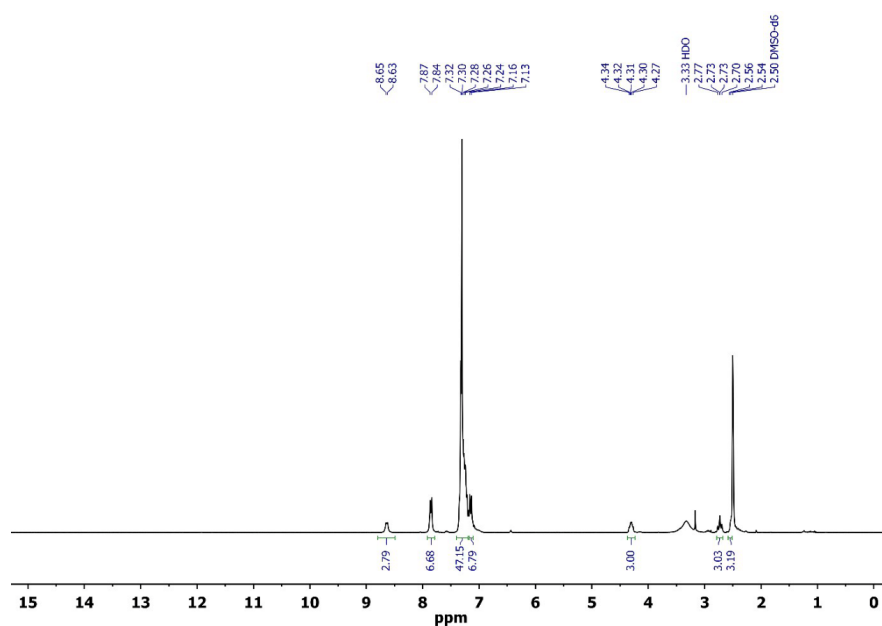


Figure S7: ¹H NMR spectrum of component **2_STR** in DMSO-*d*₆ at 298 K (300 MHz).

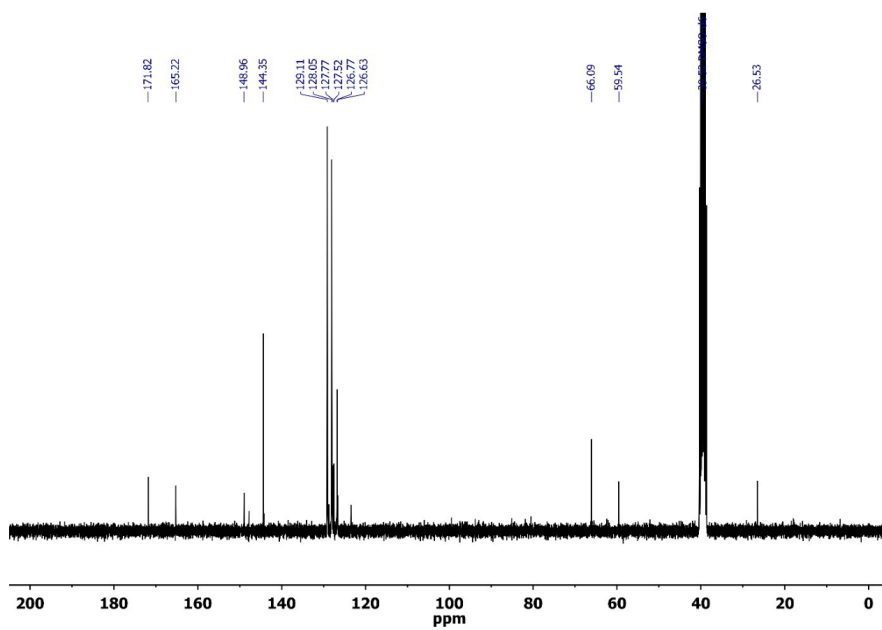
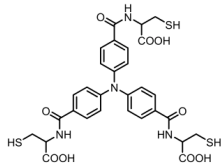


Figure S8: ^{13}C NMR spectrum of component **2_STr** in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (75 MHz).

Synthesis of 2.



2 was synthesized according to procedure **1**. The **2_STrt** (1414 mg, 1 mmol, 1 equiv.) was placed in an argon-purged flask and dissolved in 10 mL of DCM. 4 mL of TFA was added and after 30 min. of stirring, Et_3SiH (1.0 mL, 6 mmol, 6. equiv.) was added and stirring was continued for an additional 5 h. The liquids were removed under high vacuum and the voluminous solid residue was suspended in 20 mL of Et_2O , sonicated and filtered off. It was washed well with additional portions of Et_2O (5 x 20 mL) and dried under high vacuum. Yield 91%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 8.60 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H), 7.90 (d, $J = 8.6$ Hz, 6H), 7.15 (d, $J = 8.5$ Hz, 6H), 4.52 (td, $J = 8.4, 4.6$ Hz, 3H), 3.01 – 2.83 (m, 6H), 2.63 – 2.53 (m, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 171.89, 165.75, 148.98, 129.21, 128.74, 123.42, 55.50, 25.18. **ESI-MS**: m/z calc. for: $[\text{M-H}]^-$ 685.1301, found 685.1103.

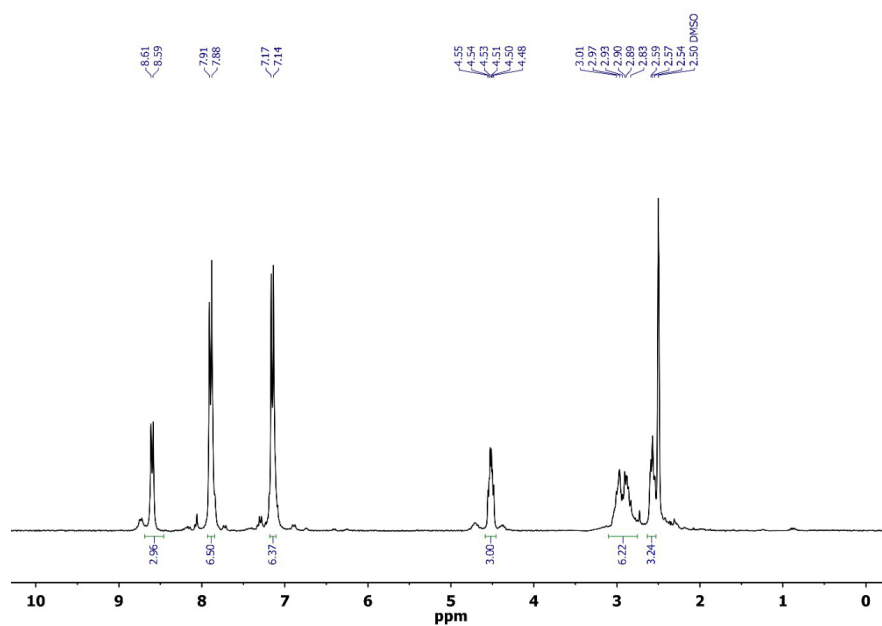


Figure S9: $^1\text{H NMR}$ spectrum of component **2** in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (300 MHz).

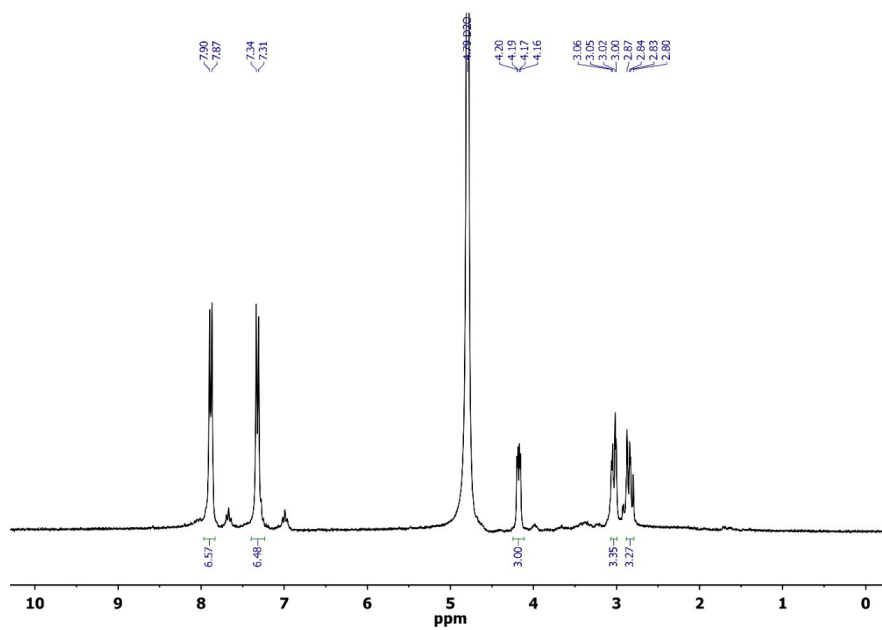


Figure S10: ^1H NMR spectrum of component **2** in D_2O at 298 K (300 MHz).

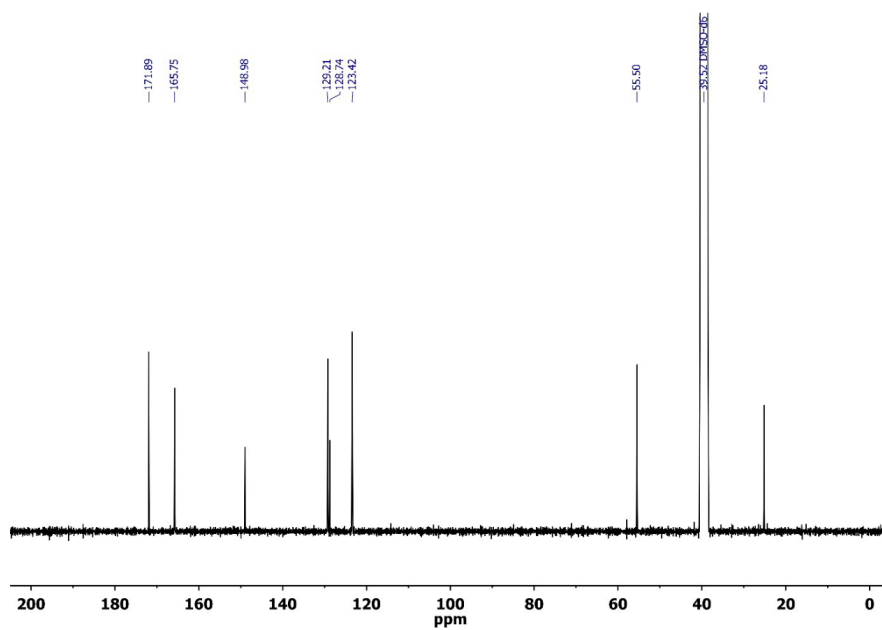
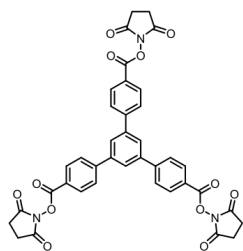


Figure S11: ^{13}C NMR spectrum of component **2** in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (75 MHz).

Synthesis of **3_AE**.



3_AE was synthesized according to procedure **1_AE**. 5'-[4-(4,4'-dicarboxyphenyl)-[1,1':3',1''-terphenyl]-4,4''-dicarboxylic acid (377 mg, 1 mmol, 1 equiv.), N-hydroxy succinimide (NHS) (580 mg, 5 mmol, 5 equiv.) and EDC-HCl (960 mg, 5 mmol, 5 equiv.) were dissolved in anhydrous DMF (40 mL) and stirred at room temperature for 24 h under argon. The solvent was removed and acetone (4 mL) was added into the oily residue and stirred to give a clear solution before being poured into 1M HCl (200 mL). A white, voluminous solid precipitated. It was filtered off, washed with H₂O and Et₂O, and dried under high vacuum. Yield 82%.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.24 (m, 15H), 2.92 (s, 12H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 170.37, 161.64, 146.00, 140.19, 130.59, 128.29, 126.48, 123.71, 25.60.

ESI-MS: m/z calc. for: [M-H]⁻ 728.3754, found 728.1324.

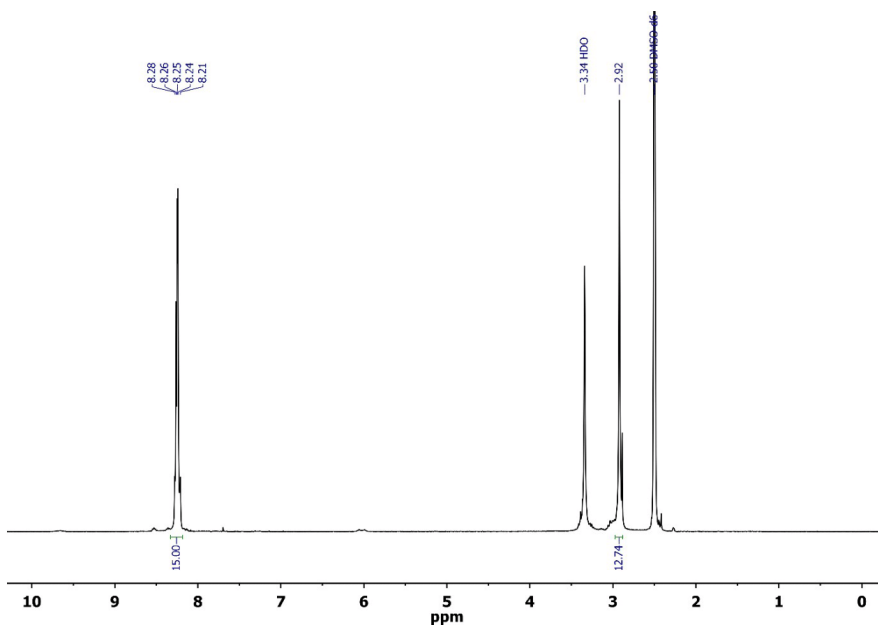


Figure S12: ¹H NMR spectrum of component **3_AE** in DMSO-*d*₆ at 298 K (300 MHz).

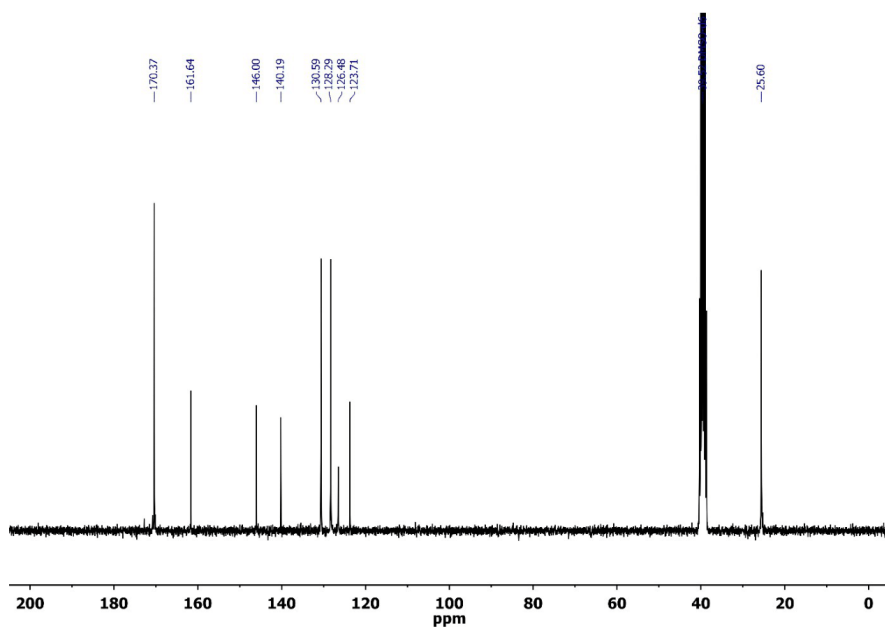
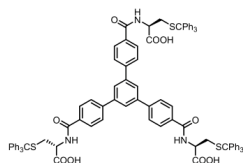


Figure S13: ^{13}C NMR spectrum of component **3_AE** in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (75 MHz).

Synthesis of **3_STR**



3_STR was synthesized according to procedure **1_STRt** using **3_AE**.

Activated ester **3_AE** (730 mg, 1 mmol, 1 equiv.) and *L*-Cys-STR-OH (1820 mg, 5 mmol, 5 equiv.) were dissolved in anhydrous DMF (100 mL), and Et₃N (1.0 mL, excess) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature before the solvent was removed and acetone (5 mL) added to the oily residue. The resulting mixture was poured dropwise into 1M HCl (100 mL) causing precipitation of a voluminous white solid. It was filtered off, washed with H₂O, and dried under high

vacuum. Yield 82%.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H), 8.08 – 8.04 (m, 15H), 7.43 – 7.09 (m, 45H), 4.36 (q, *J* = 8.5 Hz, 3H), 2.76 (t, *J* = 10.5 Hz, 3H), 2.64 – 2.51 (m, 3H). **¹³C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 171.75, 165.81, 144.29, 142.70, 140.82, 132.85, 129.11, 128.09, 127.77, 127.51, 127.17, 126.83, 67.02, 66.26, 25.14. **ESI-MS**: *m/z* calc. for: [M-H]⁻ 1473.8150, found 1473.4588.

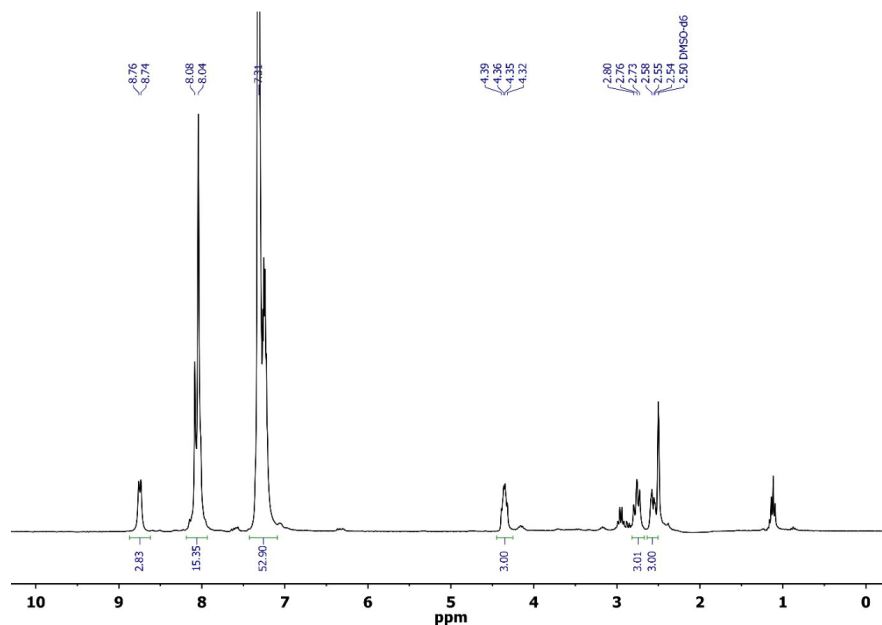


Figure S14: ¹H NMR spectrum of component **3_STR** in DMSO-*d*₆ at 298 K (300 MHz).

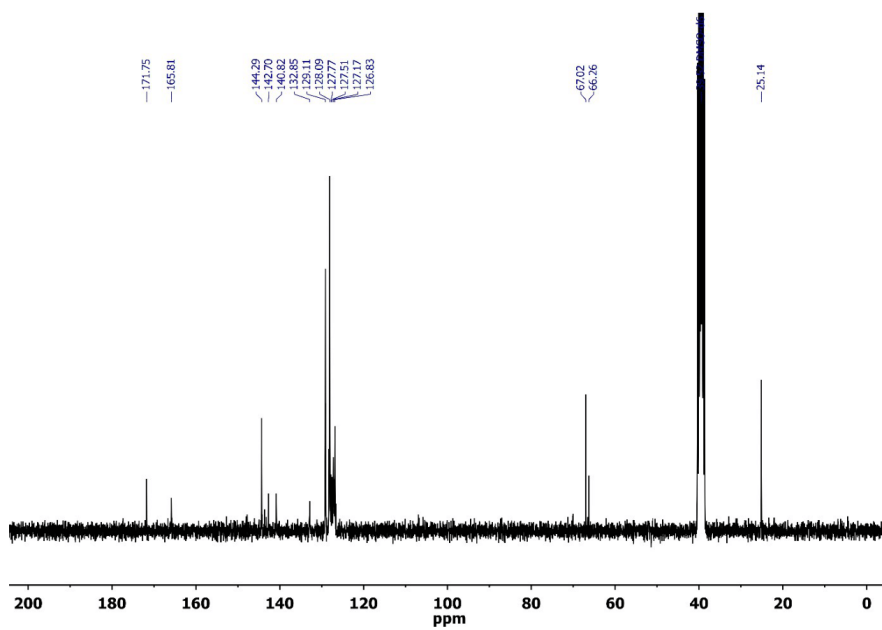
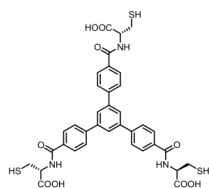


Figure S15: ^{13}C NMR spectrum of component **3_STr** in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (75 MHz).

Synthesis of **3**.



3 was synthesized according to procedure **1** using **3_STR**

3_STR (1475 mg, 1 mmol, 1 equiv.) was placed in an argon-purged flask and dissolved in 10 mL of DCM. 4 mL of TFA was added and after 30 min. of stirring, Et₃SiH (1.0 mL, 6 mmol, 6. equiv.) was added and stirring was continued for another 5 h. The liquids were removed under high vacuum and the voluminous solid residue was suspended in 20 mL of Et₂O, sonicated and filtered off. It was washed well with additional portions of Et₂O (5 x 20 mL) and dried under high vacuum. Yield 89%.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.88 (s, 3H), 8.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H), 8.07 (d, *J* = 6.7 Hz, 15H), 4.57 (td, *J* = 8.5, 4.7 Hz, 3H), 3.09 – 2.90 (m, 6H), 2.61 (t, *J* = 8.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 171.90, 166.25, 142.74, 140.90, 133.03, 129.05, 128.18, 127.20, 64.95, 25.26. ESI-MS: *m/z* calc. for: [M-H]⁻ 746.3564, found 746.1309.

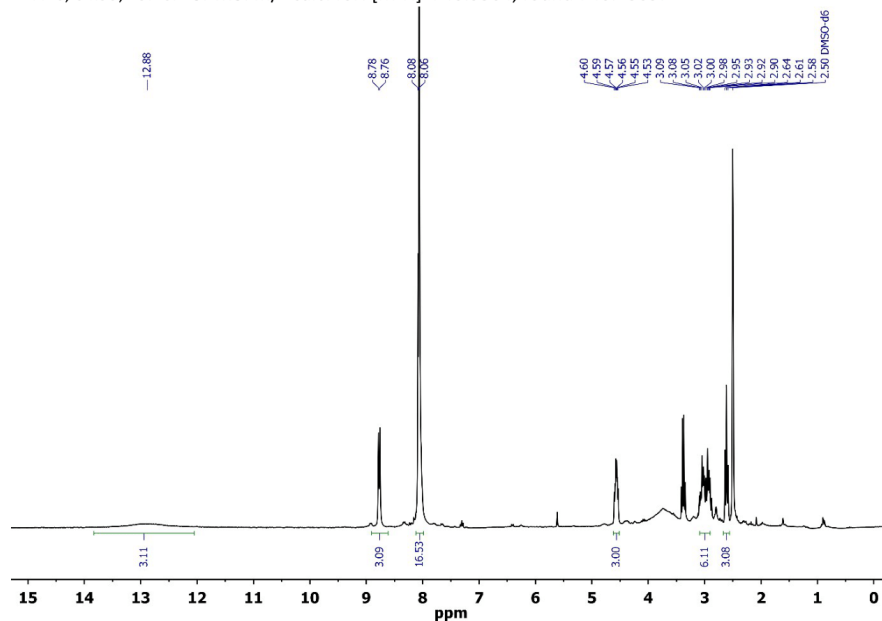


Figure S16: ¹H NMR spectrum of component **3** in DMSO-*d*₆ at 298 K (300 MHz).

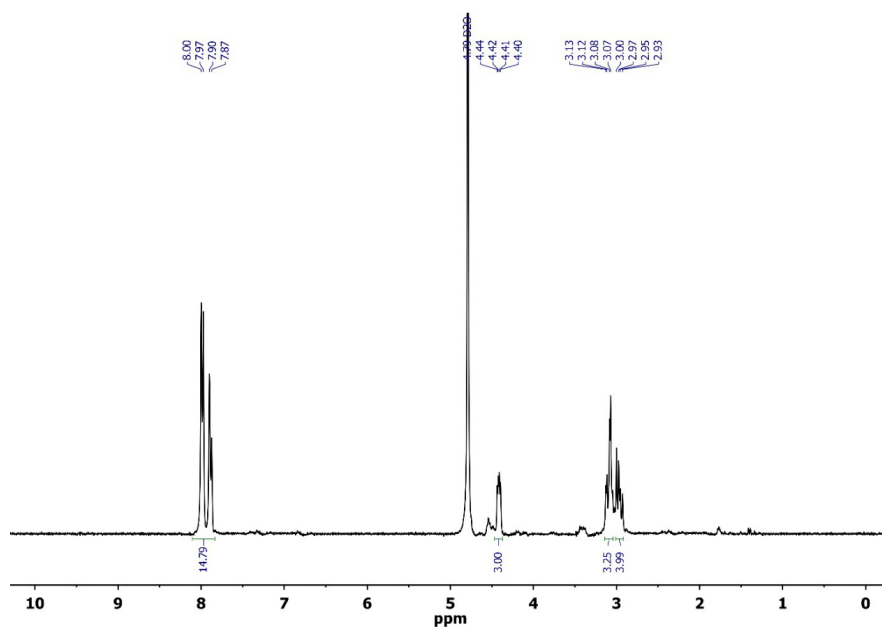


Figure S17: ^1H NMR spectrum of component **3** in D_2O at 298 K (300 MHz).

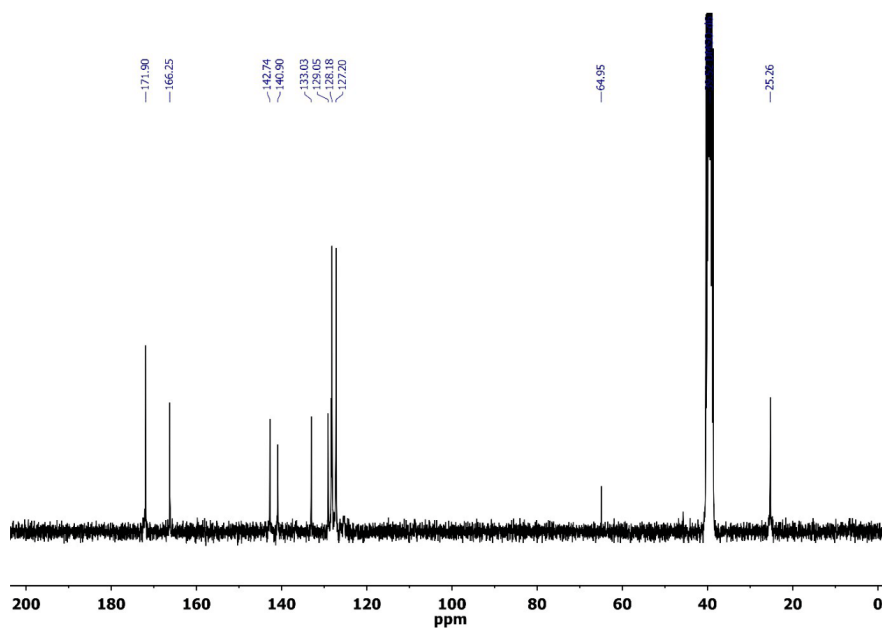
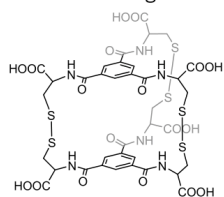


Figure S18: ^{13}C NMR spectrum of component **3** in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (75 MHz).

Synthesis and characterisation of homodimeric cages

Homodimeric cage 1-1.



Component **1** (52 mg, 0.1 mmol) was dissolved in aqueous NaOH (0.01 M, 20 mL) and the pH adjusted to 8 before stirring the solution for 3 days in a loosely capped vessel. The solution was then filtered through a Celite pad and acidified with 1M HCl to pH = 2, which caused the solution to become turbid. MeCN (20 mL) was added to give a clear solution before vacuum evaporation was used to reduce the volume to 10 mL, at which point a white solid precipitated. It was filtered off and dried under high vacuum. Yield 87%.

¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ : 8.14 (s, 6H), 4.68 (t, J = 6.8 Hz, 6H), 3.39 (dd, J = 13.9, 6.3 Hz, 6H), 3.04 (dd, J = 13.8, 7.6 Hz, 6H). **¹³C NMR** (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 171.92, 165.12, 132.96, 129.01, 51.53, 38.56. **HR-MS** in positive ion mode, calc for: [M+H]⁺ 1033.0483 m/z, found: [M+H]⁺ 1033.0449 m/z.

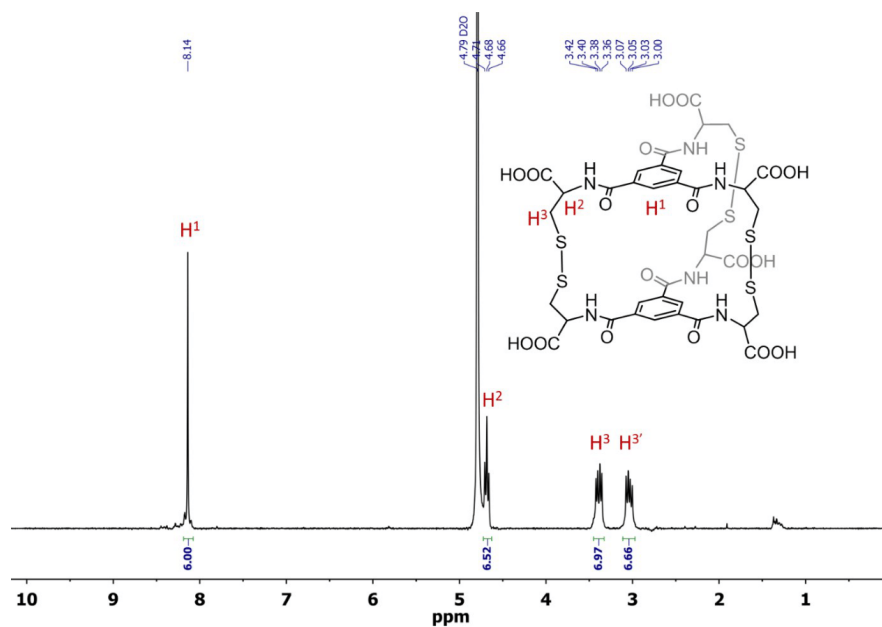


Figure S19: ¹H NMR spectrum of cage 1-1 in D₂O at 298 K (300 MHz).

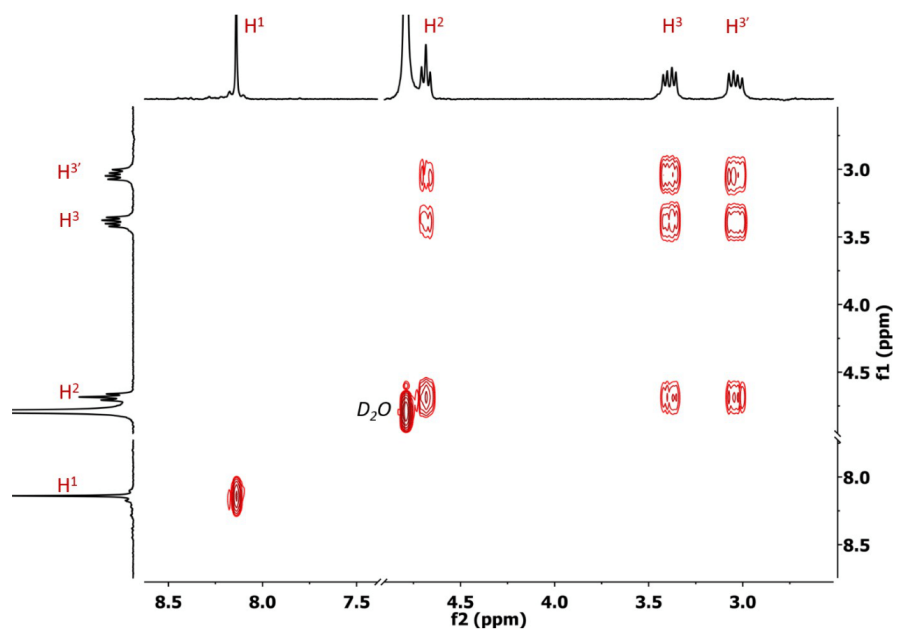


Figure S20: COSY NMR spectrum of cage 1-1 in D₂O at 298 K (300 MHz).

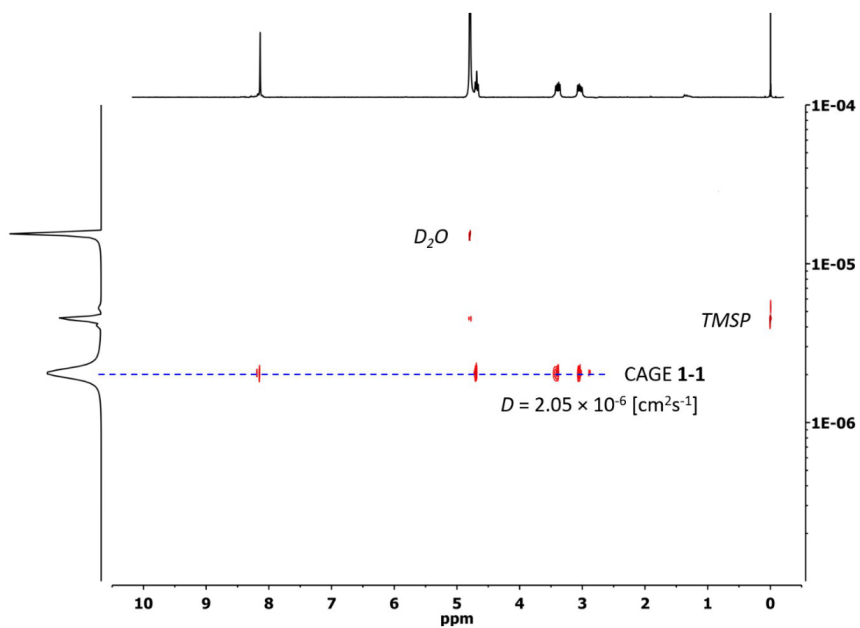


Figure S21: DOSY spectrum of cage 1-1 in D₂O at 298 K (700 MHz).

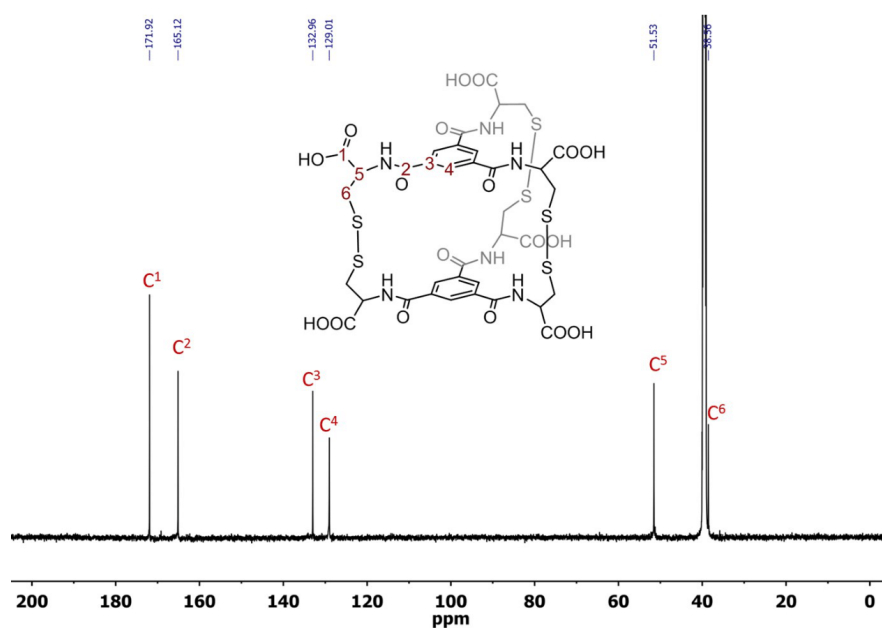


Figure S22: ^{13}C NMR spectrum of cage 1-1 in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (600 MHz).

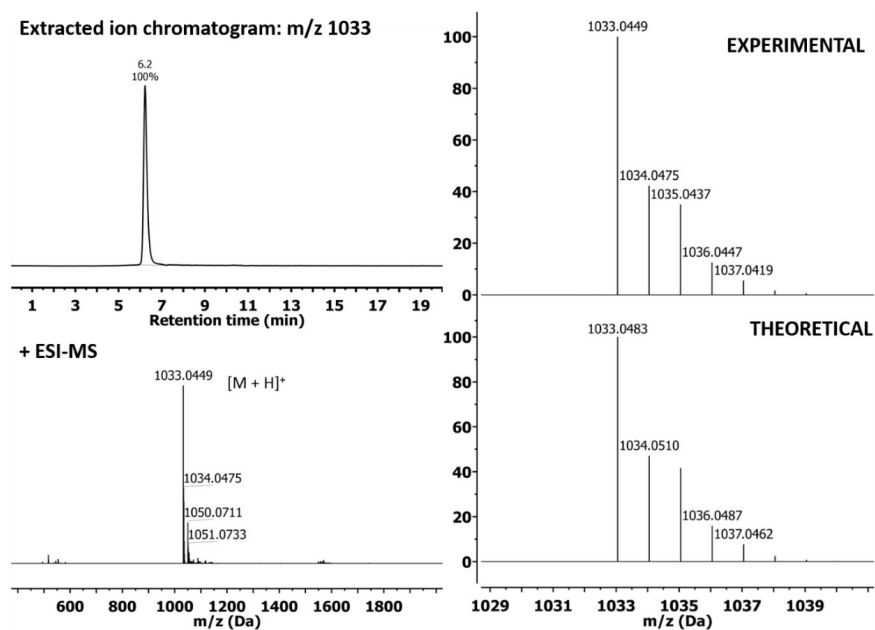
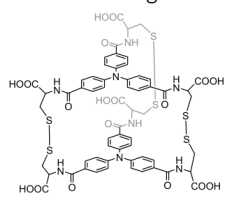


Figure S23: LC-MS analysis of cage 1-1.

Homodimeric cage 2-2.



2-2 was synthesized according to procedure **1-1** using **2**.

2 (68 mg, 0.1 mmol) was dissolved in aqueous NaOH (0.01 M, 20 mL) and the pH adjusted to 8 before stirring the solution for 3 days in a loosely capped vessel. The solution was then filtered through a Celite pad and acidified with 1M HCl to pH = 2 which caused the solution to become turbid. MeCN (20 mL) was added to give a clear solution before vacuum evaporation was used to reduce the volume to 10 mL, at which point a white solid precipitated. It was filtered off and dried under high vacuum. Yield 85%.

¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 7.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 6H), 7.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 6H), 4.72 – 4.65 (m, 3H), 3.39 (dd, *J* = 13.8, 5.6 Hz, 3H), 3.16 (dd, *J* = 14.0, 7.9 Hz, 3H). **¹³C NMR** (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.01, 165.67, 148.41, 129.10, 128.66, 122.98, 52.49, 40.06. **HR-MS** in positive ion mode, calc for: [M+H]⁺ 1367.1953 m/z, found: [M+H]⁺ 1367.1895 m/z.

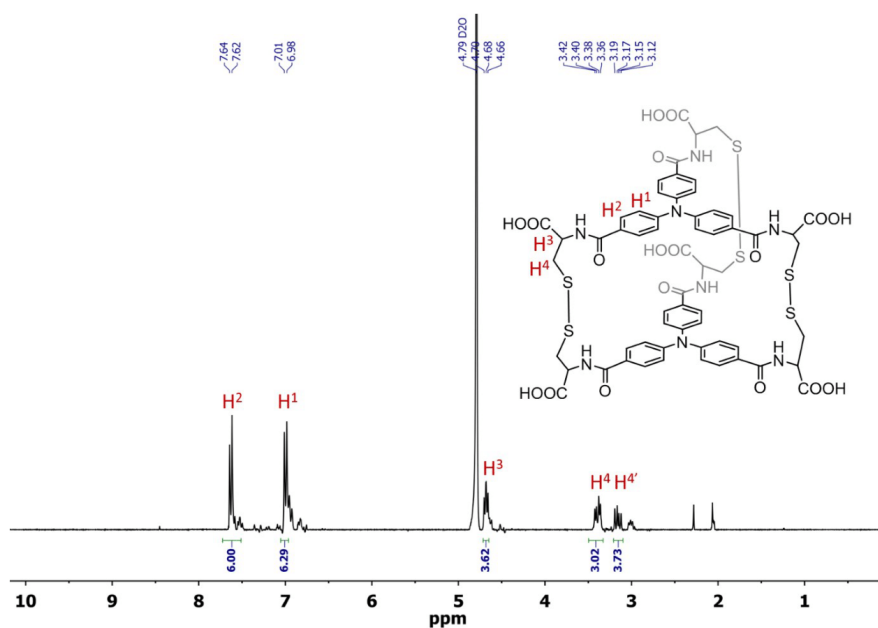


Figure S24: ¹H NMR spectrum of cage 2-2 in D₂O at 298 K (300 MHz).

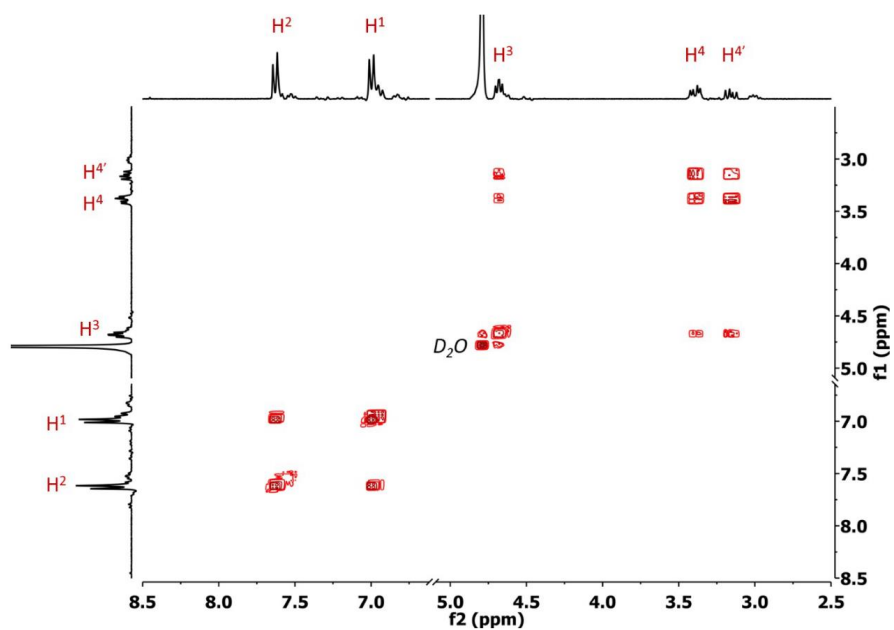


Figure S25: COSY NMR spectrum of cage 2-2 in D₂O at 298 K (300 MHz).

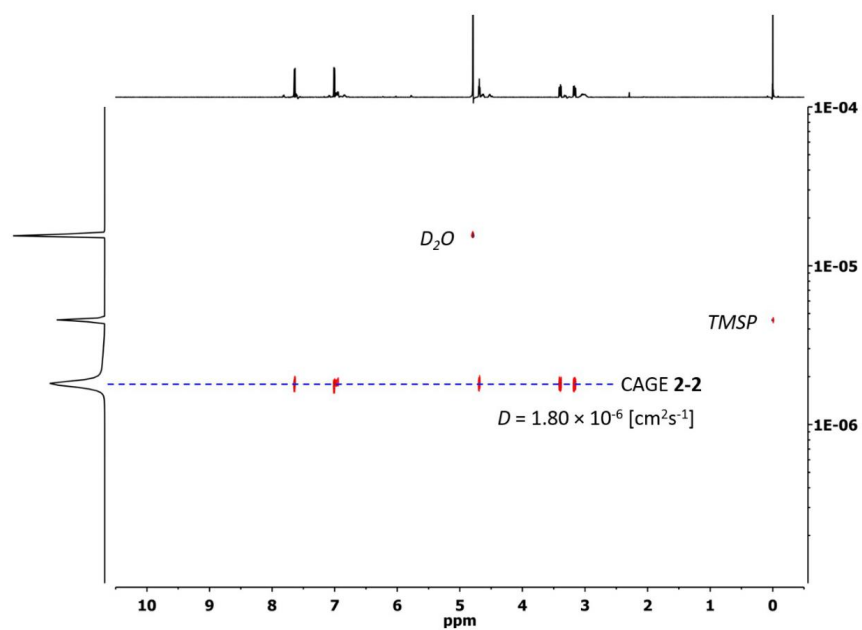


Figure S26: DOSY NMR spectrum of cage 2-2 in D₂O at 298 K (700 MHz).

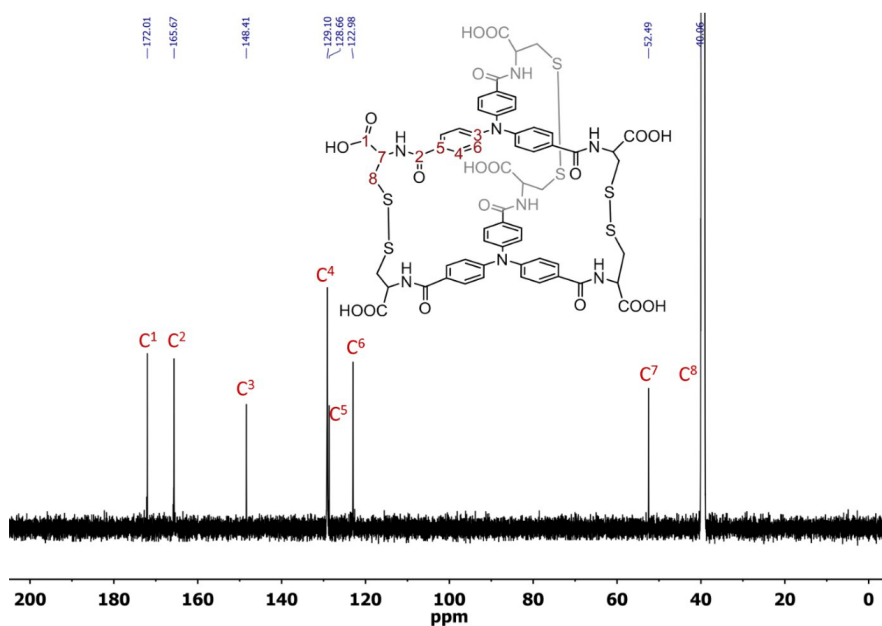


Figure S27: ^{13}C NMR spectrum of cage 2-2 in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (150 MHz).

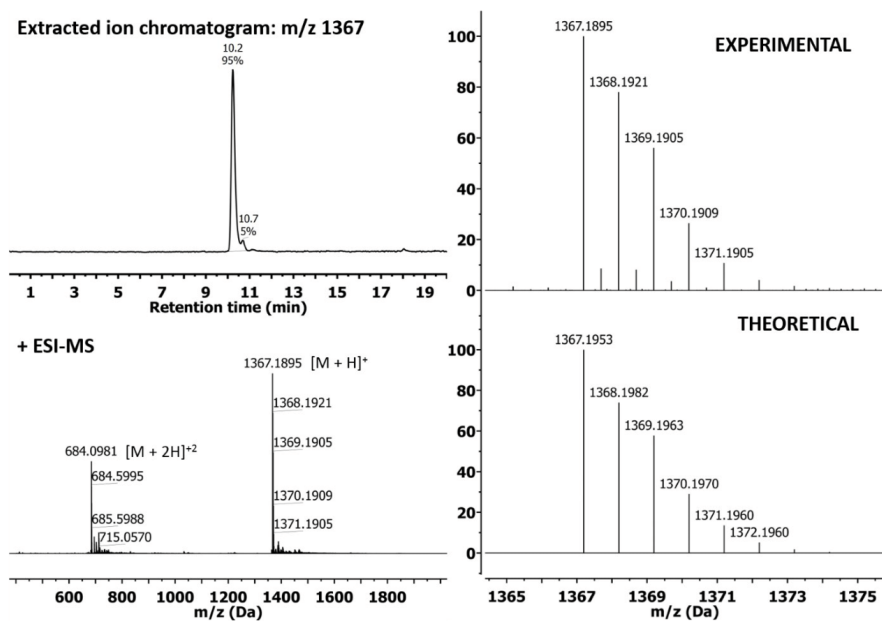
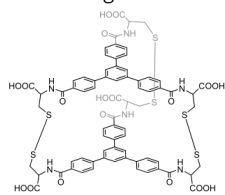


Figure S28: LC-MS analysis of cage 2-2.

Homodimeric cage **3-3**.



3-3 was synthesized according to procedure **1-1** using **3**.

3 (75 mg, 0.1 mmol) was dissolved in aqueous NaOH (0.01 M, 20 mL) and the pH adjusted to 8 before stirring the solution for 3 days in a loosely capped vessel. The solution was then filtered through a Celite pad and acidified with 1M HCl to pH = 2, which caused the solution to become turbid. MeCN (20 mL) was added to give a clear solution before vacuum evaporation was used to reduce the volume to 10 mL, at which point a white solid precipitated. It was filtered off and dried under high vacuum. Yield 82%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D₂O) δ : 7.65 (d, $J = 7.9$ Hz, 6H), 7.49 (d, $J = 7.8$ Hz, 6H), 7.40 (s, 3H), 4.73 (m, 3H), 3.40 (dd, $J = 13.6, 6.1$ Hz, 3H), 3.05 (dd, $J = 13.5, 7.3$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.16, 166.04, 141.88, 139.57, 128.10, 127.75, 127.04, 126.25, 51.97, 40.05. **HR-MS** in positive ion mode, calc for: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1489.2361 m/z, found: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1489.2295 m/z.

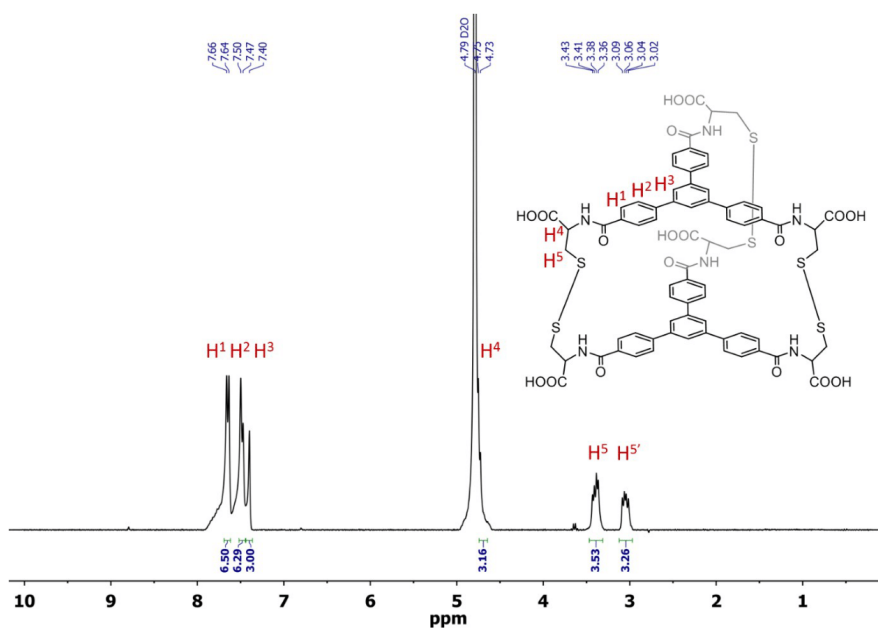


Figure S29: $^1\text{H NMR}$ spectrum of cage **3-3** in D₂O at 298 K (300 MHz).

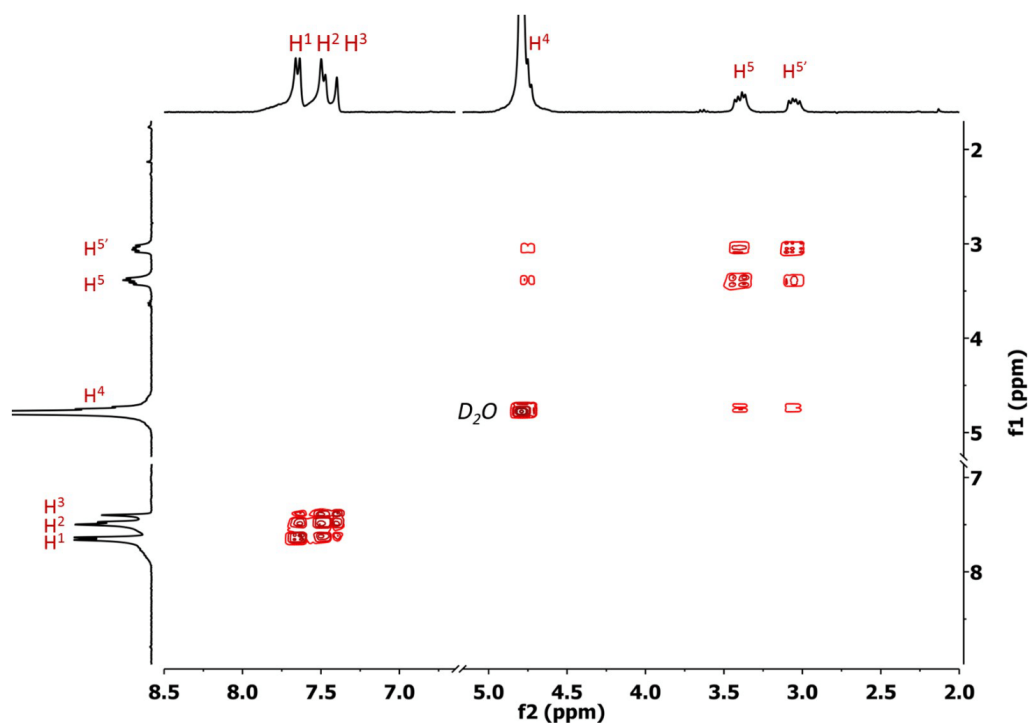


Figure S30: ^1H NMR spectrum of cage 3-3 in D_2O at 298 K (300 MHz).

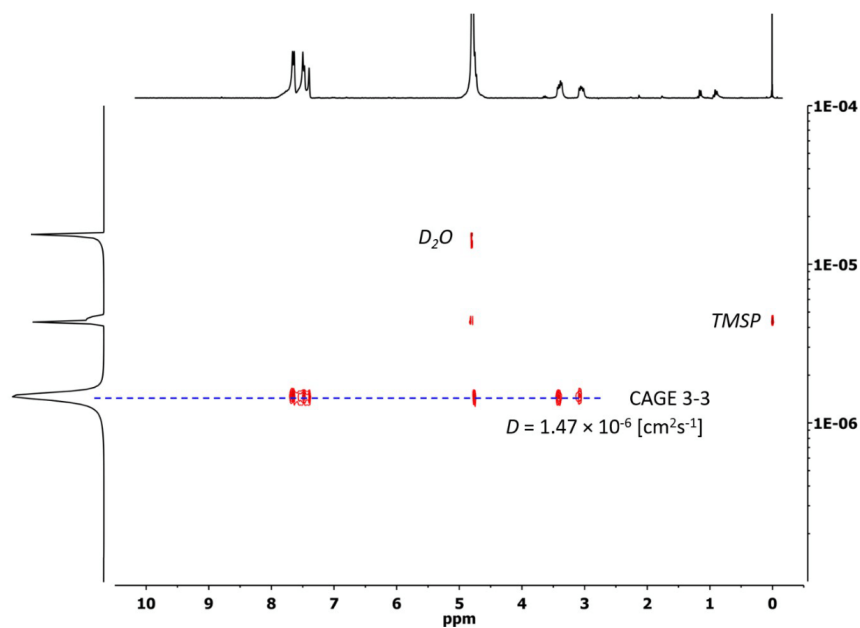


Figure S31: ^1H NMR spectrum of cage 3-3 in D_2O at 298 K (300 MHz).

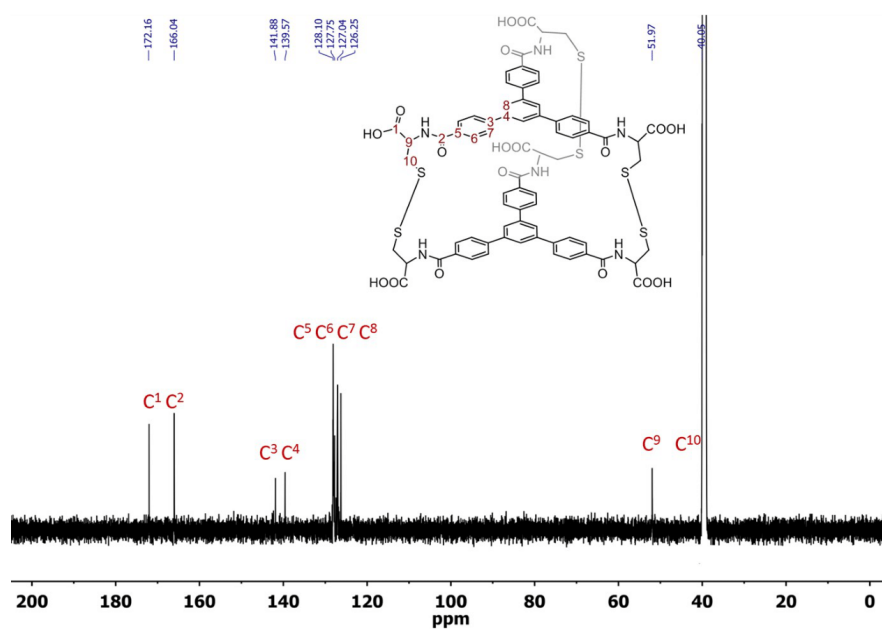


Figure S32: ^{13}C NMR spectrum of cage 3-3 in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (150 MHz).

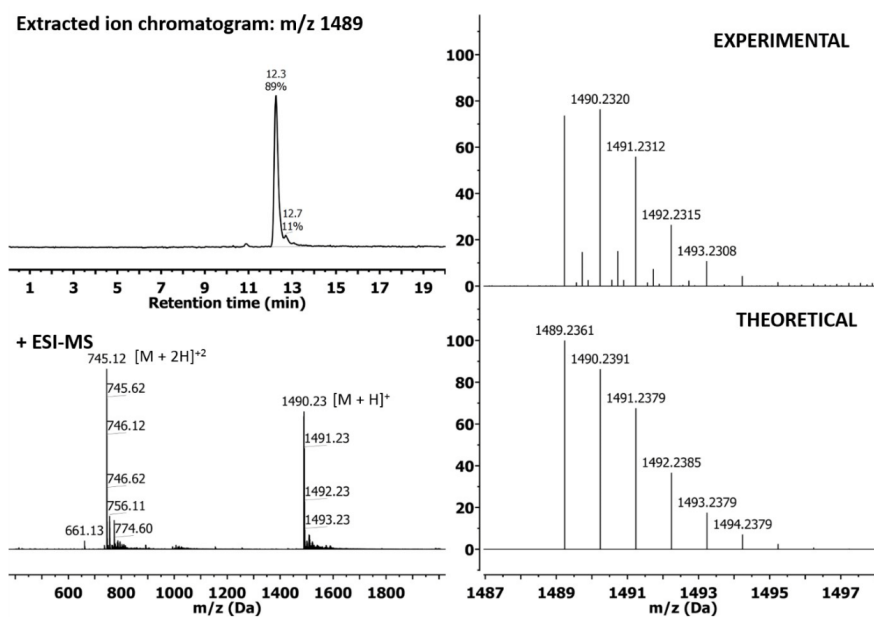
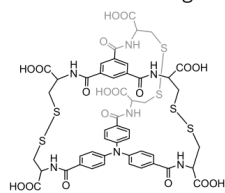


Figure S33: LC-MS analysis of cage 3-3.

Synthesis and characterisation of heterodimeric cages

Heterodimeric cage 1-2.



Component **1** (52 mg, 0.1 mmol) and component **2** (68 mg, 0.1 mmol) were dissolved in aqueous NaOH (0.01 M, 10 mL, pH adjusted to 8) and then stirred in a loosely capped vial for 5 days. The desired cage **1-2** was obtained from the post-reaction mixture via semipreparative HPLC.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ : 8.20 (s, 3H), 7.76 (d, $J = 8.1$ Hz, 6H), 6.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 6H), 4.57 (dd, $J = 10.4, 5.3$ Hz, 3H), 3.45 – 3.37 (m, 3H), 3.18 (dd, $J = 14.8, 9.4$ Hz, 3H), 3.04 (q, $J = 10.6, 8.9$ Hz, 3H), 2.78 (dd, $J = 12.8, 5.8$ Hz, 3H). **HR-MS** in positive ion mode, calc for: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1200.1218 m/z, found: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1200.1474 m/z.

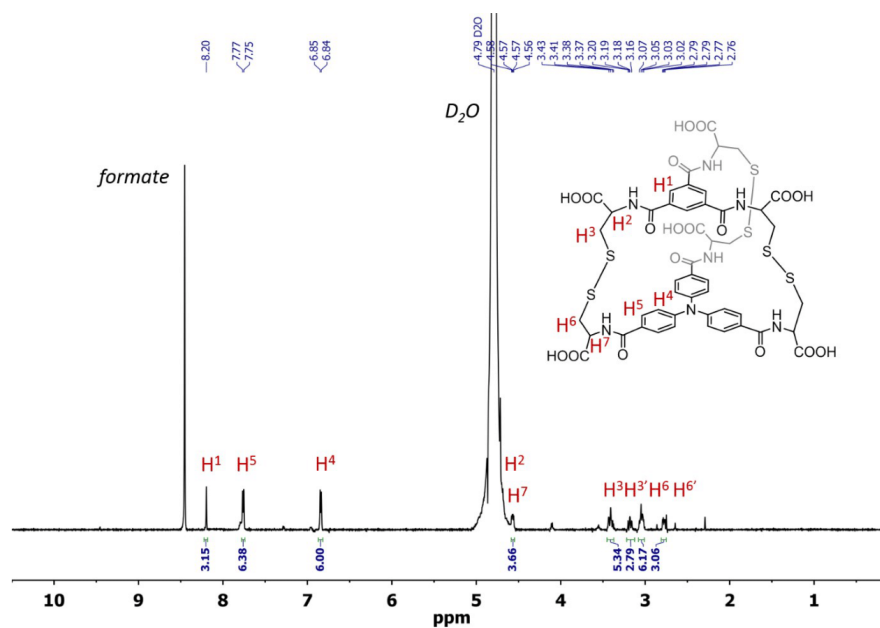


Figure S34: $^1\text{H NMR}$ spectrum of cage **1-2** in D_2O at 298 K (600 MHz).

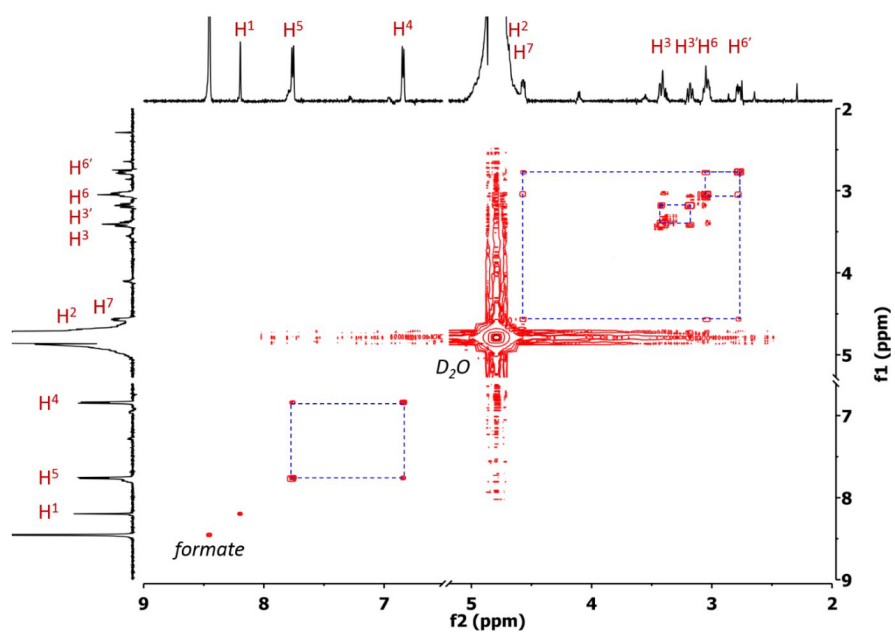


Figure S35: COSY spectrum of cage 1-2 in D₂O at 298 K (600 MHz).

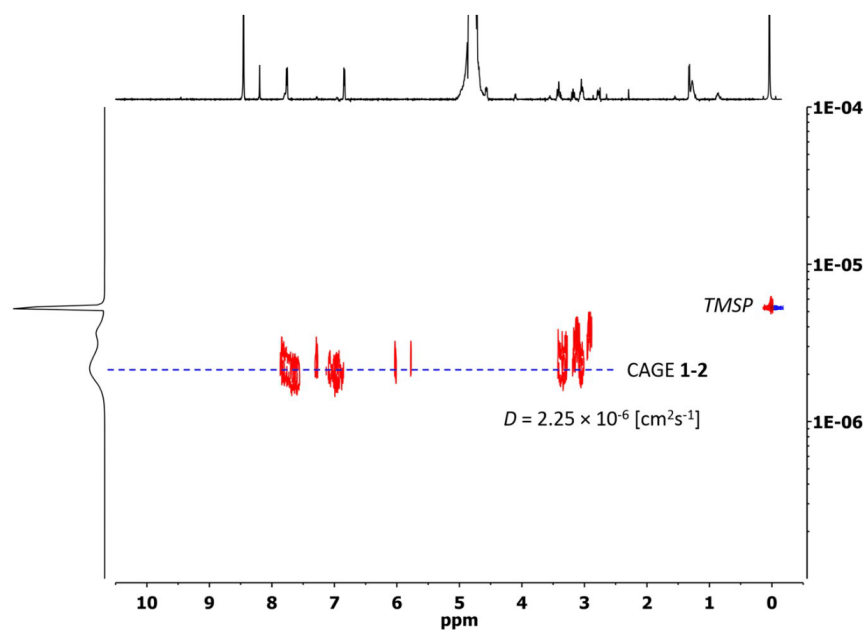


Figure S36: DOSY spectrum of cage 1-2 in D₂O at 298 K (500 MHz).

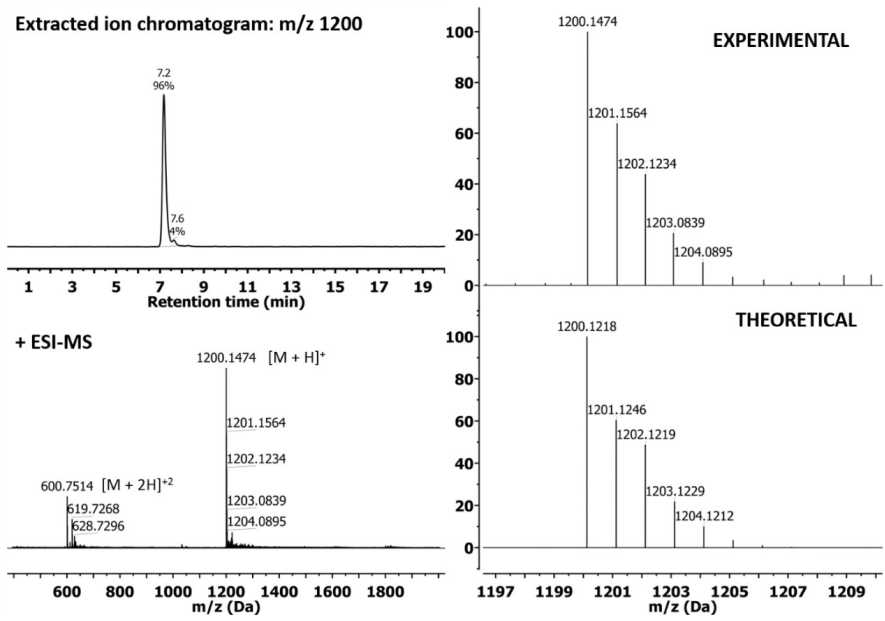
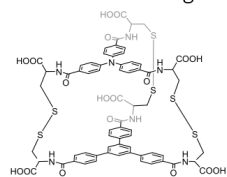


Figure S37: LC-MS analysis of cage 1-2.

Heterodimeric cage 2-3.



Component **2** (68 mg, 0.1 mmol) and component **3** (75 mg, 0.1 mmol) were dissolved in aqueous NaOH (0.01 M, 10 mL, pH adjusted to 8) and then stirred in a loosely capped vial for 5 days. Then the desired cage **1-2** was obtained from the post-reaction mixture via semipreparative HPLC.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ : 7.95 (s, 3H), 7.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 6H), 7.80 (d, $J = 8.1$ Hz, 6H), 7.40 (d, $J = 8.3$ Hz, 6H), 6.56 (d, $J = 8.3$ Hz, 6H), 4.75 (d, $J = 4.4$ Hz, 3H), 4.69–4.65 (m, 3H), 3.46 (dd, $J = 13.9, 3.9$ Hz, 3H), 3.25 (dd, $J = 13.3, 8.7$ Hz, 3H), 3.18 (dd, $J = 13.8, 9.9$ Hz, 3H), 2.88 (dd, $J = 13.3, 5.6$ Hz, 3H).
HR-MS in positive ion mode, calc for: $[\text{M}+\text{H}]^+ 1428.2157$ m/z, found: $[\text{M}+\text{H}]^+ 1428.2106$ m/z.

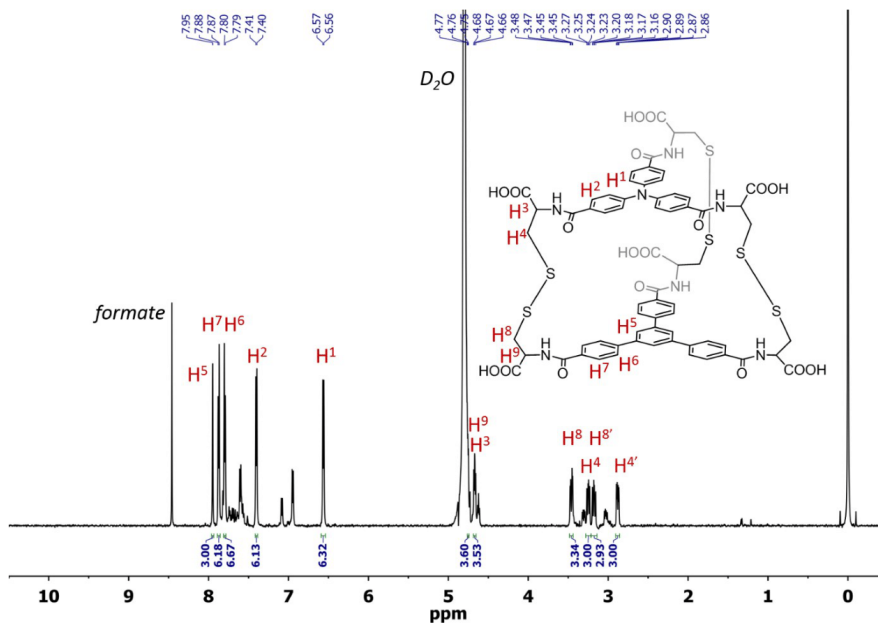


Figure S38: $^1\text{H NMR}$ spectrum of cage **2-3** in D_2O at 298 K (600 MHz).

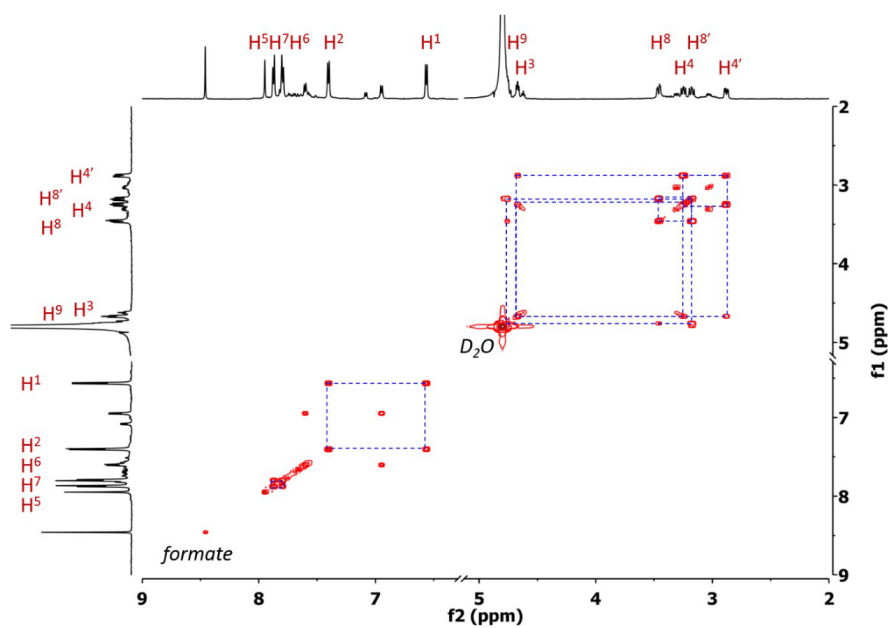


Figure S39: COSY spectrum of cage 2-3 in D₂O at 298 K (600 MHz).

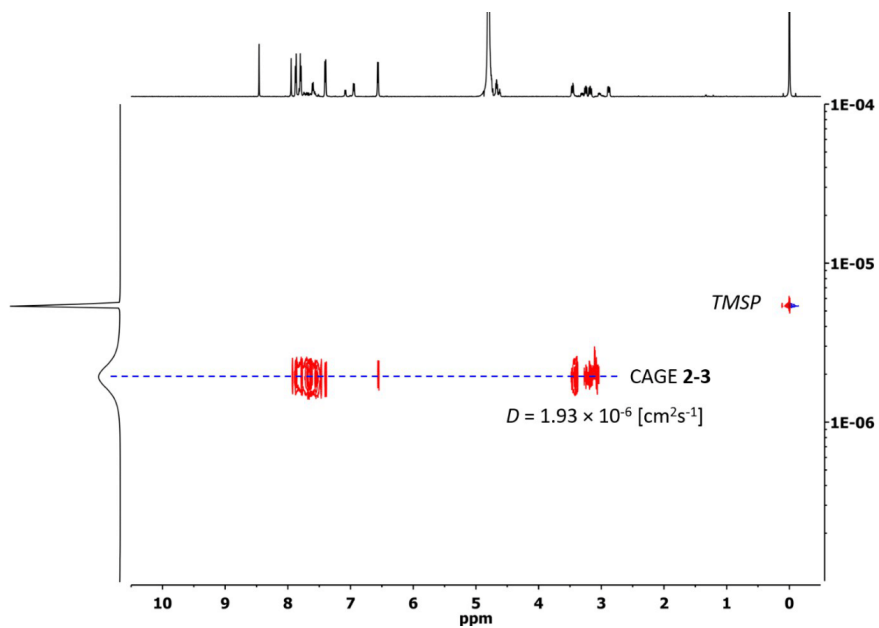


Figure S40: DOSY spectrum of cage 2-3 in D₂O at 298 K (500 MHz).

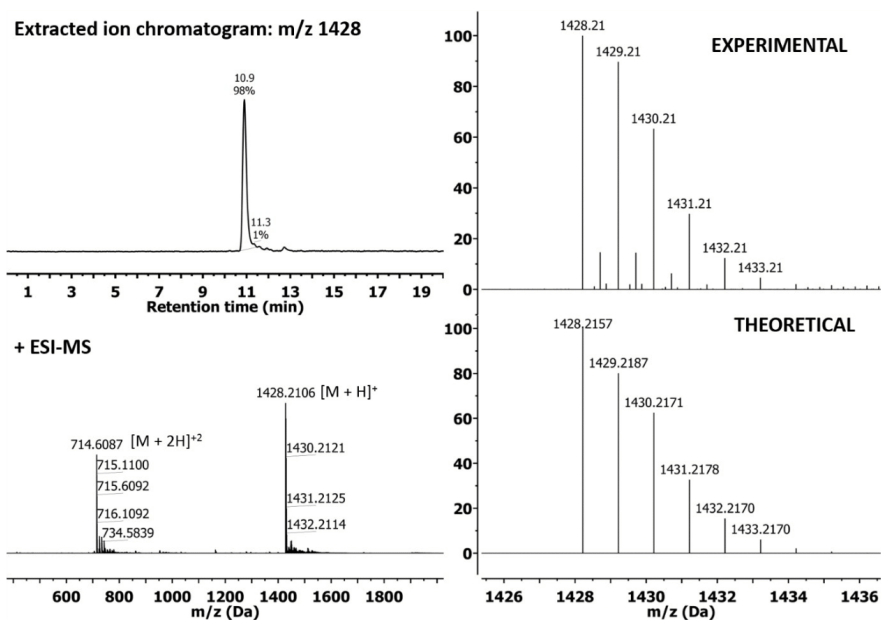


Figure S41: LC-MS analysis of page 2-3.

HPLC-MS Data

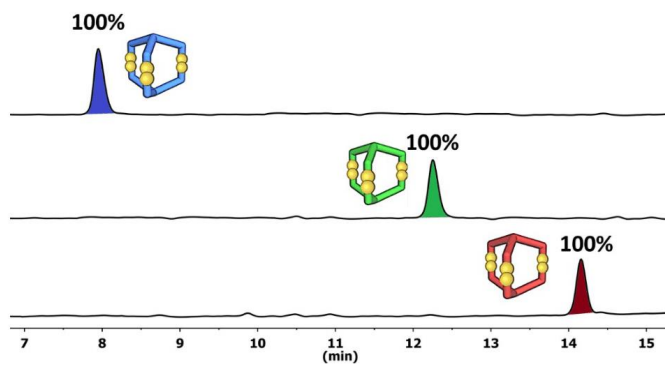


Figure S42: HPLC chromatograms of homodimeric cages post-reaction mixtures (254 nm) showing the exclusive formation of a single cage-like product.

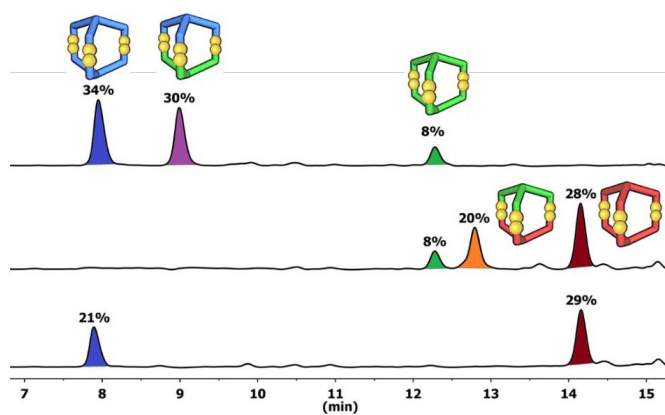


Figure S43: HPLC chromatograms of post-reaction mixtures (254 nm) showing formation of homo and heterodimeric cages. The bottom chromatogram shows no formation of a potential 1-3 cage.

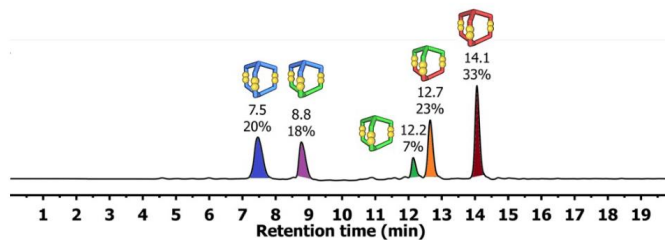


Figure S44: HPLC chromatograms (254 nm) of post-reaction DCL containing an equimolar mixture of all five cages.

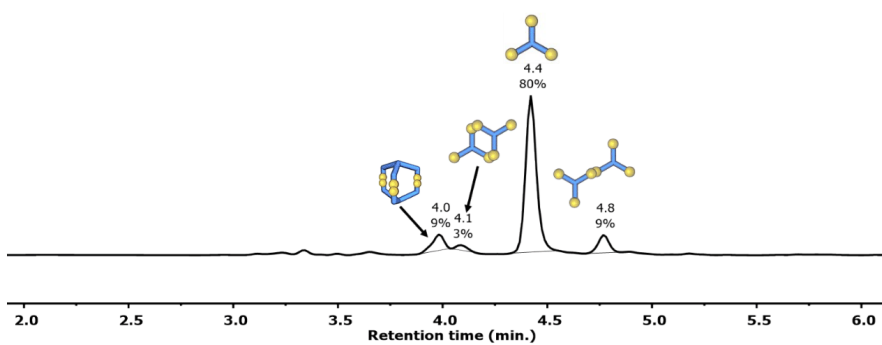


Figure S45: HPLC chromatogram (254 nm) of reaction DCL mixture containing **1** after 60 min.

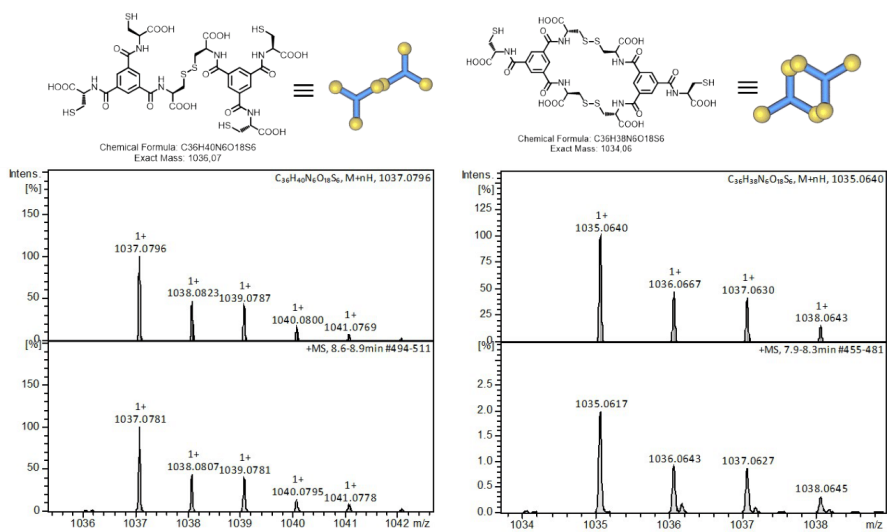


Figure S46: Mass analysis of **1** intermediates during reaction after 60 min.

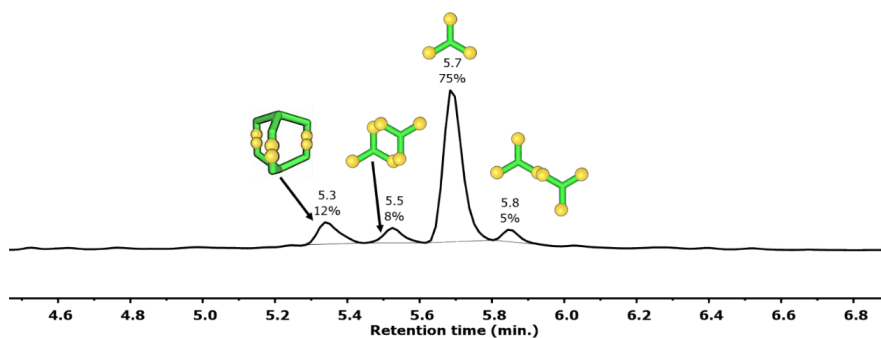


Figure S47: HPLC chromatogram (254 nm) of reaction DCL mixture containing **2** after 60 min.

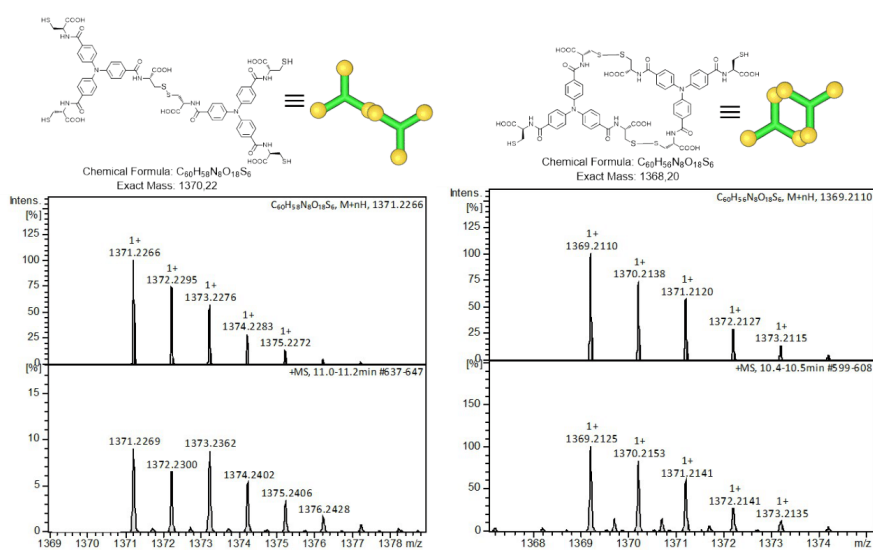


Figure S48: Mass analysis of **2** intermediates during reaction after 60 min.

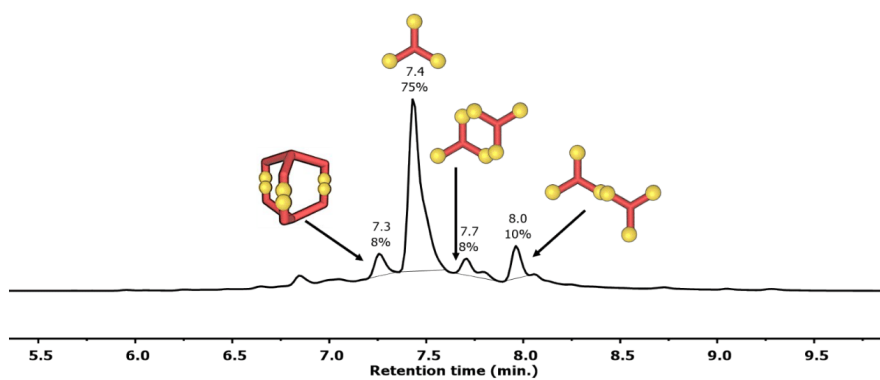


Figure S49: HPLC chromatogram (254 nm) of reaction DCL mixture containing **3** after 60 min.

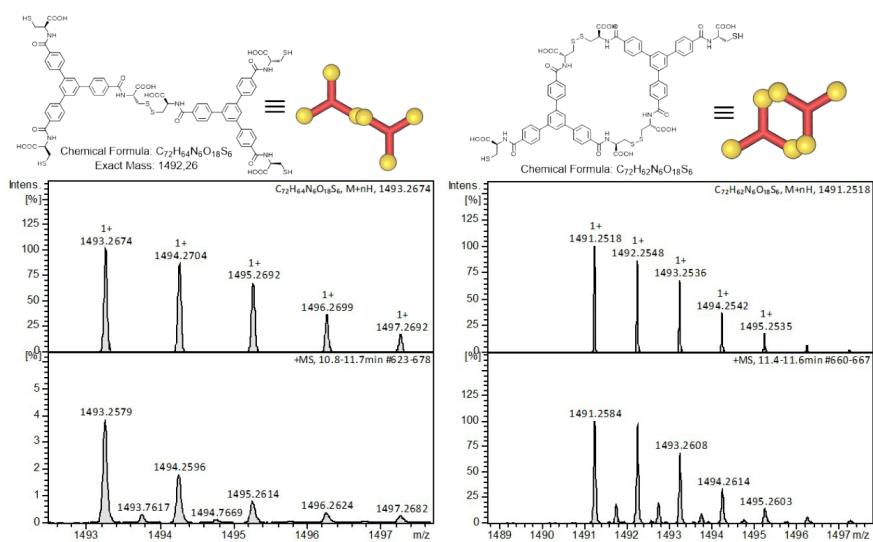


Figure S50: Mass analysis of **3** intermediates during reaction after 60 min.

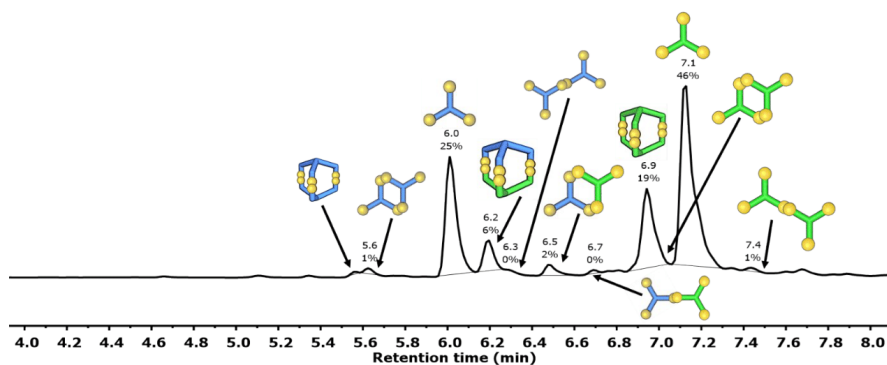


Figure S51: HPLC chromatogram (254 nm) of reaction DCL mixture containing equimolar 1+2 after 60 min.

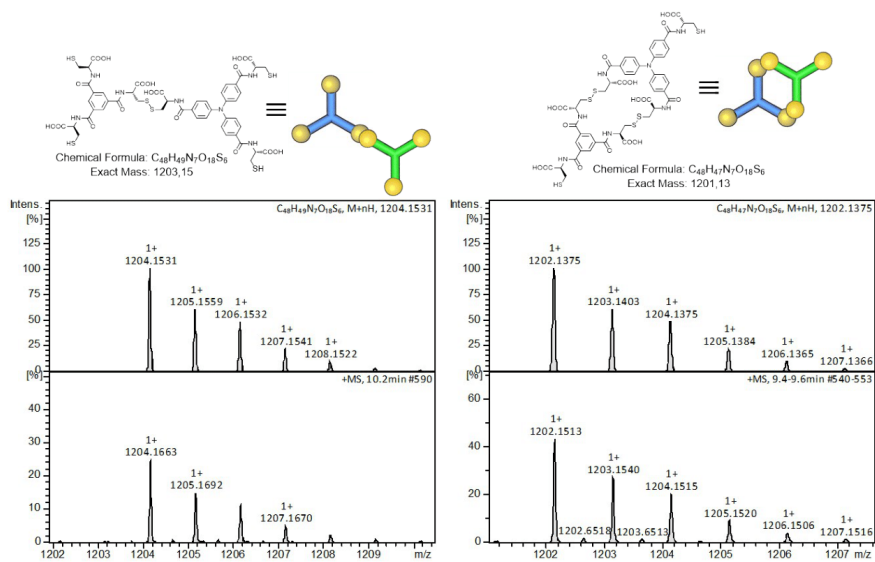


Figure S52: Mass analysis of 1+2 mixture intermediates during reaction after 60 min.

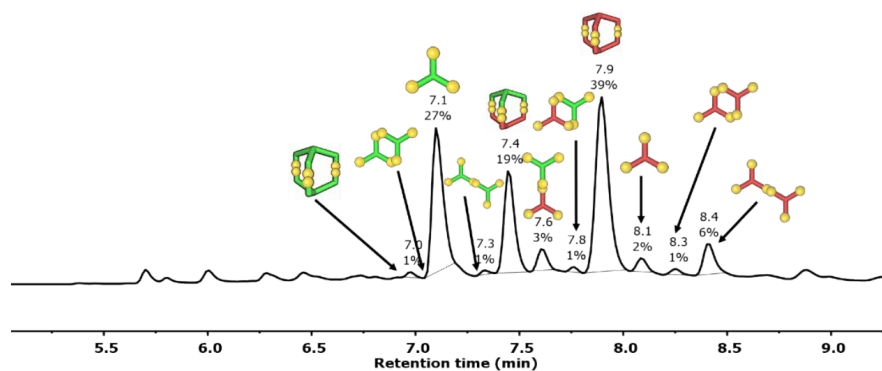


Figure S53: HPLC chromatogram (254 nm) of reaction DCL mixture containing equimolar **2+3** after 60 min.

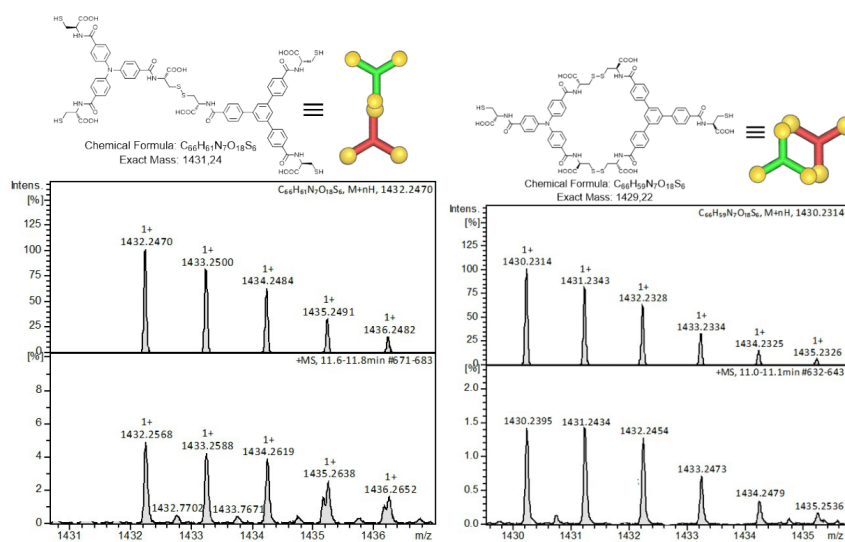


Figure S54: Mass analysis of **2+3** mixture intermediates during reaction after 60 min.

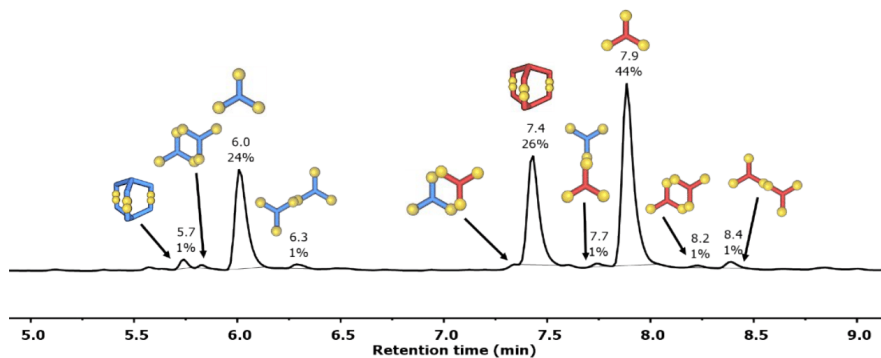


Figure S55: HPLC chromatogram (254 nm) of reaction DCL mixture containing equimolar **1+3** after 60 min.

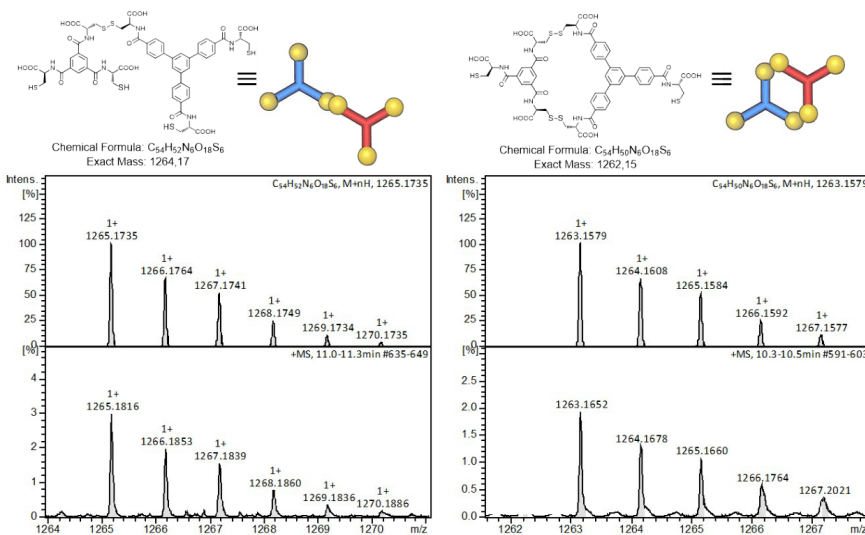


Figure S56: Mass analysis of **1+3** mixture intermediates during reaction after 60 min.

UV-Vis Data

Relative peak area [%] (HPLC, 254 nm)				
cage	L50-01	L50-02	L50-03	L50-04
c1-1	27	18	21	8
c1-2	23	31	29	28
c2-2	11	19	13	26
c2-3	17	18	21	31
c3-3	22	14	16	7

Relative peak area corrected for molar extinction coefficients				
cage	1:1:1	1:2:1	1:3:1	1:8:1
c1-1	20	16	13	6
c1-2	20	25	27	24
c2-2	22	26	38	52
c2-3	19	23	20	34
c3-3	20	15	13	6

Normalized relative peak area				
cage	1:1:1	1:2:1	1:3:1	1:8:1
c1-1	0,20	0,15	0,12	0,05
c1-2	0,20	0,24	0,24	0,20
c2-2	0,20	0,25	0,34	0,42
c2-3	0,20	0,22	0,18	0,28
c3-3	0,20	0,14	0,11	0,05

% change			
cage	1:2:1	1:3:1	1:8:1
1-1	-0,0514	-0,0799	-0,1519
1-2	0,0410	0,0428	-0,0022
2-2	0,0484	0,1423	0,2225
2-3	-0,0230	0,0198	0,0799
3-3	-0,0610	-0,0854	-0,1483

Figure S57: Supplementary table for Fig 5. Calculations of percentage changes in DCLs distribution depending on various concentration of component 2.

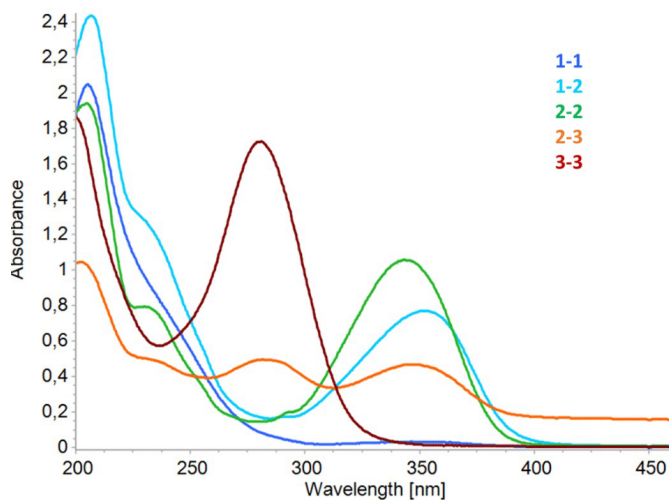


Figure S58: UV-VIS spectra of five dimeric cages in water (pH 8.0, conc. $5 \times 10^{-5} \text{M}$, $1 \times 1 \text{ cm}$).

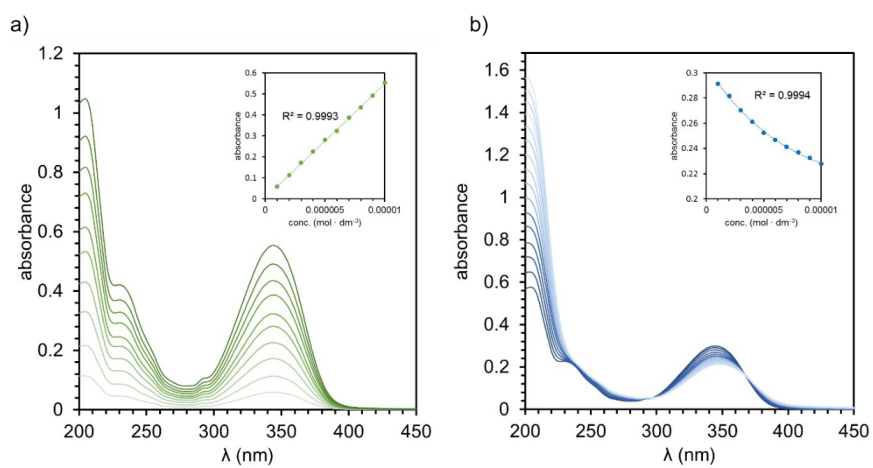


Figure S59: a) UV-VIS spectra of **2-2** (pH 8.0, conc. 10^{-6} M - 10^{-5} M, 1×1 cm), b) UV-VIS titration of cage **2-2** with La^{3+} in water (pH 8.0, conc. 5×10^{-5} M, 1×1 cm, 0-3 equiv., 0.3 equiv./step).

Computational data

We started with conformational analysis performed under the Spartan'14 software, using Monte Carlo methods and, where necessary, with more relaxed conformer search conditions. Candidates for further calculations were selected from the results and initially optimised with the semiempirical RM1 method (Recife Model 1).^[2] The decisive factors in choosing a given structure were the lowest energy and the proper symmetry. This last condition was due to the NMR data that clearly showed the formation of highly symmetrical species. This optimization revealed that the homodimeric cages assume D_3 symmetry, while heterodimeric cages assume C_3 symmetry, in line with the experimental observations. Then, the selected conformers were further optimised by DFT b3lyp calculations using Grimme dispersion functions (GD3) and Becke-Johnes damping (BJ) functions to predict long-range interactions.^[3] The basis set used was Pople's 6-31g+(d), with additional diffusion functions to correctly represent the behavior of anions, and polarization functions for heavy atoms.

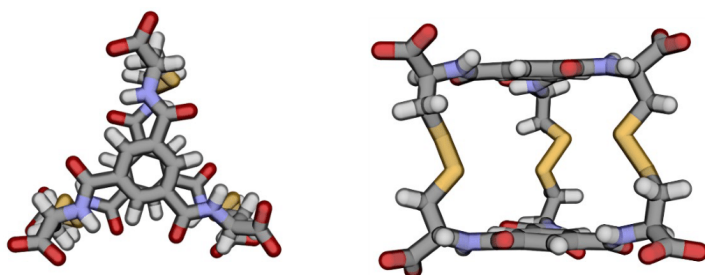


Figure S60: Optimised structure of cage 1-1, top and side view.

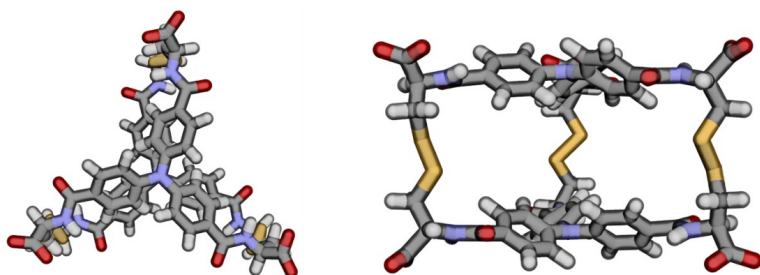


Figure S61: Optimised structure of cage 2-2, top and side view.

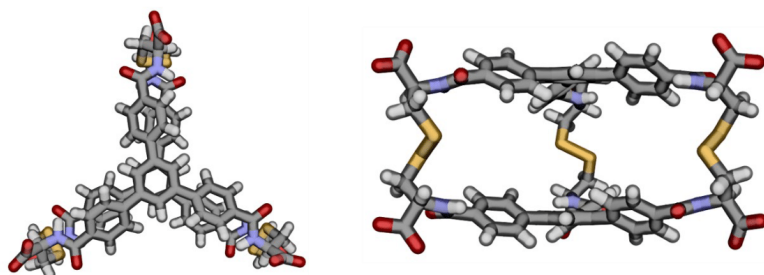


Figure S62: Optimised structure of cage 3-3, top and side view.

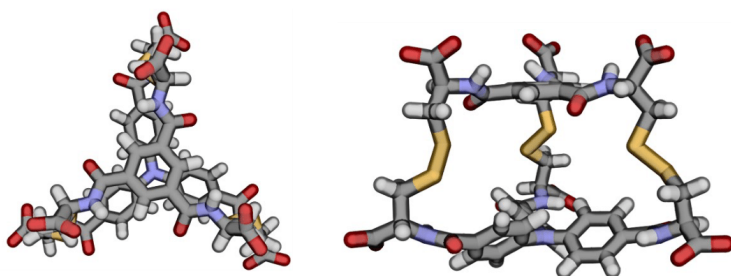


Figure S63: Optimised structure of cage 1-2, top and side view.

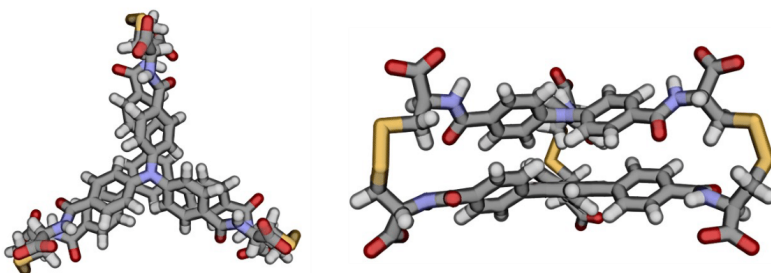


Figure S64: Optimised structure of cage 2-3, top and side view.

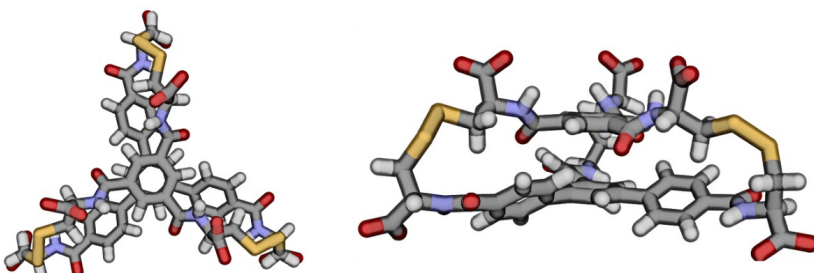


Figure S65: Optimised structure of cage 1-3, top and side view.

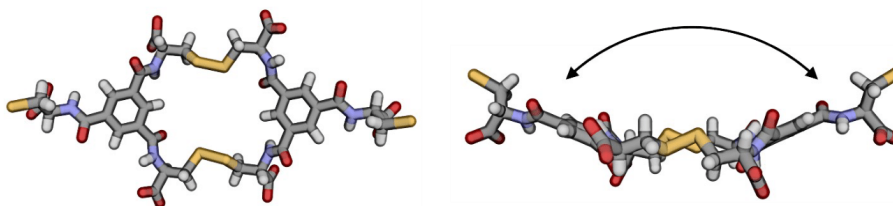


Figure S66: Optimised structure of **1B**, top and side view.

S43

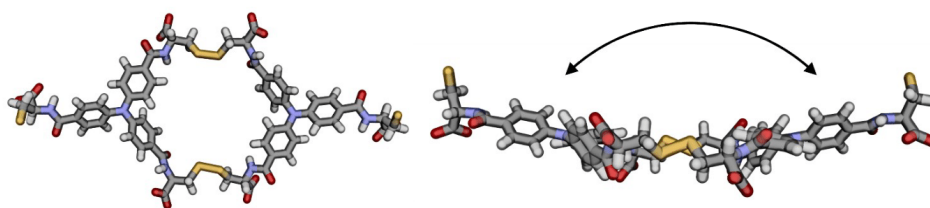


Figure S67: Optimised structure of **2B**, top and side view.

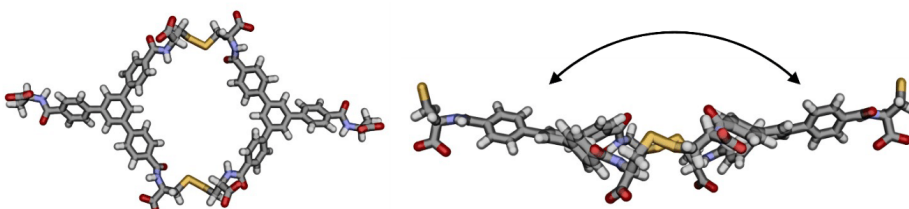


Figure S68: Optimised structure of **3B**, top and side view.

Compound	Energy [Ha]	Relative energy* [Ha]	Relative energy* [kcal/mol]	Energy difference between cage and macrocyclic intermediate, ΔE [kcal/mol]
1B	-5461,4	0,2	127	-127
1-1	-5461,6	0	0	
2B	-6496,7	0,4	248	-248
2-2	-6497,1	0	0	
3B	-6848,2	0,3	210	-210
3-3	-6848,6	0	0	

* energies relative to corresponding cage total energy = 0 kcal/mol.

Figure S69: Comparison of calculated relative energies of cages and macrocyclic intermediate products.

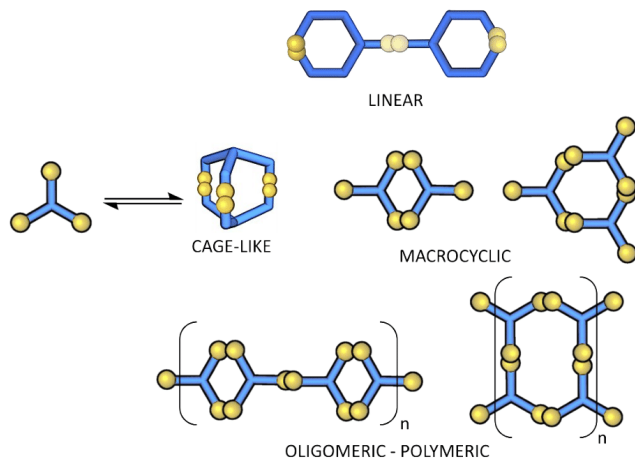


Figure S70: Numerous possibilities of combinatorial connections between the three trifunctional components.

Solid state analysis of 2-2-La

Synthesis of 2-2La

The 68 mg (5×10^{-5} mol) of **2-2** was dissolved in water (2 mL) via NaOH (0.1M) titration to pH 8. Then the solution of $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (44 mg, 10^{-4} mol, 2 equiv., 2 mL) was added with vigorous stirring. The pale-yellow solid immediately precipitated. The mixture was then stirred for another 15 min at r.t. and centrifuged for 10 min. The supernatant was removed and the solid material was dried under a high vacuum. Yield 78 mg.

Elemental microanalysis (NCHS) calculated for $\text{LaNa}_3(\mathbf{2-2}) \cdot \text{La}(\text{OH})_3 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_{60}\text{H}_{99}\text{La}_2\text{N}_8\text{Na}_3\text{O}_{45}\text{S}_6$: C 32.88%, H 4.55%, La 12.68%, N 5.11%, Na 3.15%, O 32.85%, S 8.78%, found: C 32.32%, H 3.39%, N 3.67%, S 8.90%.

ICP-MS (La) calculated for $\text{LaNa}_3(\mathbf{2-2}) \cdot \text{La}(\text{OH})_3 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_{60}\text{H}_{99}\text{La}_2\text{N}_8\text{Na}_3\text{O}_{45}\text{S}_6$: La 12.68%, found 10.66%.

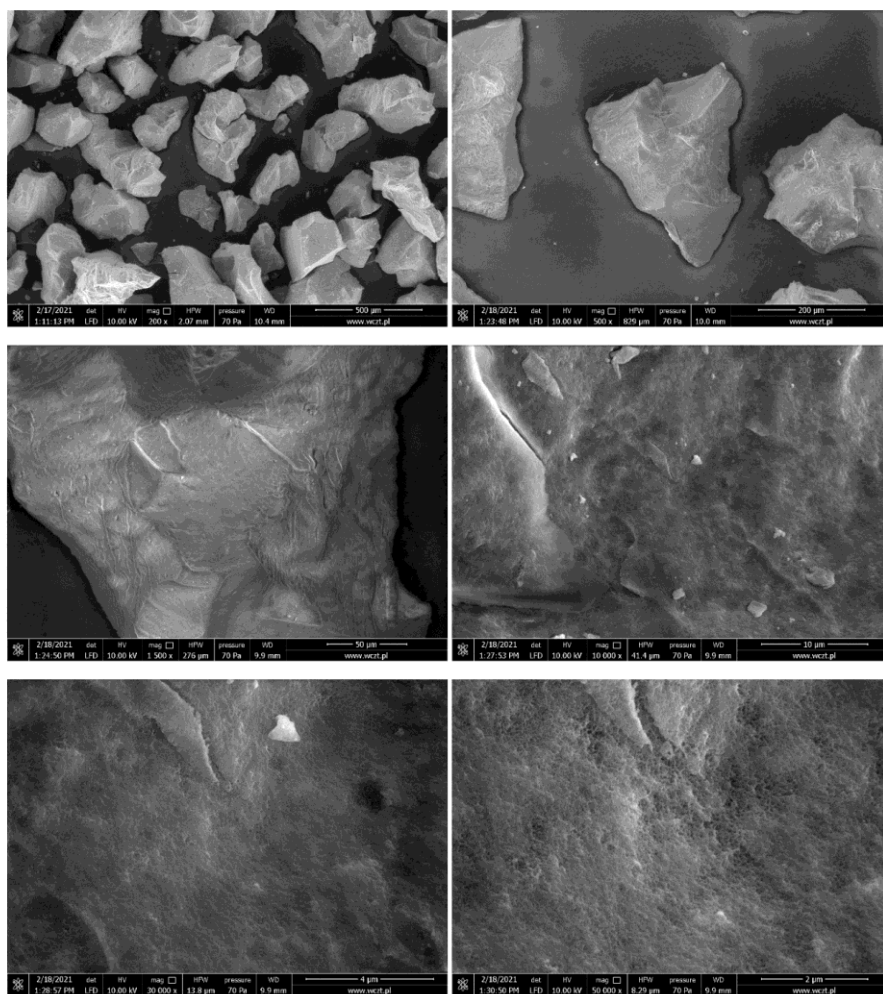


Figure S71: SEM imaging of 2-2-La.

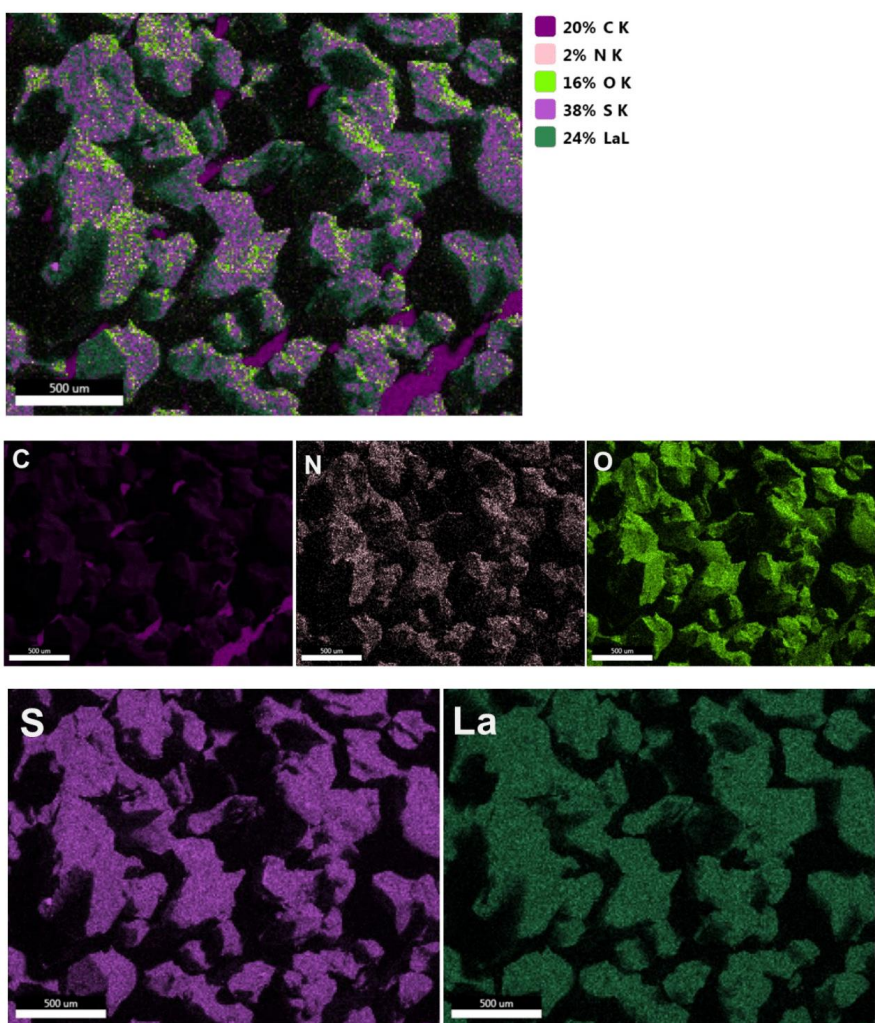


Figure S72: Energy Dispersive Spectroscopy (SEM-EDS) analysis of 2-2-La.

References

- [1] A. R. Stefankiewicz, M. R. Sambrook, J. K. M. Sanders, *Chem. Sci.* **2012**, 3, 2326.
- [2] a) G. B. Rocha, R. O. Freire, A. M. Simas, J. J. Stewart, *J. Comput. Chem.* **2006**, 27, 1101-1111; b) J. J. Stewart, *J. Mol. Model.* **2007**, 13, 1173-1213.
- [3] S. Grimme, S. Ehrlich, L. Goerigk, *J. Comput. Chem.* **2011**, 32, 1456-1465.



Tuning the Solubility of Self-Assembled Fluorescent Aromatic Cages Using Functionalized Amino Acid Building Blocks

Marcin Konopka^{1,2}, Piotr Cecot^{1,2}, Sébastien Ulrich^{3*} and Artur R. Stefankiewicz^{1,2*}

¹ Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland, ² Center for Advanced Technologies, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland, ³ Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, CNRS, Université de Montpellier, ENSCM, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, Montpellier, France

We previously reported novel fluorescent aromatic cages that are self-produced using a set of orthogonal dynamic covalent reactions, operating simultaneously in one-pot, to assemble up to 10 components through 12 reactions into a single cage-type structure. We now introduce N-functionalized amino acids as new building blocks that enable tuning the solubility and analysis of the resulting cages. A convenient divergent synthetic approach was developed to tether different side chains on the N-terminal of a cysteine-derived building block. Our studies show that this chemical functionalization does not prevent the subsequent self-assembly and effective formation of desired cages. While the originally described cages required 94% DMSO, the new ones bearing hydrophobic side chains were found soluble in organic solvents (up to 75% CHCl₃), and those grafted with hydrophilic side chains were soluble in water (up to 75% H₂O). Fluorescence studies confirmed that despite cage functionalization the aggregation-induced emission properties of those architectures are retained. Thus, this work significantly expands the range of solvents in which these self-assembled cage compounds can be generated, which in turn should enable new applications, possibly as fluorescent sensors.

Keywords: self-assembly, molecular cages, disulfides, fluorescence, dynamic covalent chemistry

OPEN ACCESS

Edited by:

Sébastien Vidal,
Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France

Reviewed by:

Florian Beuerle,
University of Wuerzburg, Germany
Jeremy K. Klosterman,
University of California, San Diego,
United States

*Correspondence:

Sébastien Ulrich
sebastien.ulrich@enscm.fr
Artur R. Stefankiewicz
ars@amu.edu.pl

Specialty section:

This article was submitted to
Supramolecular Chemistry,
a section of the journal
Frontiers in Chemistry

Received: 11 April 2019

Accepted: 01 July 2019

Published: 16 July 2019

Citation:

Konopka M, Cecot P, Ulrich S and
Stefankiewicz AR (2019) Tuning the
Solubility of Self-Assembled
Fluorescent Aromatic Cages Using
Functionalized Amino Acid Building
Blocks. *Front. Chem.* 7:503.
doi: 10.3389/fchem.2019.00503

INTRODUCTION

Due to the unique physicochemical properties and a wide range of applications, cage-type architectures enjoy unflagging interest (Hasell and Cooper, 2016; Markiewicz et al., 2017; Beuerle and Gole, 2018; Mastalerz, 2018). Of the many types of cage systems, those based on reversible covalent bonds begin to clearly dominate, mainly due to their adaptive properties (Lehn, 2015; Briggs and Cooper, 2017; Ono and Iwasawa, 2018). So far, molecular cages based on dynamic imine bonds (and/or acyl-hydrazones) and boronic esters have been the most frequently used among chemists (Beuerle and Gole, 2018; Acharyya and Mukherjee, 2019; Kołodziejewski et al., 2019). The dynamic output of imine chemistry is particularly opulent (Belowich and Stoddart, 2012; Schick et al., 2019). Supramolecular architectures based on imine and/or acyl-hydrazone bonds have already found number of applications as biomolecular recognition receptors (Nial et al., 2007; Ulrich, 2019), nanocapsules (Durot et al., 2014; Eichstaedt et al., 2019; Jedrzejewska and Szumna, 2019),

sensors (Stefankiewicz and Lehn, 2009; Bravin et al., 2019), and self-healing materials (Roy et al., 2015; Chao et al., 2016; Drożdż et al., 2018a,b). The use of disulfide bonds, reversible through *inter alia* thiolate substitution, in the generation of complex supramolecular architectures has received much attention (Otto, 2012; Black et al., 2014; Sobczak et al., 2018), except those of cage topology that are still isolated cases in the literature (Sarma et al., 2007; Stefankiewicz et al., 2012; Stefankiewicz and Sanders, 2013; Naini et al., 2014). The nature of dynamic systems based on imine and disulfide bonds is thus well-known separately but multi-dynamic systems that employs them simultaneously are an enduring challenge (Sarma et al., 2007; Orrillo et al., 2019; Reuther et al., 2019).

Recently, we have reported a method for obtaining a new type of molecular cage-like system using a set of two orthogonal reversible reactions (disulfides and acyl-hydrazones) that occur simultaneously (Drozd et al., 2017). This was the first report of multi-dynamic and multi-component cages selectively obtained in a one-pot process, and characterized in semi-aqueous media, by applying two distinct reversible covalent bonds. The reported cages were based on two simple building blocks: tetraphenylethylene-tetraaldehyde (TPE-Ald) being known for its fluorescence properties such as aggregation-induced emission (AIE) (Zhao et al., 2012; Mei et al., 2015; Feng et al., 2018), and cysteine hydrazide, a small, chiral molecule containing three different functional groups: amine, hydrazide, and thiol. A multiplicity of factors was determined as contributing to the exceptional selectivity in the formation of cage-system, of which the presence of dimethyl sulfoxide (DMSO) in the reaction mixture was found essential for the effective cage generation. This is related to the participation of this solvent in the oxidation of thiols into disulfides which is promoted even under slightly-acidic conditions, as previously reported (Tam et al., 1991; Atcher and Alfonso, 2013). Both thiol oxidation and disulfide exchange usually proceed under mild-basic conditions, whereas acyl-hydrazones require the presence of acid catalysts.

Therefore, the simultaneous formation of these two bonds, despite an obvious progress in this area, remains a challenging task and the use of DMSO as co-solvent helps in this regard. The presence of reversible covalent bonds in the cage structure is crucial as it allows generating thermodynamically stable products by self-correction of intermediate kinetic products, while maintaining dynamic features that are important for the responsiveness of those structures. The latter are extremely important when taking into account the potential use of such systems in the selective complexation of guest molecules or in the “self-healing” processes. The first generation of our doubly-dynamic cages, despite their interesting structural features, required the use of well-defined solvent mixture (H₂O-DMSO with predominant content of the latter from 75 to 94%). This somewhat limited the scope of investigation of e.g., fluorescence properties only to this solvent system and the potential applications one can think of.

Therefore, to expand the scope of our cages, we decided to modify the structure of one of the building blocks in order to generate two doubly-dynamic and multicomponent cage systems presenting similar structural properties but distinct

hydrophobic/hydrophilic character. We chose to take advantage of the reactive α -amine present on amino acids and thus chose to functionalize the cysteine hydrazide building block at its N-terminal. It was of course necessary to ensure firstly that the preferential formation of cage structure would be retained, the principal intent simply being to modify the solubility of the cages, then to characterize the spectroscopic properties of the cages in a wider range of solvents. We describe here our syntheses of cages derived from modified cysteine hydrazide units and the properties of these new architectures in various media.

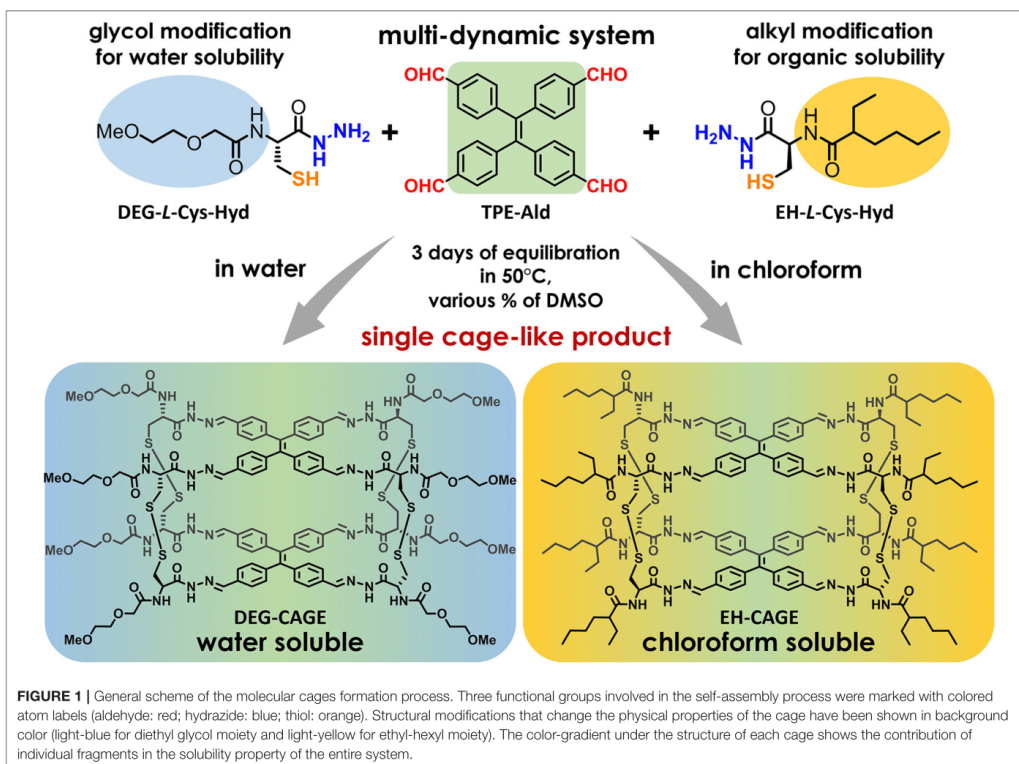
RESULTS AND DISCUSSION

Design of Building Blocks

Our investigations began with the design and selection of several structurally distinct molecular components for the efficient construction of doubly dynamic tetrapodal cage systems. As shown in **Figure 1**, such cages can be formed in a self-assembly process between two tetrapodal components constituting upper and lower planes of the cage and four ditopic molecules as bridging linkers. Both types of building blocks must have functional groups that allow facile formation of reversible covalent bonds such as acyl-hydrazones and disulfides. The TPE aldehyde (TPE-Ald) was retained as the aromatic core of the cage-like structures, because we wanted our new cages to have an analogous structure to those reported previously (Drozd et al., 2017). We decided to use the amino group in cysteine hydrazide to insert a structural extension *via* amide bond formation. Coupling reactions based on different amino acid systems are well-described and run under mild conditions. We decided to use two organic acids to modify the cysteine hydrazide. We chose a more polar and hydrophilic component, 2-(2-methoxyethoxy)acetic acid (DEG) containing a short diglycol fragment, in order to achieve enhanced aqueous solubility, and a non-polar group, 2-ethylhexanoic acid (EH), to increase hydrophobicity and generate cages soluble in organic solvents. It should be mentioned, that we used the racemic ethyl hexanoic acid to make the synthesis more cost effective and facile. We assumed here that one of the key features for this project is to maintain the R-configuration on the cysteine hydrazide moieties, and that the using of racemic EH acid will not affect the self-assembly process of cage formation.

Synthesis of Building Blocks

The syntheses (**Figure 2**) began with the preparation of a partially-protected cysteine hydrazide. Commercially available Fmoc-STr-L-Cys-OH (**1**), was coupled with tert-butyl carbazate before the Fmoc group was removed in a standard reaction with piperidine in DMF. *N*-hydroxysuccinimide activated esters (**4** and **5**) of diethyl-glycol acid and ethylhexyl acid were obtained by reaction with DCC and *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) and H-L-Cys-STr-Hyd-Boc (**3**) was then combined with the activated esters in amide coupling reactions. In this way, two fully protected derivatives of cysteine hydrazide tethered with DEG and EH moieties were obtained (**6** and **7**). In the final step, the hydrazide and thiol groups were deprotected in both DEG and EH

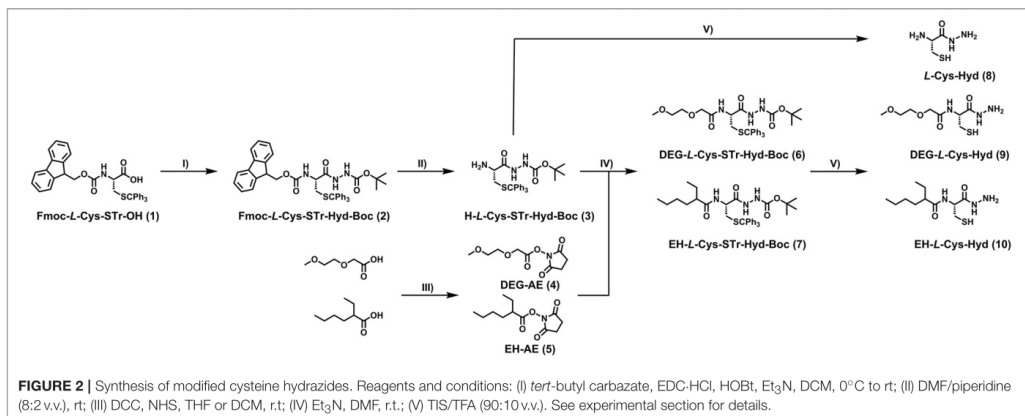


derivatives in a solution of TFA/TIS 9/1. Synthetic protocols and characteristics of all obtained compounds are available in the experimental section.

Self-Assembly of Cages

Cage formation using the new building blocks DEG-L-Cys-Hyd (9) and EH-L-Cys-Hyd (10) was first assessed in the original solvent system (DMSO/H₂O 94/6). In both cases, LC-MS monitoring showed that complete conversion was reached after 3 days of equilibration at 50°C, with no TPE-Ald left and the appearance of a new single peak in the mass spectra that corresponded to the expected cage compounds, respectively DEG-CAGE and EH-CAGE. Cage formation using orthogonal dynamic covalent reactions, namely acyl-hydrazone and disulfide formation, was therefore confirmed with the new *N*-functionalized cysteine-derived building blocks (Figure 3). Then we varied the nature of the solvent. First, DEG-CAGE formation was studied in a solvent system with an increasing proportion of water, from DMSO/H₂O 94/6 to 100% H₂O. LC-MS analysis clearly demonstrated cage formation from DMSO/H₂O 94/6 to DMSO/H₂O 25/75 (Table 1; Electronic Supplementary Information). In samples

with less than 25% DMSO, LC-MS indicated the presence of intermediates, which corresponded to acyl-hydrazone condensation products with no sign of higher structure generated by disulfide bond formation. Similarly, EH-CAGE formation was studied in organic solvents (from 100% DMSO to 100% CHCl₃) and LC-MS showed effective cage formation up to 90% CHCl₃ (Table 1; Electronic Supplementary Information). Here again, a minimum of 10% DMSO seems to be essential for complete cage formation, otherwise acyl-hydrazone intermediates are formed (Electronic Supplementary Information) and do not react further. At this stage, we explain the necessity of the presence of the indicated percentages of DMSO in the reaction mixture both in terms of solubility and the facilitated oxidation of thiols to disulfides. Both cages were also characterized by ¹H NMR. To obtain the sample the original post-self-assembly mixture was evaporated to dryness and then the residue was re-dissolved in the deuterated solvent. The recorded ¹H NMR spectra confirmed the complex structure of the tetrapodal cages that exist as a mixture of isomers (Figure 3C). Due to the high complexity of these molecules, we employed semiempirical molecular modeling (Recife Model 1) to get further insights into the structural features of the cages (Figure 3D). Based on this



we estimated the sizes and volumes of each cage. Optimization of DEG-Cage has shown the retained internal cage cavity in comparison to the unmodified cage. The lengths and shape of side chains allow them to fit fully into the side grooves of the capsule, which causes the enhancement of molecule size and volume ($\sim 4,200 \text{ \AA}^3$ of spherical volume). The EH-Cage side chain after optimization has no visible cavity inside the molecule. The preferred configuration of ethyl-hexanoic chains forces the TPE backbones of the EH-cage molecule to twist slightly around the central axis, while aromatic adjust and stack on each other, which constitutes the flat shape and makes the EH-cage smaller than DEG-Cage ($\sim 3,200 \text{ \AA}^3$ of spherical volume).

Fluorescence Properties

The fluorescence spectra of both cage compounds, DEG-CAGE and EH-CAGE, were recorded in different solvent systems at the same concentration (0.5 mM). The spectra remained essentially unaltered in all solvents, showing an emission maximum around 510–520 nm. Both cages in all solvent mixtures employed showed significant emission enhancement which can be seen by comparing with the fluorescence spectrum of TPE-ALD (Figure 4). The observed emission enhancement is caused by rigidification and suppression of phenyl rings torsion of the two TPE units within a single cage molecule (Shultz and Fox, 1989). Increasing the water content decreases about five-fold the fluorescence emission intensity of DEG-CAGE, while, on the other hand, increasing the chloroform content increases about two-fold the fluorescence emission intensity of EH-CAGE (Figure 4).

CONCLUSIONS

We have reported herein the design and synthesis of new building blocks, based on *N*-functionalized cysteine-derived amino acids, for the one-pot multi-component self-assembly of fluorescent aromatic cages. Our results establish a convenient synthetic strategy, and show that placing such side-groups does not hinder

cage formation—highlighting the robustness of the approach—and enables tuning the solubility of the corresponding cage compounds. These cages preserved interesting aggregation-induced emission properties in a now much wider range of solvent mixtures (from 90% CHCl₃/DMSO to 75% H₂O/DMSO), which we believe can be harnessed for sensing applications.

MATERIALS AND METHODS

Solvents and chemicals were purchased from commercial suppliers and used without further purification. Preparative purifications were performed by silica gel flash column chromatography (Merck® 40–60 μM). HPLC analyses were performed on a Waters HPLC 2695 (EC Nucleosil 300-5 C18, 125 \times 3 mm column, Macherey—Nagel) equipped with a Waters 996 DAD detector. The following linear gradient of solvent A (99.9% water and 0.1% TFA) into solvent B (99.9% acetonitrile and 0.1% TFA) were used: 0–100% of solvent B in 10 min; flow 1 mL/min. Retention times are given in minutes. LC/MS analyses were performed on a Shimadzu LCMS2020 (Phenomenex Kinetex C18, 2.6 $\mu\text{m} \times 7.5 \text{ cm}$, 100 \AA) equipped with a SPD-M20A detector with the following linear gradient of solvent A (99.9% water and 0.1% HCOOH) into solvent B (99.9% acetonitrile, 0.1% HCOOH) and: 0–100% of solvent B in 10 min; flow 1 mL/min. Retention times are given in minutes. Fluorescence analyses were carried out on an AF-2500 HITACHI fluorescence spectrophotometer. UV-Vis absorption experiment was measured on UV-3100pC UVisco spectrophotometer. Samples of cages compounds were studied at 0.25 mM concentration. Excitation wavelength was set at 320 nm and emission spectra were recorded in the range 400–600 nm. ¹H NMR, ¹³C NMR spectra were recorded at 400 MHz for ¹H and 101 MHz for ¹³C (Bruker Avance 400) in deuterated solvents. Chemical shifts are reported in ppm relative to the solvent residual peak. HR-MS analyses were carried out at the Laboratoire de Mesures Physiques, IBMM,

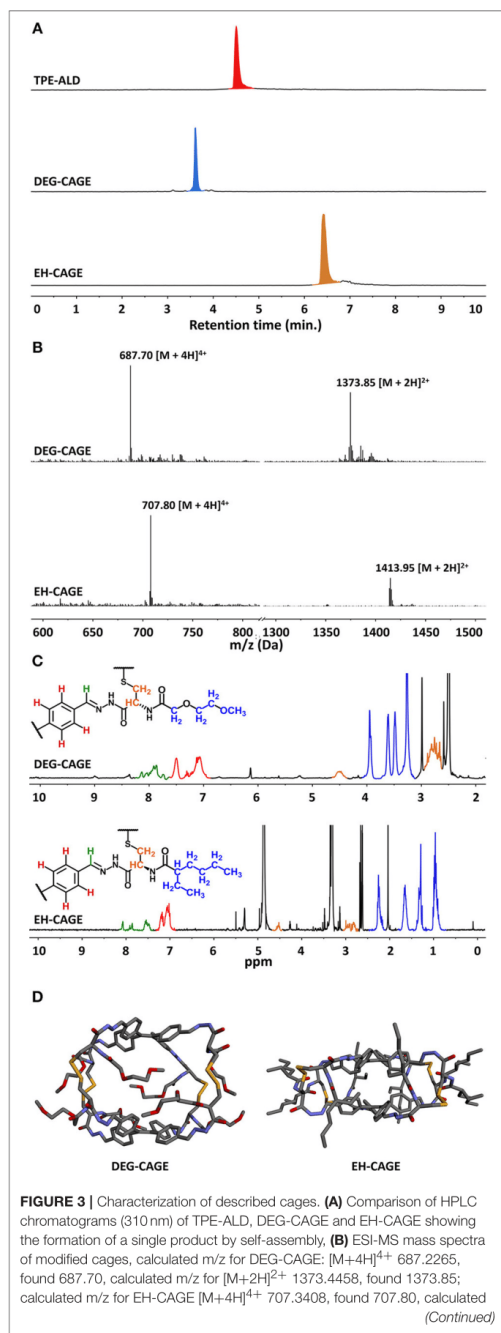


FIGURE 3 | m/z for $[M+2H]^{2+}$ 1413.6743, found 1413.95, **(C)** 1H NMR spectra of DEG-Cage (top) and EH-Cage (bottom). Significant peaks were marked according to the color pattern on the partial structures of the cages, **(D)** Optimized models of cages, calculated approx. sizes for DEG-Cage $r = 10 \text{ \AA}$, $s_{ph}V = 4,200 \text{ \AA}^3$ (left) and for EH-Cage $r = 9.15 \text{ \AA}$, $s_{ph}V = 3,200 \text{ \AA}^3$ (right).

TABLE 1 | Screening of cage formation in different solvent systems using L-Cys-Hyd (8), DEG-L-Cys-Hyd (9), and EH-L-Cys-Hyd (10).

Entry	Component ^a	Solvents (% vol.)			Cage formed
		DMSO	H ₂ O	CHCl ₃	
1	L-Cys-Hyd	94	6	–	Yes
2	DEG-L-Cys-Hyd	94	6	–	Yes
3	DEG-L-Cys-Hyd	75	25	–	Yes
4	DEG-L-Cys-Hyd	50	50	–	Yes
5	DEG-L-Cys-Hyd	25	75	–	Yes
6	DEG-L-Cys-Hyd	10	90	–	No
7	DEG-L-Cys-Hyd	5	95	–	No
8	DEG-L-Cys-Hyd	0	100	–	No
9	EH-L-Cys-Hyd	100	–	0	Yes
10	EH-L-Cys-Hyd	75	–	25	Yes
11	EH-L-Cys-Hyd	50	–	50	Yes
12	EH-L-Cys-Hyd	25	–	75	Yes
13	EH-L-Cys-Hyd	10	–	90	Yes
14	EH-L-Cys-Hyd	5	–	95	No
15	EH-L-Cys-Hyd	0	–	100	No

^aRefers to the hydrazone used in reaction with TPE-Ald.

Université de Montpellier using Micromass Q-ToF instruments. The TPE aldehyde (TPE-Ald) and Fmoc-L-Cys-STR-Hyd-Boc (2) were obtained according to the previously reported method (Drozd et al., 2017).

Synthesis Protocols of Essential Chemicals and Building Blocks

Synthesis of H-L-Cys-STR-Hyd-Boc (3)

Fmoc-L-Cys-STR-Hyd-Boc (2.3 g, 3.31 mmol) was dissolved in a solution of DMF/piperidine (8:2, v/v; 70 mM) and then was stirred for 1 h in r.t. After that the reaction mixture was concentrated in vacuo. The crude residue was purified by flash chromatography on silica gel eluting with a gradient of DCM 100% 5 min., then 100% DCM to 90% DCM and 10% MeOH 30 min. Yield: 85%. 1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.48–7.40 (m, 6H), 7.32–7.26 (m, 6H), 7.24–7.19 (m, 3H), 3.01 (dd, $J = 8.7, 3.9$ Hz, 1H), 2.75 (dd, $J = 13.0, 4.0$ Hz, 1H), 2.57 (dd, $J = 13.0, 8.8$ Hz, 1H), 1.43 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.00, 155.09, 144.60, 129.69, 128.13, 126.98, 81.84, 67.22, 53.48, 31.56, 28.24. ESI-MS: m/z calc. for $[M+H]^+$ 478.2164, found 478.2161.

Synthesis of DEG-AE (4)

The title compound was obtained using the previously reported method for analogous compound (Meißler et al., 2016). NHS (0.8 g, 7.5 mmol) and 2-(2-methoxyethoxy)acetic acid (1.0 g,

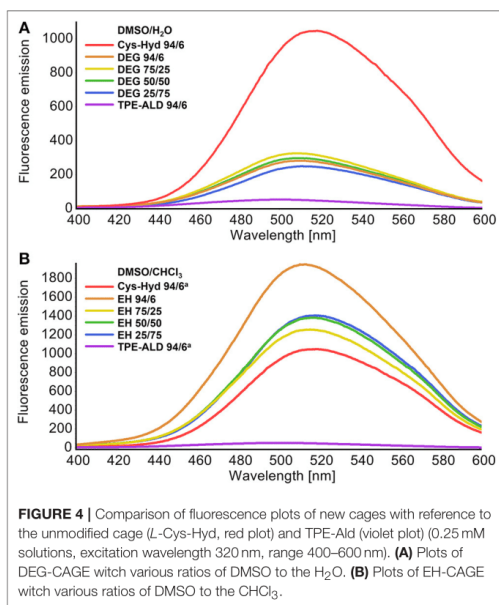


FIGURE 4 | Comparison of fluorescence plots of new cages with reference to the unmodified cage (*L*-Cys-Hyd, red plot) and TPE-Ald (violet plot) (0.25 mM solutions, excitation wavelength 320 nm, range 400–600 nm). **(A)** Plots of DEG-CAGE with various ratios of DMSO to the H₂O. **(B)** Plots of EH-CAGE with various ratios of DMSO to the CHCl₃.

7.5 mmol) were dissolved in 150 mL of dry THF and then was cooled in ice bath to (0°C). DCC (1.55 g, 7.5 mmol) was added portion wise. This was stirred for 1 h at r.t. and stored in a refrigerator overnight. The DCU precipitate was filtered off and the filtrate was concentrated under vacuum to give a colorless oil. The crude product was dissolved in a small amount of THF, the resulting suspension was filtered to remove the precipitate and the procedure was repeated until a clear solution was obtained. Solvent was then removed under high vacuum to give a colorless oil. Yield: 89%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.49 (s, 2H), 3.80–3.74 (m, 2H), 3.59–3.56 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.83 (s, 4H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.94, 166.07, 71.89, 71.32, 66.62, 59.10, 25.66. ESI-MS: m/z calc. for [M+H]⁺ 232.0815, found 232.1065.

Synthesis of EH-AE (5)

The 2-ethylhexanoic acid (160 μL, 1.0 mmol) and *N*-hydroxycuccinimide (115 mg) were dissolved in DCM (5 mL). After 10 min. of stirring the EDC-HCl (192 mg, 1.0 mmol) was added and then the stirring was continued for 2 h at r.t. Title compound was purified by flash chromatography (gradient elution from 0 to 10% of MeOH in DCM). Yield: 72%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.83 (d, *J* = 5.2 Hz, 4H), 2.58 (tt, *J* = 8.8, 5.4 Hz, 1H), 1.83–1.63 (m, 4H), 1.43–1.30 (m, 4H), 1.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 0.91 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.61, 169.32, 44.92, 31.72, 29.27, 25.76, 25.64, 22.62, 13.98, 11.67. ESI-MS: m/z calc. for [M+H]⁺ 242.1373, found 242.1352.

Synthesis of DEG-*L*-Cys-STR-Hyd-Boc (6)

A solution of DEG-AE (231 mg, 1.0 mmol), *H*-*L*-Cys-STR-Hyd-Boc (525 mg, 1.1 mmol), and Et₃N (0.28 mL, 2.0 mmol) in DMF (30 mL) was stirred for 24 h at room temperature. The solvent was then evaporated under vacuum. Resulted oily residue was dissolved in 1 mL of acetone and precipitated in 1 M HCl (100 mL). The white, waxy precipitate was filtered off and dried. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel eluting with a gradient of MeOH in DCM (from 0 to 10% MeOH). The titled product was obtained as a white solid. Yield: 66%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.44–7.39 (m, 6H), 7.32–7.26 (m, 6H), 7.24–7.19 (m, 3H), 4.08 (s, 1H), 4.04–3.87 (m, 2H), 3.65 (ddd, *J* = 15.8, 5.3, 3.3 Hz, 2H), 3.52 (ddd, *J* = 5.0, 3.2, 2.0 Hz, 2H), 3.32 (s, 3H), 2.78–2.58 (m, 2H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.77, 169.38, 154.83, 144.44, 129.72, 128.17, 127.00, 71.60, 71.19, 70.24, 67.38, 59.06, 50.54, 32.76, 28.23. ESI-MS: m/z calc. for [2M+Na]⁺ 1209.5012, found 1209.5124.

Synthesis of EH-*L*-Cys-STR-Hyd-Boc (7)

A solution of EH-AE (241 mg, 1.0 mmol), *H*-*L*-Cys-STR-Hyd-Boc (525 mg, 1.1 mmol), and Et₃N (0.28 mL, 2.0 mmol) in DMF (30 mL) was stirred for 24 h at room temperature. The solvent was then evaporated under vacuum. Resulted oily residue was dissolved in 1 mL of acetone and precipitated in 1 M HCl (100 mL). The white, waxy precipitate was filtered off and dried. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel eluting with a gradient of MeOH in DCM (from 0 to 10% MeOH). The titled product was obtained as a white solid. Yield: 56%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.44–7.40 (m, 6H), 7.26 (s, 6H), 7.23–7.18 (m, 3H), 4.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 2.69 (dd, *J* = 13.2, 5.5 Hz, 1H), 2.59 (ddd, *J* = 13.1, 8.3, 2.9 Hz, 1H), 1.94–1.81 (m, 1H), 1.61–1.43 (m, 4H), 1.41 (s, 9H), 1.31–1.18 (m, 4H), 0.87–0.77 (m, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.83, 169.91, 154.77, 144.49, 129.64, 128.15, 126.96, 81.60, 67.24, 53.55, 49.23, 32.35, 31.05, 29.85, 28.22, 25.91, 22.87, 14.07, 12.12. ESI-MS: m/z calc. for [2M+Na]⁺ 1229.6092, found 1229.5532.

Synthesis of *L*-Cys-Hyd (8)

H-*L*-Cys-STR-Hyd-Boc (500 mg, 1.05 mmol) was dissolved in TFA/TIS (95/5) solution (5 mL) and stirred for 4 h at room temperature. After removal of 90% of the solvent, Et₂O was added to the residue. The precipitate was triturated with Et₂O and filtered. The crude material was then lyophilized twice to afford the product *L*-Cys-Hyd as a white solid. Yield: 65%. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.14 (m, 1H), 3.03 (qd, *J* = 14.6, 5.9 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ = 163.32, 55.76, 25.64. ESI-MS: m/z calc. for [M+H]⁺ 136.0545, found 136.0541.

Synthesis of DEG-*L*-Cys-Hyd (9)

DEG-*L*-Cys-STR-Hyd-Boc (594 mg, 1.00 mmol) was dissolved in TFA/TIS (95/5 v.v.) solution (10 mL) and stirred for 4 h at room temperature. After removal of 90% of the solvent, petroleum ether was added to the residue. A white precipitate formed, which was then centrifuged and washed several times with petroleum ether. The crude material was then lyophilized twice to afford the product DEG-*L*-Cys-Hyd as a white solid. Yield: 78%. ¹H NMR

(400 MHz, CD₃OD) δ 4.65–4.53 (m, 1H), 4.06 (d, J = 2.9 Hz, 2H), 3.74–3.70 (m, 2H), 3.62–3.58 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 2.93 (dq, J = 15.4, 7.4, 7.0 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz CD₃OD) δ 173.02, 170.77, 72.78, 71.92, 71.08, 59.20, 55.09, 49.00, 26.49. ESI-MS: m/z calc. for [M+H]⁺ 252.1012, found 252.1522.

Synthesis of EH-L-Cys-Hyd (10)

EH-L-Cys-STr-Hyd-Boc (604 mg, 1.00 mmol) was dissolved in TFA/TIS (95/5 v.v.) solution (10 mL) and stirred for 6 h at room temperature. After removal of 90% of the solvent, diethyl ether was added to the oily residue. A white precipitate formed, which was then centrifuged and washed several times with diethyl ether. The crude material was then lyophilized twice to afford the product EH-L-Cys-Hyd as a white solid. Yield: 84%. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.47 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 2.89 (dd, J = 14.9, 6.7 Hz, 1H), 2.80 (dd, J = 13.1, 7.0 Hz, 1H), 2.22 (tt, J = 9.6, 5.0 Hz, 1H), 1.64–1.51 (m, 2H), 1.51–1.38 (m, 2H), 1.37–1.21 (m, 4H), 0.89 (dt, J = 12.6, 7.0, 6.6 Hz, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 179.12, 171.09, 55.76, 39.95, 33.47, 30.74, 27.08, 23.74, 23.71, 14.32, 12.32. ESI-MS: m/z calc. for [M+H]⁺ 262.1573, found 262.1608.

DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript and/or the **Supplementary Files**.

REFERENCES

- Acharyya, K., and Mukherjee, P. S. (2019). Organic imine cages: molecular marriage and applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 58, 8640–8653. doi: 10.1002/anie.201900163
- Atcher, J., and Alfonso, I. (2013). The effect of DMSO in the aqueous thiol-disulphide dynamic covalent chemistry of model pseudopeptides. *RSC Adv.* 3:25605. doi: 10.1039/c3ra45811c
- Belowich, M. E., and Stoddart, J. F. (2012). Dynamic imine chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2003–2024. doi: 10.1039/c2cs15305j
- Beuerle, F., and Gole, B. (2018). Covalent organic frameworks and cage compounds: design and applications of polymeric and discrete organic scaffolds. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57, 4850–4878. doi: 10.1002/anie.201710190
- Black, S. P., Sanders, J. K., and Stefankiewicz, A. R. (2014). Disulfide exchange: exposing supramolecular reactivity through dynamic covalent chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 43, 1861–1872. doi: 10.1039/C3CS60326A
- Bravin, C., Guidetti, A., Licini, G., and Zonta, C. (2019). Supramolecular cages as differential sensors for dicarboxylate anions: guest length sensing using principal component analysis of ESI-MS and 1H-NMR raw data. *Chem. Sci.* 10, 3523–3528. doi: 10.1039/C8SC05527K
- Briggs, M. E., and Cooper, A. I. (2017). A perspective on the synthesis, purification, and characterization of porous organic cages. *Chem. Mater.* 29, 149–157. doi: 10.1021/acs.chemmater.6b02903
- Chao, A., Negulescu, I., and Zhang, D. (2016). Dynamic covalent polymer networks based on degenerative imine bond exchange: tuning the malleability and self-healing properties by solvent. *Macromolecules* 49, 6277–6284. doi: 10.1021/acs.macromol.6b01443
- Drożdż, W., Bessin, Y., Gervais, V., Cao, X.-Y., Lehn, J.-M., Stefankiewicz, A. R., et al. (2018a). Switching multivalent DNA complexation using metal-controlled cationic supramolecular self-assemblies. *Chem. Eur. J.* 24, 1518–1521. doi: 10.1002/chem.201705630
- Drożdż, W., Walczak, A., Bessin, Y., Gervais, V., Cao, X.-Y., Lehn, J.-M., et al. (2018b). Multivalent metallosupramolecular assemblies as effective DNA binding agents. *Chem. Eur. J.* 24, 10802–10811. doi: 10.1002/chem.201801552

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MK performed all organic synthesis, most experiments, analysis, and co-wrote the paper. PC performed molecular modeling and optimization of the tetrapodal cages. SU performed some analysis, interpreted the results, and co-wrote the paper. AS interpreted the results and co-wrote the paper.

FUNDING

AS thanks the National Science Centre (grant SONATA BIS 2018/30/E/ST5/00032) for financial support. SU thanks the ANR (ANR-17-CE07-0042-01) for funding. MK and PC thank grant INNOCHEM no. POWR.03.02.00-00-1023/17 co-financed by the European Union for financial support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2019.00503/full#supplementary-material>

Electronic Supplementary Information (ESI) available: NMR, MS, and HPLC chromatograms.

- Drożdż, W., Bouillon, C., Kotras, C., Richeter, S., Barboiu, M., Clement, S., et al. (2017). Generation of multicomponent molecular cages using simultaneous dynamic covalent reactions. *Chem. Eur. J.* 23, 18010–18018. doi: 10.1002/chem.201703868
- Durot, S., Taesch, J., and Heitz, V. (2014). Multiporphyrinic cages: architectures and functions. *Chem. Rev.* 114, 8542–8578. doi: 10.1021/cr400673y
- Eichstaedt, K., Szpotkowski, K., Grajda, M., Gilski, M., Wosicki, S., Jaskólski, M., et al. (2019). Self-assembly and ordering of peptide-based cavitands in water and DMSO: the power of hydrophobic effects combined with neutral hydrogen bonds. *Chem. Eur. J.* 25, 3091–3097. doi: 10.1002/chem.201805353
- Feng, H.-T., Yuan, Y.-X., Xiong, J.-B., Zheng, Y.-S., and Tang, B. Z. (2018). Macrocycles and cages based on tetraphenylethylene with aggregation-induced emission effect. *Chem. Soc. Rev.* 47, 7452–7476. doi: 10.1039/C8CS00444G
- Hasell, T., and Cooper, A. I. (2016). Porous organic cages: soluble, modular and molecular pores. *Nat. Rev. Mater.* 1:16053. doi: 10.1038/natrevmats.2016.53
- Jedrzejewska, H., and Szumna, A. (2019). Peptide-based capsules with chirality-controlled functionalized interiors – rational design and amplification from dynamic combinatorial libraries. *Chem. Sci.* 10, 4412–4421. doi: 10.1039/C8SC05455J
- Kolodziejski, M., Stefankiewicz, A. R., and Lehn, J.-M. (2019). Dynamic polyimine macrobicyclic cryptands – self-sorting with component selection. *Chem. Sci.* 10, 1836–1843. doi: 10.1039/C8SC04598D
- Lehn, J.-M. (2015). Perspectives in chemistry—aspects of adaptive chemistry and materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 3276–3289. doi: 10.1002/anie.201409399
- Markiewicz, G., Jenczak, A., Kolodziejski, M., Holstein, J. J., Sanders, J. K. M., and Stefankiewicz, A. R. (2017). Selective C70 encapsulation by a robust octameric nanospheroid held together by 48 cooperative hydrogen bonds. *Nat. Commun.* 8:15109. doi: 10.1038/ncomms15109
- Mastalerz, M. (2018). Porous shape-persistent organic cage compounds of different size, geometry, and function. *Acc. Chem. Res.* 51, 2411–2422. doi: 10.1021/acs.accounts.8b00298

- Mei, J., Leung, N. L. C., Kwok, R. T. K., Lam, J. W. Y., and Tang, B. Z. (2015). Aggregation-induced emission: together we shine, united we soar! *Chem. Rev.* 115, 11718–11940. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00263
- Meißler, M., Taden, A., and Börner, H. G. (2016). Enzyme-triggered antifouling coatings: switching bioconjugate adsorption via proteolytically cleavable interfering domains. *ACS Macro Lett.* 5, 583–587. doi: 10.1021/acsmacrolett.6b00072
- Naini, S. R., Ranganathan, S., Yadav, J. S., Ramakrishna, K. V. S., Gayatri, G., Sastry, G. N., et al. (2014). The exploration of Kemp's triacid (KTA) as the core for the synthesis of 3-fold symmetric 23-cyclophane, 22-cyclophane and novel linker directed designs. *RSC Adv.* 4:5322. doi: 10.1039/c3ra44327b
- Nial, J. W., Craig, R. B., Collins, J. G., Sharon, K., and Janice, R. A.-W. (2007). DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. *Mini Rev. Med. Chem.* 7, 627–648. doi: 10.2174/138955707780859413
- Ono, K., and Iwasawa, N. (2018). Dynamic behavior of covalent organic cages. *Chem. Eur. J.* 24, 17856–17868. doi: 10.1002/chem.201802253
- Orrillo, A. G., Escalante, A. M., Martínez-Amezaga, M., Cabezedo, I., and Furlan, R. L. E. (2019). Molecular networks in dynamic multilevel systems. *Chem. Eur. J.* 25, 1118–1127. doi: 10.1002/chem.201804143
- Otto, S. (2012). Dynamic molecular networks: from synthetic receptors to self-replicators. *Acc. Chem. Res.* 45, 2200–2210. doi: 10.1021/ar200246j
- Reuther, J. F., Dahlhauser, S. D., and Anslyn, E. V. (2019). Tunable Orthogonal Reversible Covalent (TORC) bonds: dynamic chemical control over molecular assembly. *Angew. Chem. Int. Ed.* 58, 74–85. doi: 10.1002/anie.201808371
- Roy, N., Bruchmann, B., and Lehn, J.-M. (2015). DYNAMERS: dynamic polymers as self-healing materials. *Chem. Soc. Rev.* 44, 3786–3807. doi: 10.1039/C5CS00194C
- Sarma, R. J., Otto, S., and Nitschke, J. R. (2007). Disulfides, imines, and metal coordination within a single system: interplay between three dynamic equilibria. *Chem. Eur. J.* 13, 9542–9546. doi: 10.1002/chem.200701228
- Schick, T. H. G., Lauer, J. C., Rominger, F., and Mastalerz, M. (2019). Transformation of imine cages into hydrocarbon cages. *Angew. Chem. Int. Ed.* 58, 1768–1773. doi: 10.1002/anie.201814243
- Shultz, D. A., and Fox, M. A. (1989). Effect of phenyl ring torsional rigidity on the photophysical behavior of tetraphenylethylenes. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 6311–6320. doi: 10.1021/ja00198a049
- Sobczak, S., Drożdż, W., Lampronti, G. I., Belenguer, A. M., Katrusiak, A., and Stefankiewicz, A. R. (2018). Dynamic covalent chemistry under high-pressure: a new route to disulfide metathesis. *Chem. Eur. J.* 24, 8769–8773. doi: 10.1002/chem.201801740
- Stefankiewicz, A. R., and Lehn, J.-M. (2009). Highly sensitive magnetic effects induced by hydrogen-bonding interactions in a high-spin metallosupramolecular Fe(II) [2×2] grid-type complex. *Chem. Eur. J.* 15, 2500–2503. doi: 10.1002/chem.200802659
- Stefankiewicz, A. R., Sambrook, M. R., and Sanders, J. K. M. (2012). Template-directed synthesis of multi-component organic cages in water. *Chem. Sci.* 3:2326. doi: 10.1039/c2sc20347b
- Stefankiewicz, A. R., and Sanders, J. K. (2013). Diverse topologies in dynamic combinatorial libraries from tri- and mono-thiols in water: sensitivity to weak supramolecular interactions. *Chem. Commun.* 49, 5820–5822. doi: 10.1039/c3cc41158c
- Tam, J. P., Wu, C. R., Liu, W., and Zhang, J. W. (1991). Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 6657–6662. doi: 10.1021/ja00017a044
- Ulrich, S. (2019). Growing prospects of dynamic covalent chemistry in delivery applications. *Acc. Chem. Res.* 52, 510–519. doi: 10.1021/acs.accounts.8b00591
- Zhao, Z., Lam, J. W. Y., and Tang, B. Z. (2012). Tetraphenylethene: a versatile AIE building block for the construction of efficient luminescent materials for organic light-emitting diodes. *J. Mater. Chem.* 22, 23726–23740. doi: 10.1039/c2jm31949g

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Konopka, Cecot, Ulrich and Stefankiewicz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Electronic Supplementary Information for:

Tuning the solubility of self-assembled fluorescent aromatic cages using functionalized amino acid building blocks.

Marcin Konopka,^{1,2} Piotr Cecot,^{1,2} Sebastien Ulrich,^{*3} and Artur R. Stefankiewicz,^{*1,2}

¹) Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland.

²) Center for Advanced Technologies, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 10, 61-614 Poznań, Poland.

³) Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, CNRS, Université de Montpellier, ENSCM, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, 8 rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier cedex 5, France.

Table of contents:

1. NMR spectra of building blocks.....	2
2. Procedure for cages formation.....	12
3. Cages formation in different solvents.....	12
4. Cages formation intermediates characterization.....	14
5. NMR Spectra of cages.....	22
6. Molecular modelling	24

1. NMR spectra of building blocks
TPE-ALD

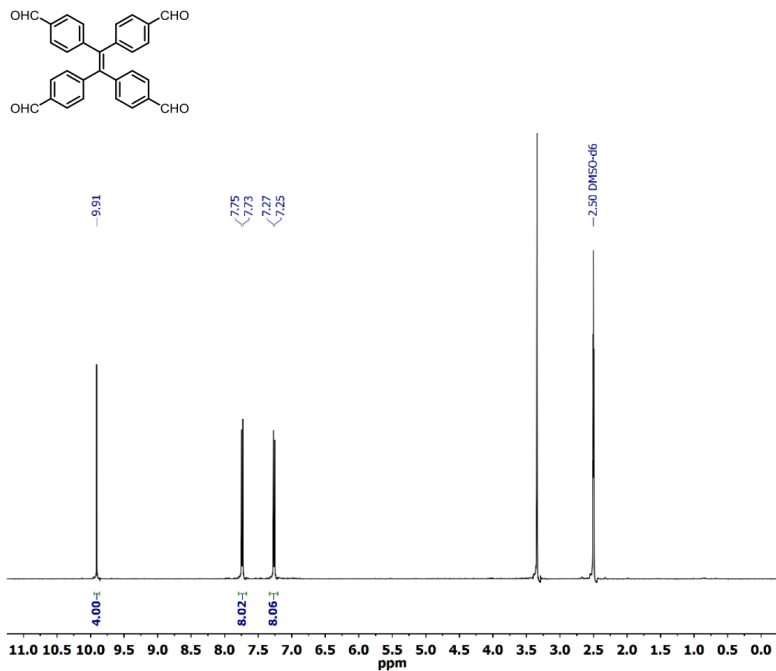


Figure S1. ¹H NMR spectrum of TPE-tetra-Aldehyde in DMSO-*d*₆ at 298K (400 MHz).

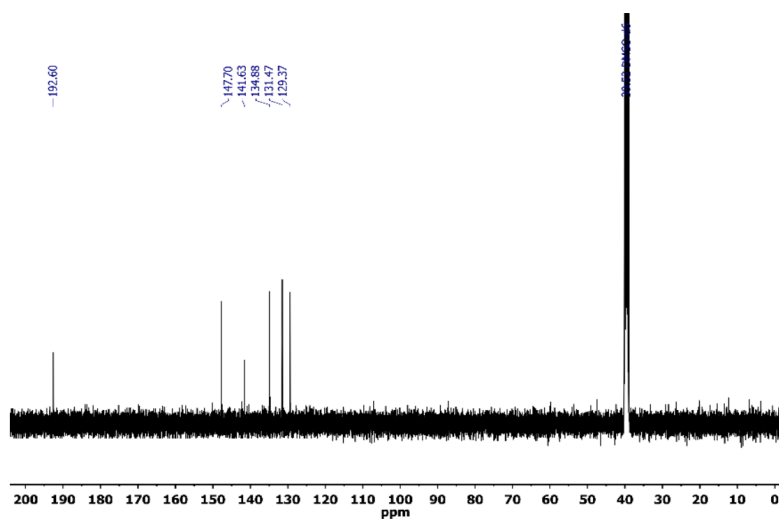


Figure S2. ¹³C NMR spectrum of TPE-tetra-Aldehyde in DMSO-*d*₆ at 298K (100 MHz).

Fmoc-L-Cys-STr-Hyd-Boc

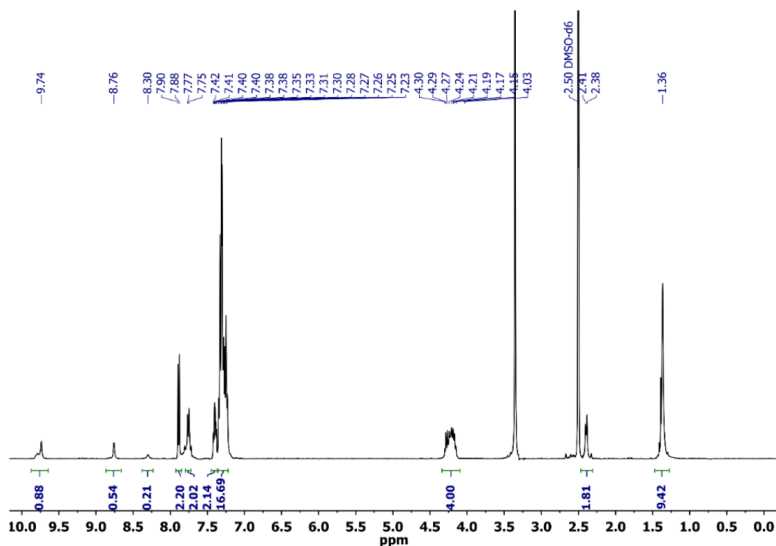
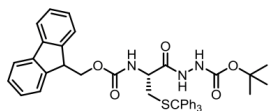


Figure S3. ¹H NMR spectrum of Fmoc-L-Cys-STr-Hyd-Boc in DMSO-*d*₆ at 298K (400 MHz).

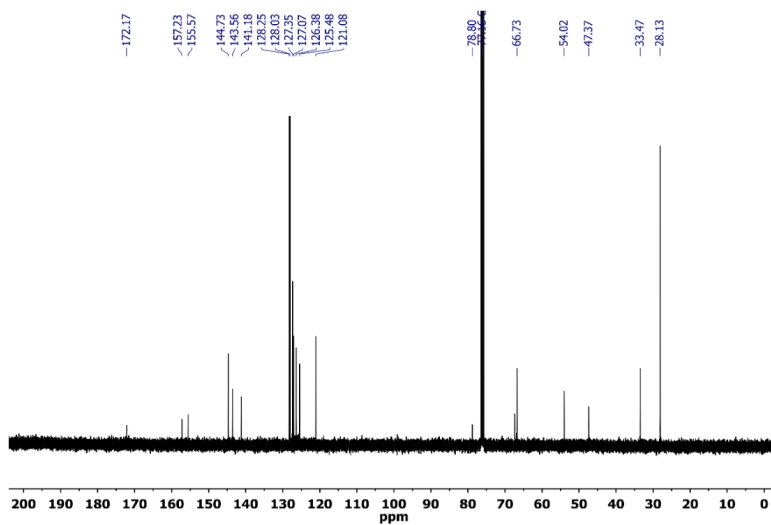


Figure S4. ¹³C NMR spectrum of Fmoc-L-Cys-STr-Hyd-Boc in DMSO-*d*₆ at 298K (100 MHz).

H-L-Cys-STr-Hyd-Boc

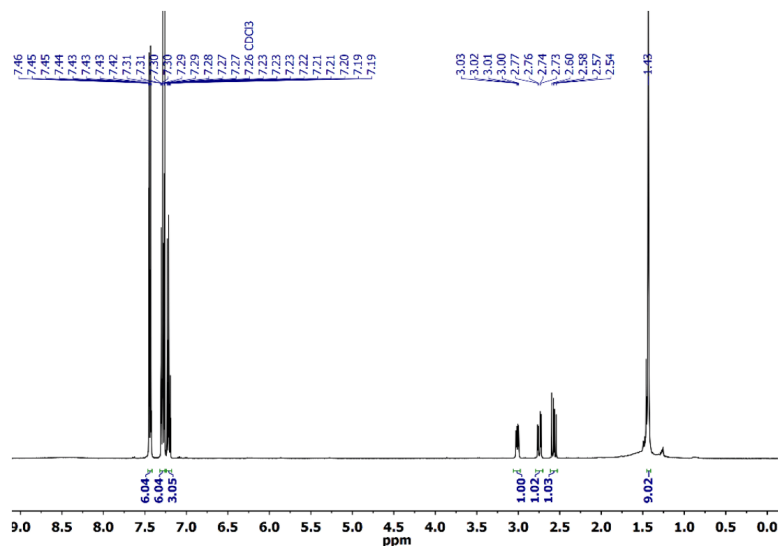
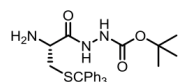


Figure S5. ¹H NMR spectrum of H-L-Cys-STr-Hyd-Boc in CDCl₃-d₁ at 298K (400 MHz).

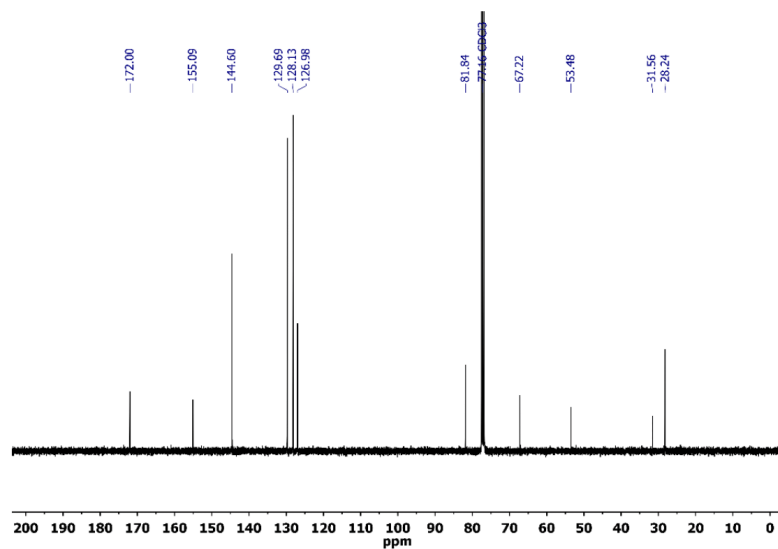


Figure S6. ¹³C NMR spectrum of H-L-Cys-STr-Hyd-Boc in CDCl₃-d₁ at 298K (100 MHz).

L-Cys-Hyd

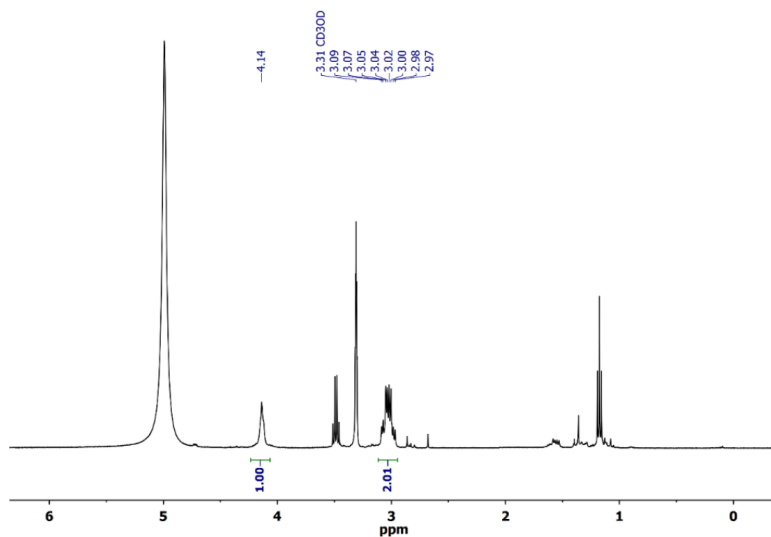
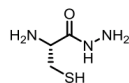


Figure S7. ^1H NMR spectrum of *L*-Cys-Hyd in $\text{MeOD-}d_4$ at 298K (400 MHz).

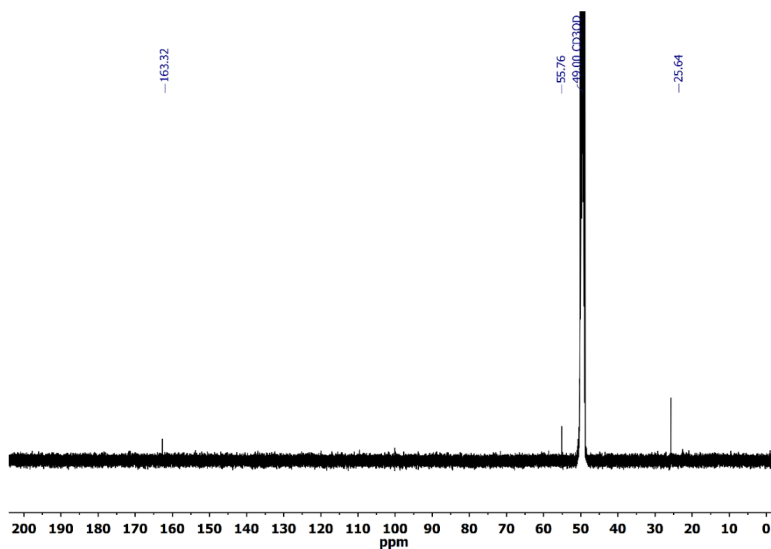


Figure S8. ^{13}C NMR spectrum of *L*-Cys-Hyd in $\text{MeOD-}d_4$ at 298K (100 MHz).

DEG-AE

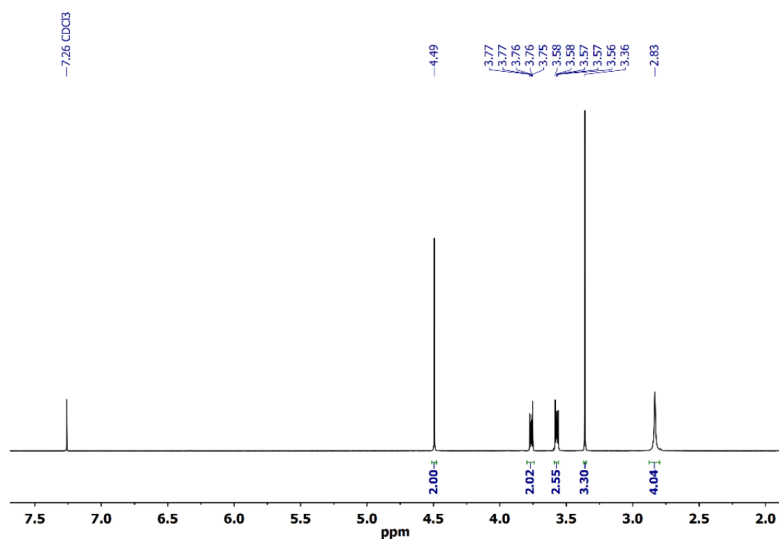
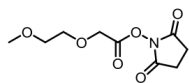


Figure S9. ¹H NMR spectrum of DEG-AE in CDCl₃-d₁ at 298K (400 MHz).

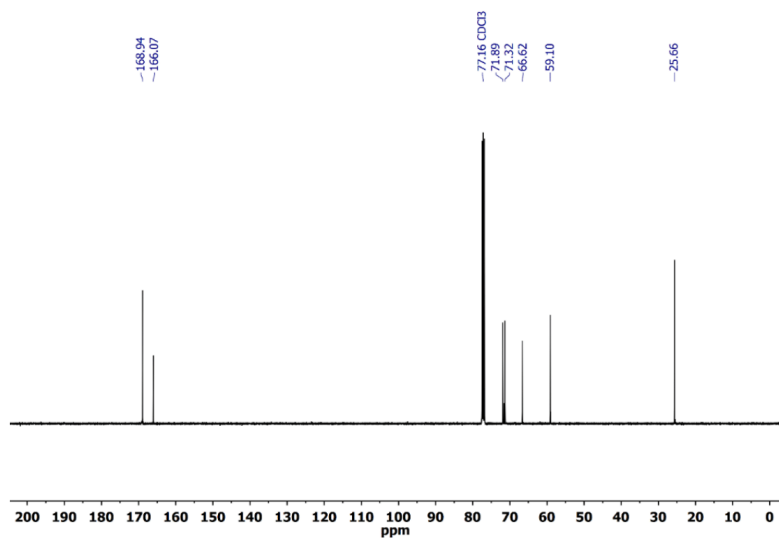


Figure S10. ¹³C NMR spectrum of DEG-AE in CDCl₃-d₁ at 298K (100 MHz).

DEG-*L*-Cys-S*Tr*-Hyd-Boc

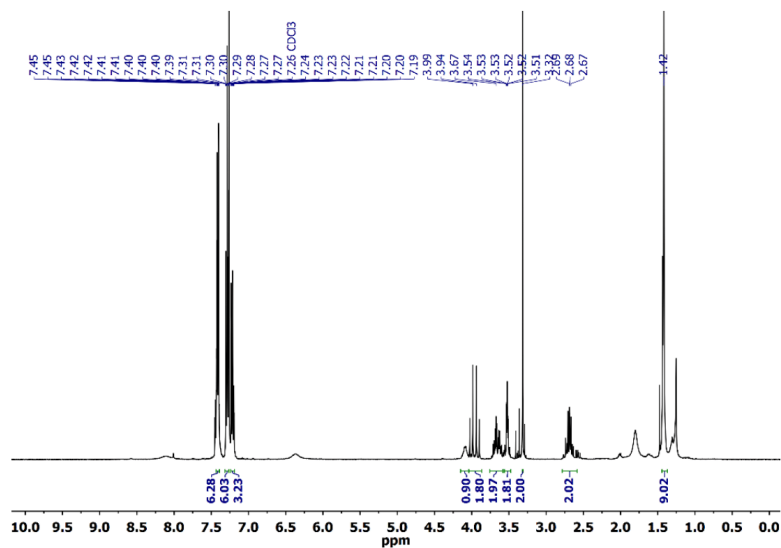
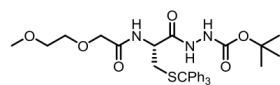


Figure S11. ¹H NMR spectrum of DEG-*L*-Cys-S*Tr*-Hyd-Boc in CDCl₃-*d*₁ at 298K (400 MHz).

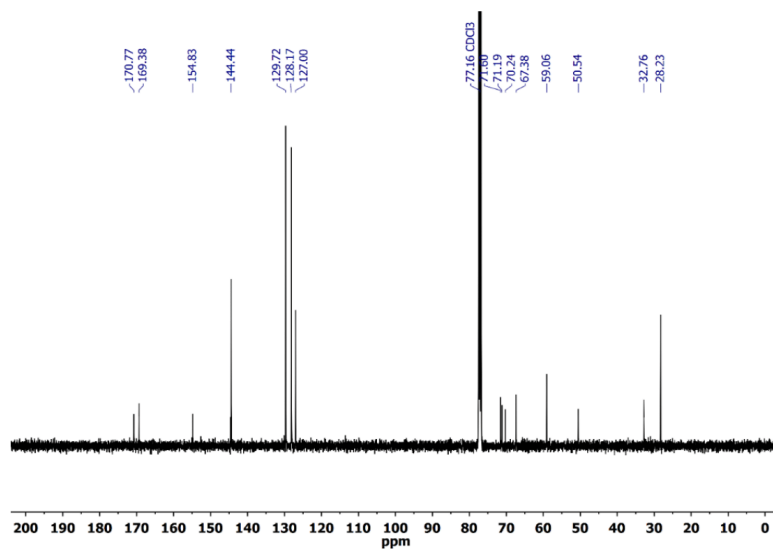


Figure S12. ¹³C NMR spectrum of DEG-*L*-Cys-S*Tr*-Hyd-Boc in CDCl₃-*d*₁ at 298K (100 MHz).

DEG-*L*-Cys-Hyd

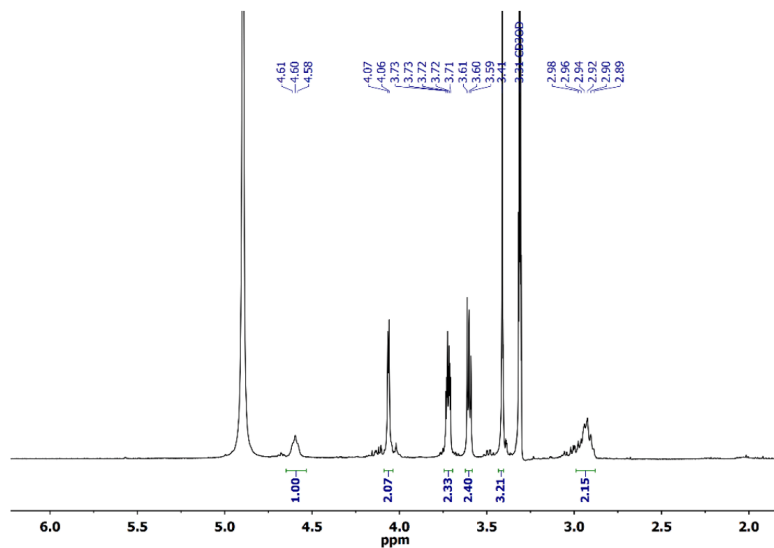
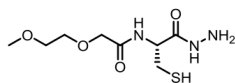


Figure S13. ¹H NMR spectrum of DEG-*L*-Cys-Hyd in MeOD-*d*₄ at 298K (400 MHz).

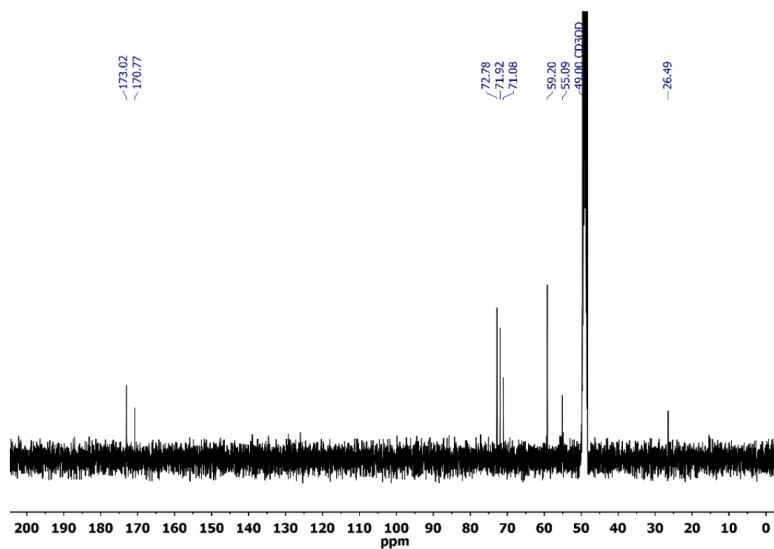


Figure S14. ¹³C NMR spectrum of DEG-*L*-Cys-Hyd in MeOD-*d*₄ at 298K (100 MHz).

EH-AE

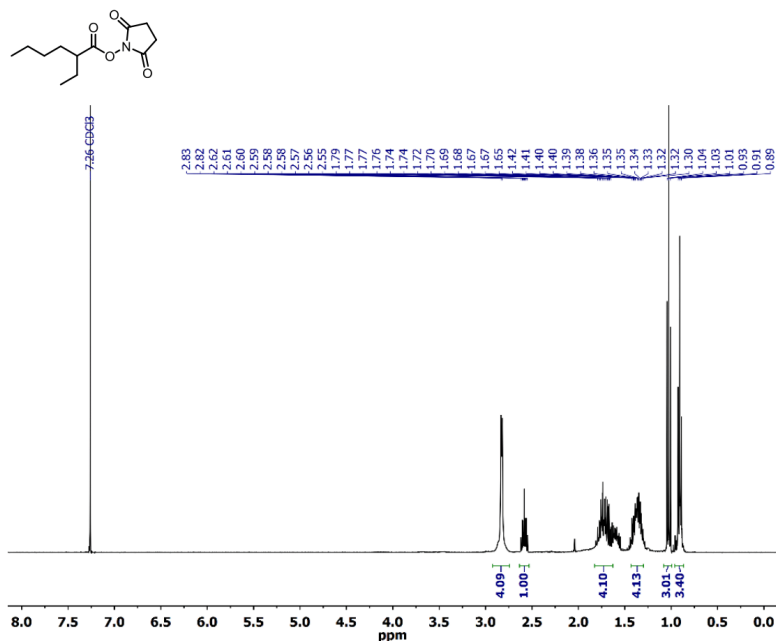


Figure S15. ¹H NMR spectrum of EH-EA in CDCl₃-d₁ at 298K (400 MHz).

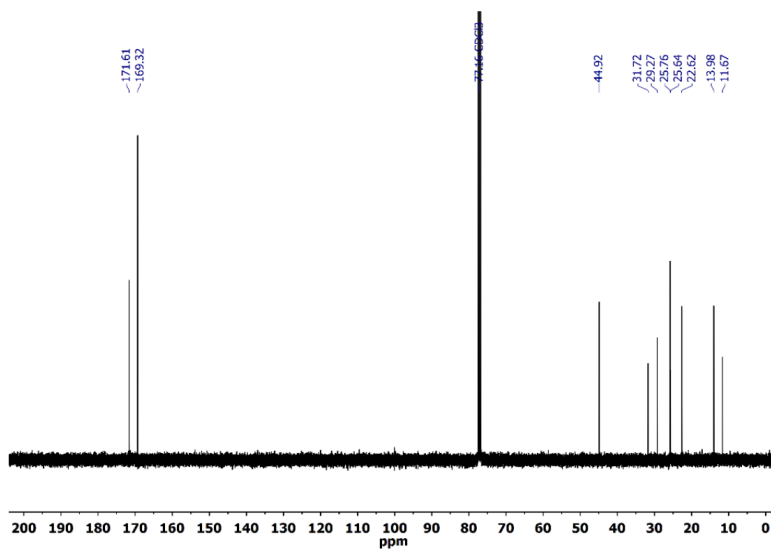


Figure S16. ¹³C NMR spectrum of EH-EA in CDCl₃-d₁ at 298K (100 MHz).

EH-L-Cys-S-Tr-Hyd-Boc

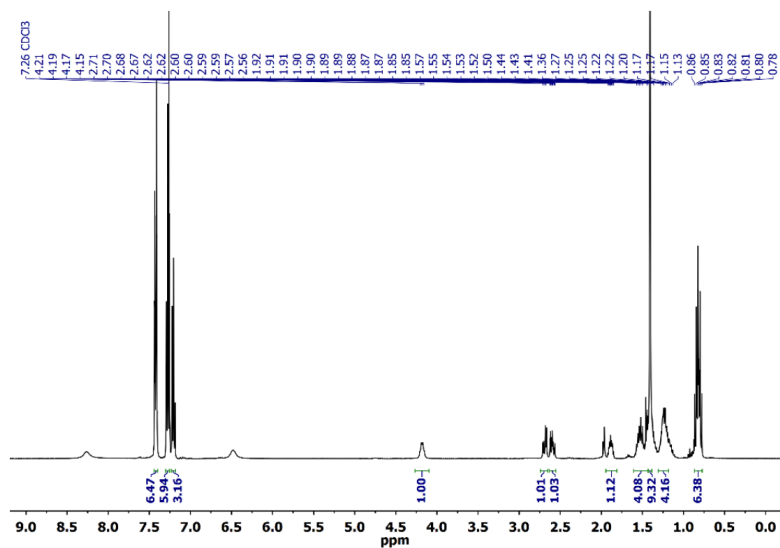
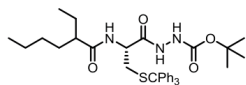


Figure S17. ¹H NMR spectrum of EH-L-Cys-S-Tr-Hyd-Boc in CDCl₃-d₁ at 298K (400 MHz).

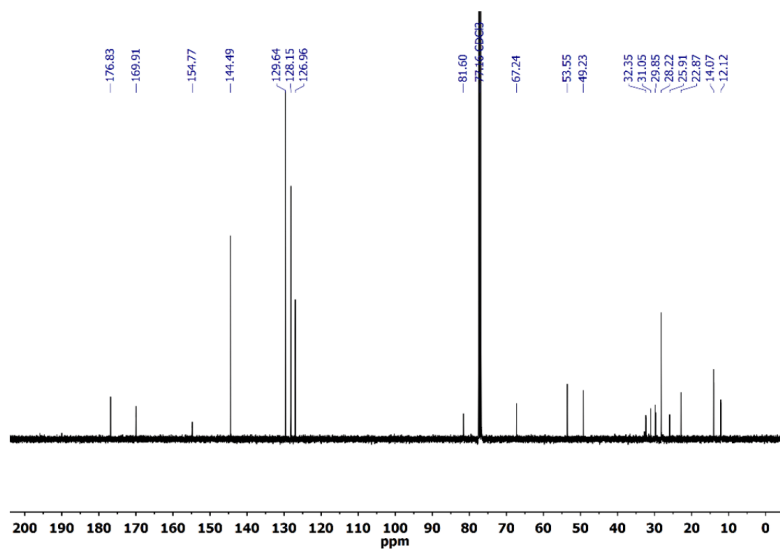


Figure S18. ¹³C NMR spectrum of EH-L-Cys-S-Tr-Hyd-Boc in CDCl₃-d₁ at 298K (100 MHz).

EH-L-Cys-Hyd

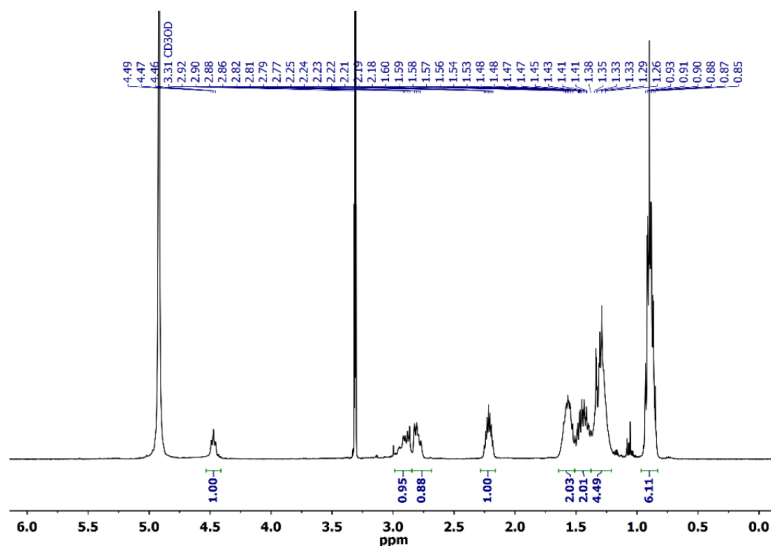
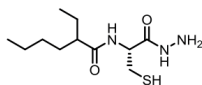


Figure S19. ¹H NMR spectrum of EH-L-Cys-Hyd in MeOD-*d*₄ at 298K (400 MHz).

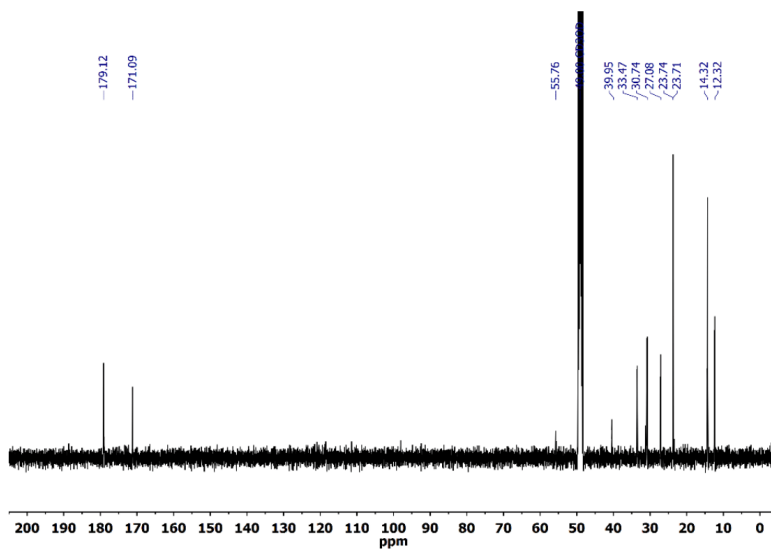


Figure S20. ¹³C NMR spectrum of EH-L-Cys-Hyd in MeOD-*d*₄ at 298K (100 MHz).

2. Procedure for cages formation

Stock solutions of **TPE-Ald** (50 mM) and **EH-L-Cys-Hyd** (150 mM) in DMSO, and **DEG-L-Cys-Hyd** (150 mM) in H₂O were prepared. **TPE-ALD** (22 mg, 0.05 mmol) was dissolved in 1.0 ml of DMSO. **EH-L-Cys-Hyd** (40 mg, 0.15 mmol) was dissolved in 1.0 ml of DMSO. **DEG-L-Cys-Hyd** (38 mg, 0.15 mmol) was dissolved in 1.0 ml of H₂O. The appropriate volume was taken to place 1.0 μmol of **TPE-Ald** and 4.0 μmol of cysteine-hydrazide derivative. Each experiment for cages formation was run in this way. Solution of **TPE-Ald** (50 mM, 20 μL) and solution of cysteine-hydrazide derivative (150 mM, 30 μL) were added into empty Eppendorf vial and then it was filled with 450 μL of solvent up to 0.5 mL of total volume. The Eppendorf vials were heated at 50 °C for 3 days and the outcome of the reaction was monitored by LC-MS.

3. Cages formation in different solvents

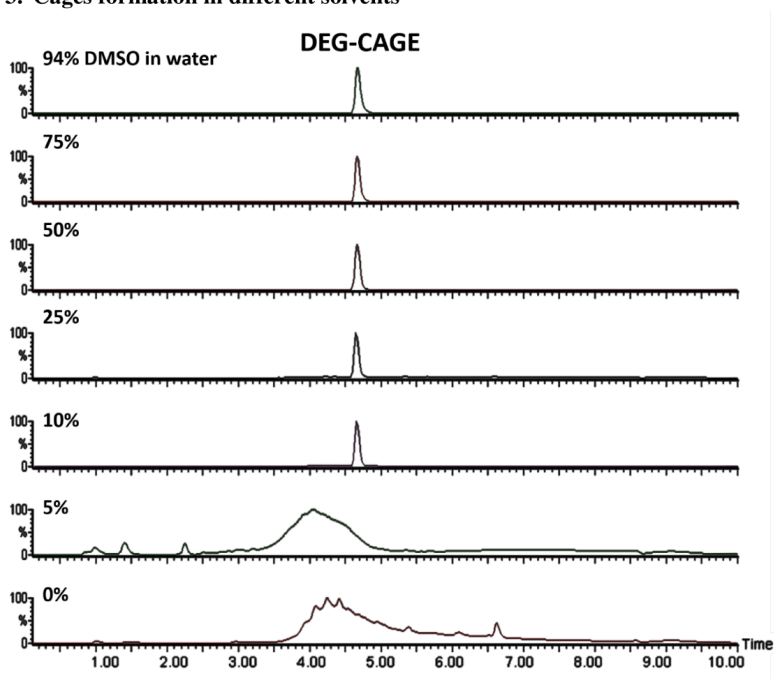


Figure S21. Comparison of HPLC chromatograms (310 nm) of **DEG-Cage** formation in various percentage of DMSO in water. System requires at least 10% of DMSO for exclusive DEG-Cage formation.

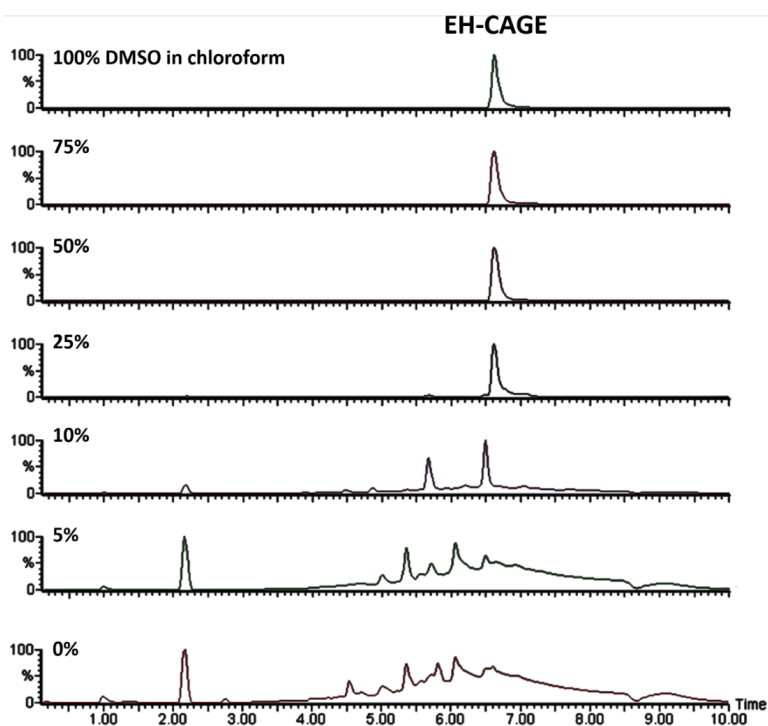


Figure S22. Comparison of HPLC chromatograms (310 nm) of **EH-Cage** formation in various percentage of DMSO in chloroform. System requires at least 25% of DMSO for exclusive **EH-Cage** formation. Partially EH-Cage formation is observed for 10% of DMSO in chloroform.

4. Cages formation intermediates characterization

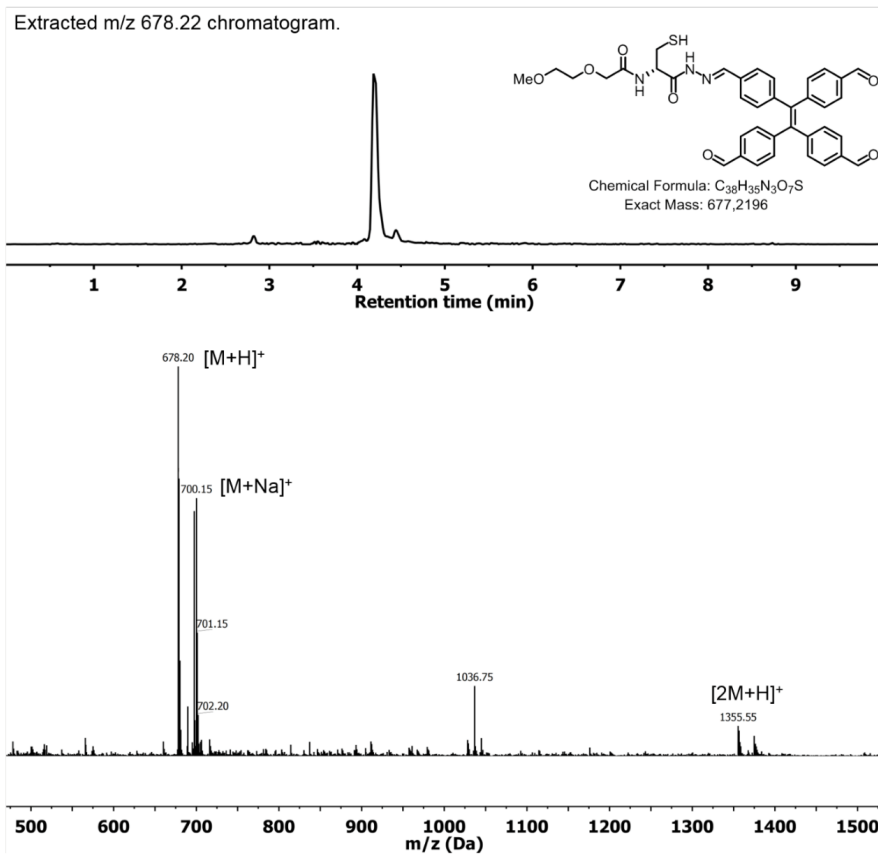


Figure S22. Extracted chromatogram for m/z 678.22 from LC-MS trace of equilibrating mixture of DEG-Cage formation after 24h (top). Mass spectra of DEG-Cage-intermediate, mono-acylhydrazone, calculated m/z for $[M+H]^+$ 678.2269, found 678.20, calculated m/z for $[M+Na]^+$ 700.2088, found 700.15, calculated m/z for $[2M+H]^+$ 1355.4465, found 1355.55 (down).

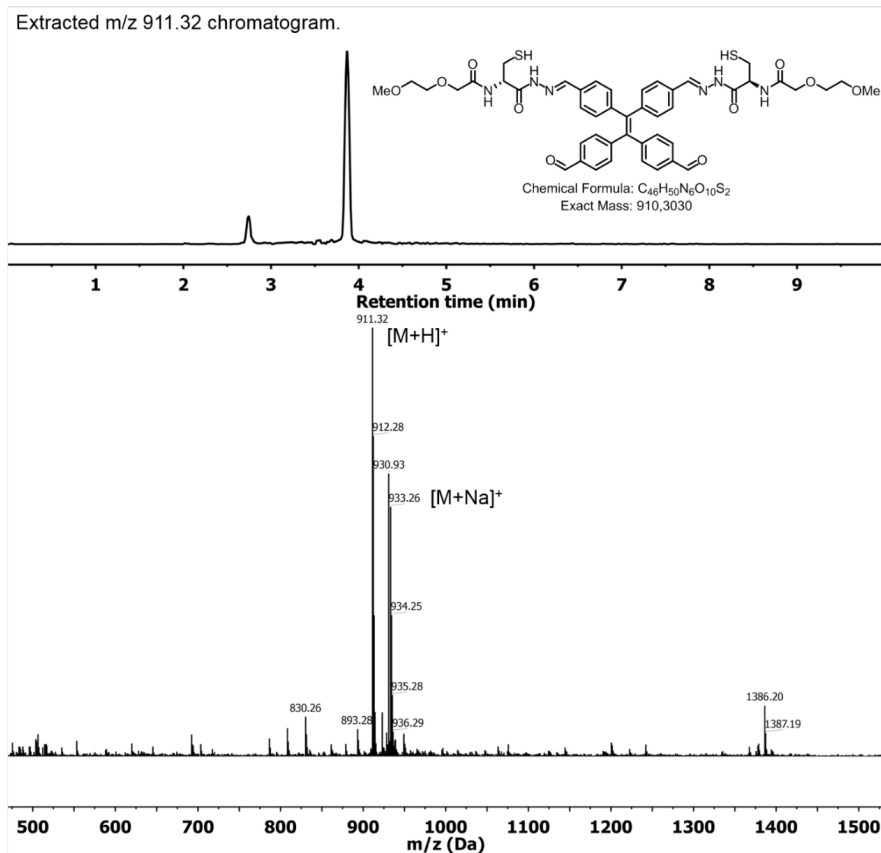


Figure S23. Extracted chromatogram for m/z 911.32 from LC-MS trace of equilibrating mixture of DEG-Cage formation after 24h (top). Mass spectra of DEG-Cage-intermediate, diacylhydrazone, calculated m/z for $[M+H]^+$ 911.3103, found 911.32, calculated m/z for $[M+Na]^+$ 933.2922, found 933.26 (down).

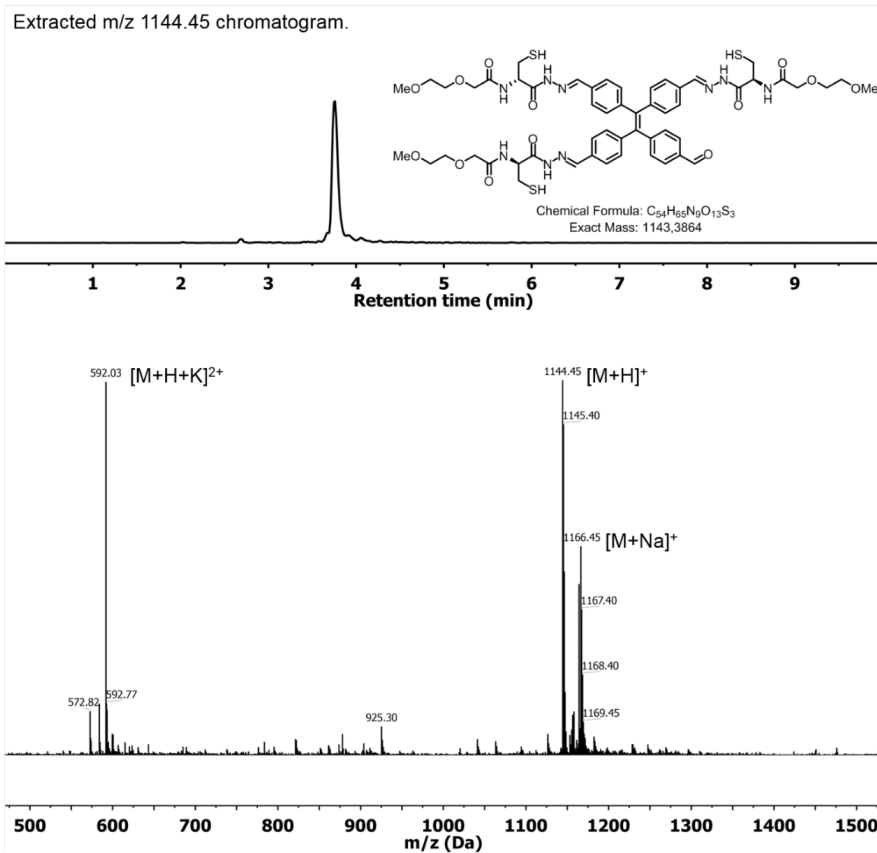


Figure S24. Extracted chromatogram for m/z 1144.45 from LC-MS trace of equilibrating mixture of DEG-Cage formation after 24h (top). Mass spectra of DEG-Cage-intermediate, triacylhydrazone, calculated m/z for $[M+H+K]^{2+}$ 591.6784, found 592.03, calculated m/z for $[M+H]^+$ 1144.3937, found 1144.45, calculated m/z for $[M+Na]^+$ 1166.3756, found 1166.45 (down).

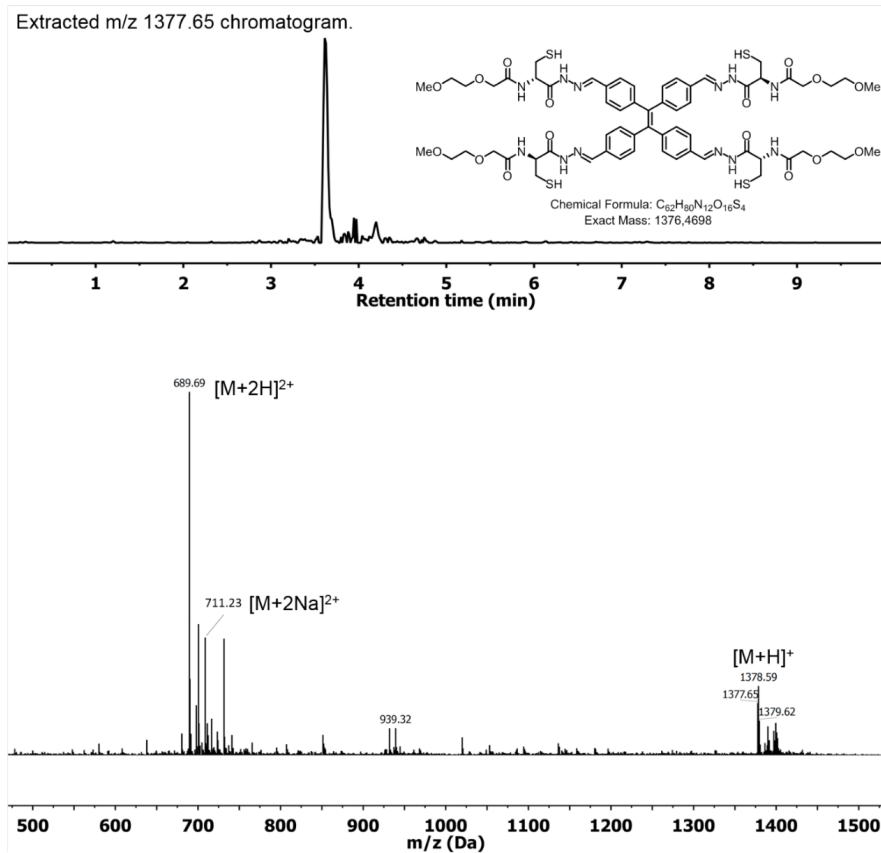


Figure S25. Extracted chromatogram for m/z 1377.65 from LC-MS trace of equilibrating mixture of DEG-Cage formation after 24h (top). Mass spectra of DEG-Cage-intermediate, tetra-acylhydrazone, calculated m/z for $[M+2H]^{2+}$ 689.2422, found 689.69, calculated m/z for $[M+2Na]^{2+}$ 711.2241, found 711.23, calculated m/z for $[M+H]^+$ 1377.4771, found 1377.65 (down).

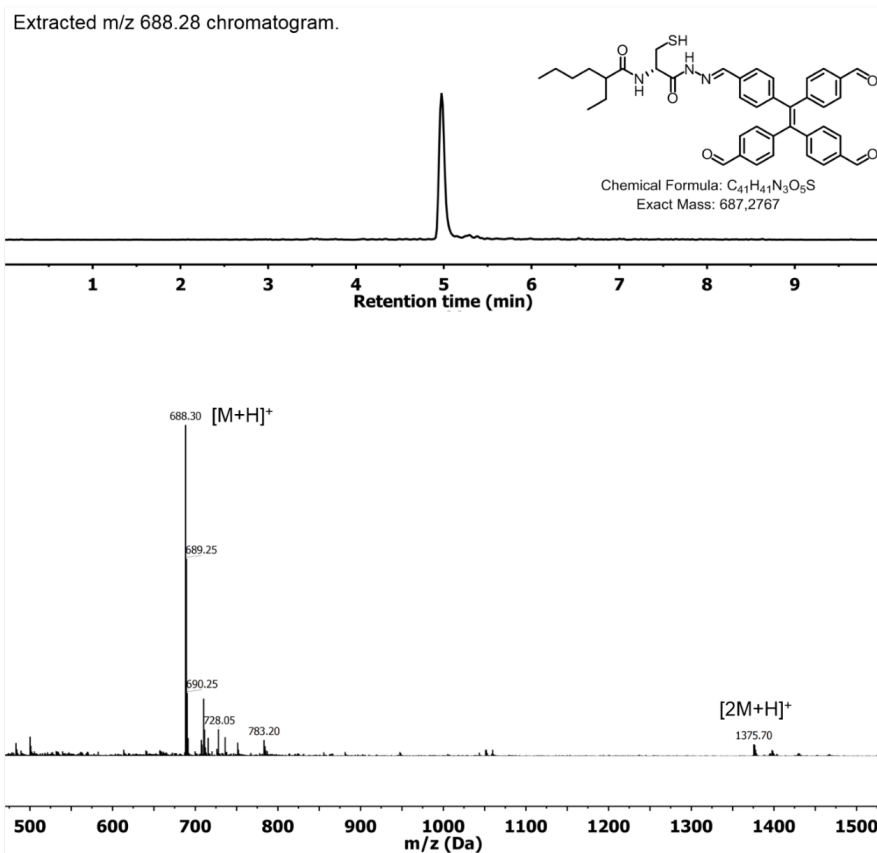


Figure S26. Extracted chromatogram for m/z 688.28 from LC-MS trace of equilibrating mixture of **EH-Cage** formation after 24h (top). Mass spectra of **EH-Cage**-intermediate, monoacylhydrazone, calculated m/z for [M+H]⁺ 688.2839, found 688.30, calculated m/z for [2M+H]⁺ 1375.5607, found 1375.70 (down).

Extracted m/z 931.42 chromatogram.

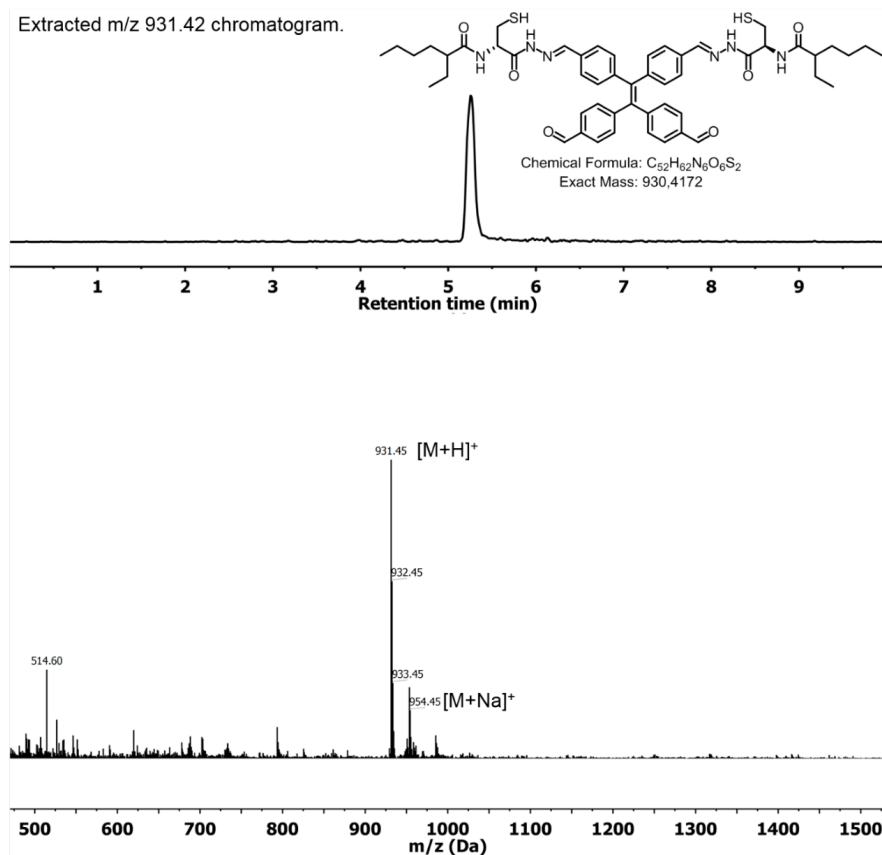


Figure S27. Extracted chromatogram for m/z 931.42 from LC-MS trace of equilibrating mixture of **EH-Cage** formation after 24h (top). Mass spectra of **EH-Cage**-intermediate, diacetylhydrazone, calculated m/z for [M+H]⁺ 931.4245, found 931.45, calculated m/z for [M+Na]⁺ 953.4064, found 953.50 (down).

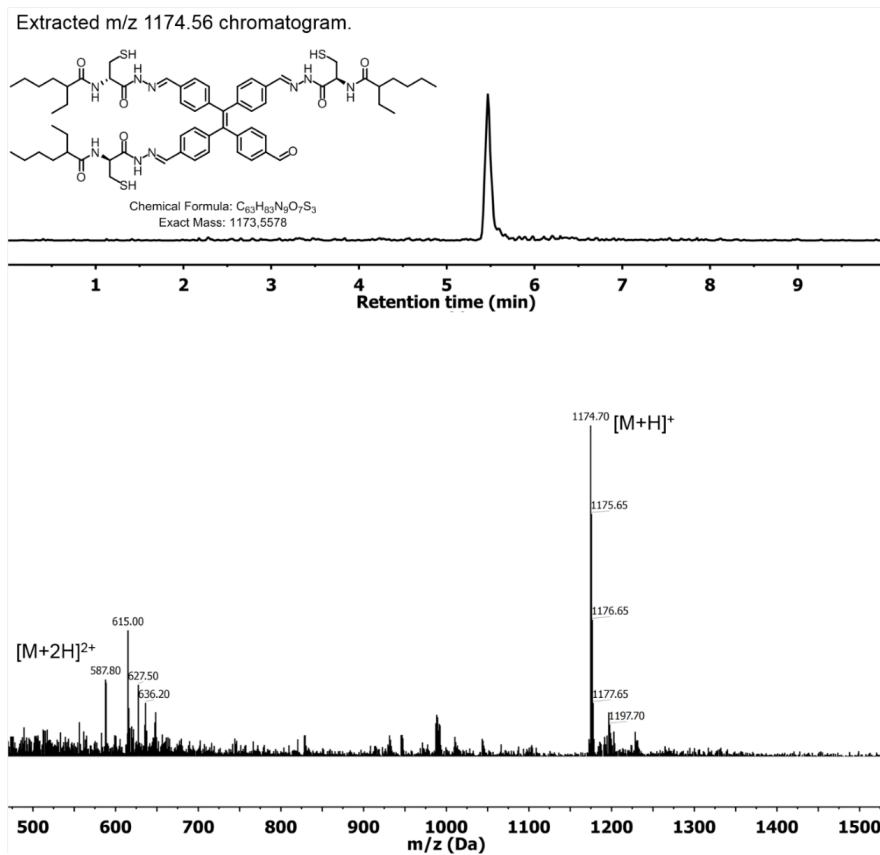


Figure S28. Extracted chromatogram for m/z 1174.56 from LC-MS trace of equilibrating mixture of **EH-Cage** formation after 24h (top). Mass spectra of **EH-Cage**-intermediate, triacylhydrazone, calculated m/z for [M+2H]²⁺ 587.7862, found 587.80, calculated m/z for [M+H]⁺ 1174.5651, found 1174.70 (down).

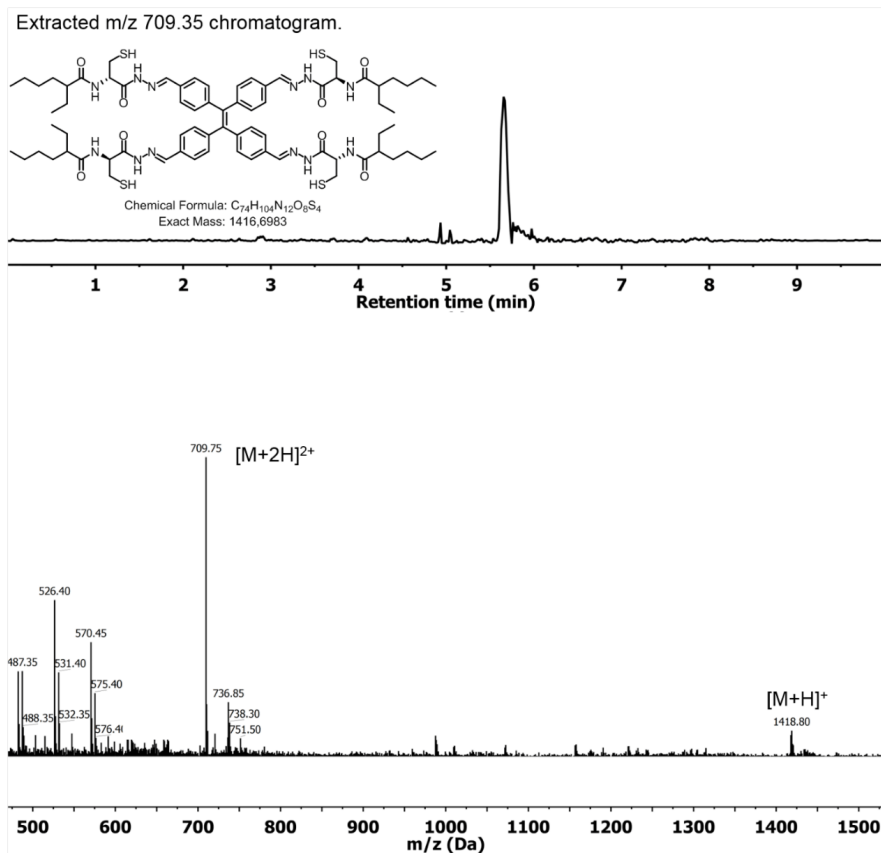


Figure S29. Extracted chromatogram for m/z 709.35 from LC-MS trace of equilibrating mixture of **EH-Cage** formation after 24h (top). Mass spectra of **EH-Cage**-intermediate, tetraacylhydrazone, calculated m/z for $[M+2H]^{2+}$ 709.3564, found 709.75, calculated m/z for $[M+H]^+$ 1417.7056, found 1418.00 (down).

5. NMR Spectra of cages

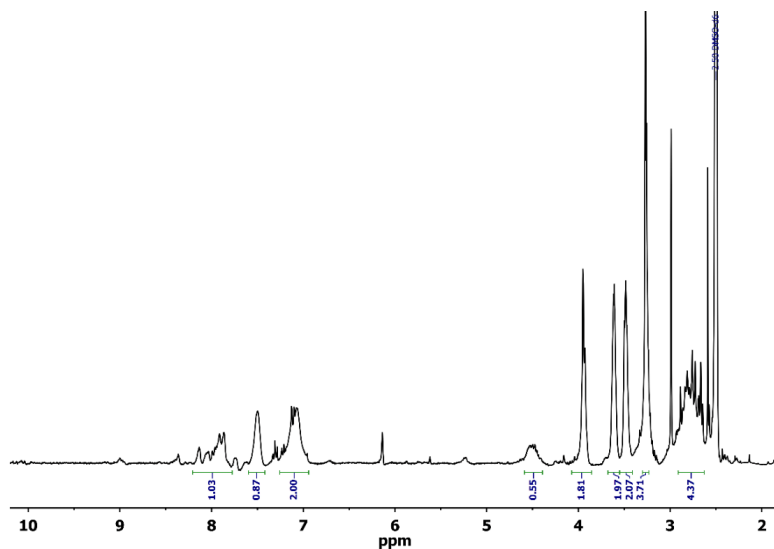


Figure S30. 1H NMR spectra of **DEG-Cage** in DMSO-*d*₆ at 298K (400 MHz).

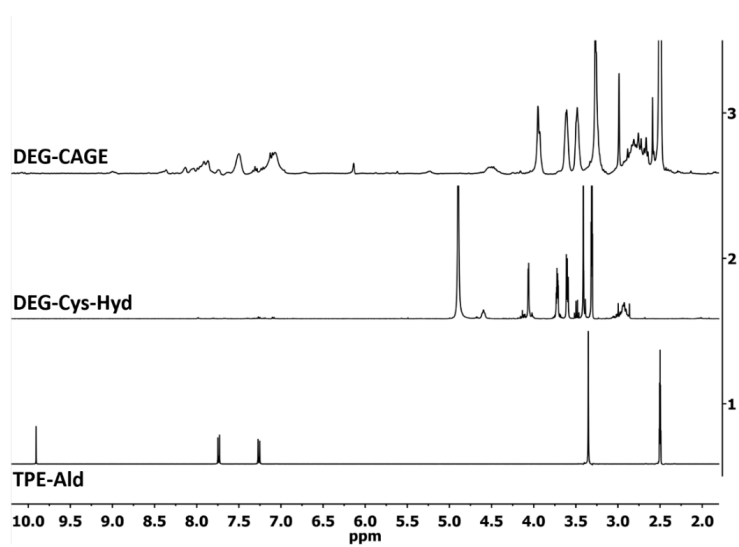


Figure S31. Comparison of 1H NMR spectra of **DEG-Cage** and 1H NMR of substrates **DEG-Cys-Hyd** and **TPE-Ald** at 298K (400 MHz).

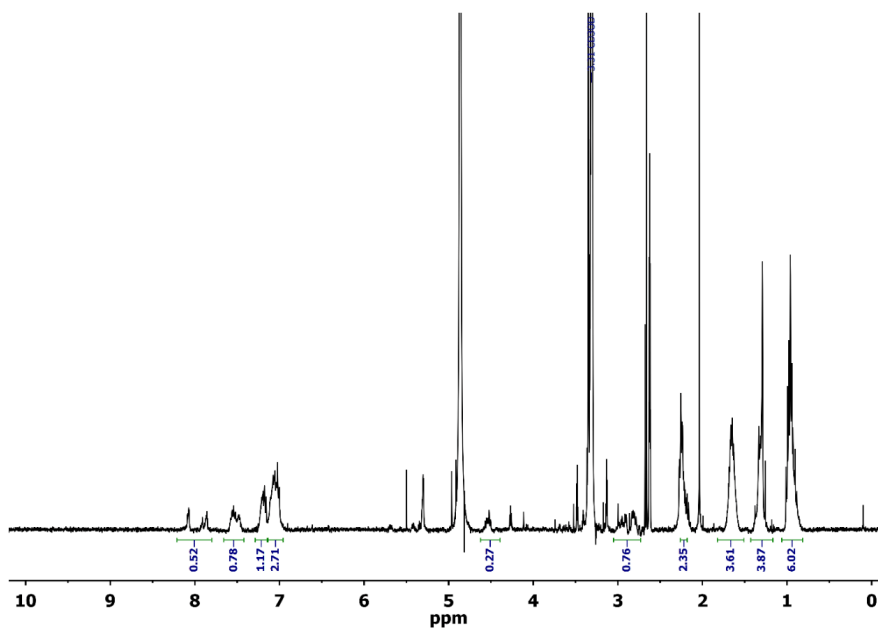


Figure S32. 1H NMR spectra of **EH-Cage** in MeOD-*d*₄ at 298K (400 MHz).

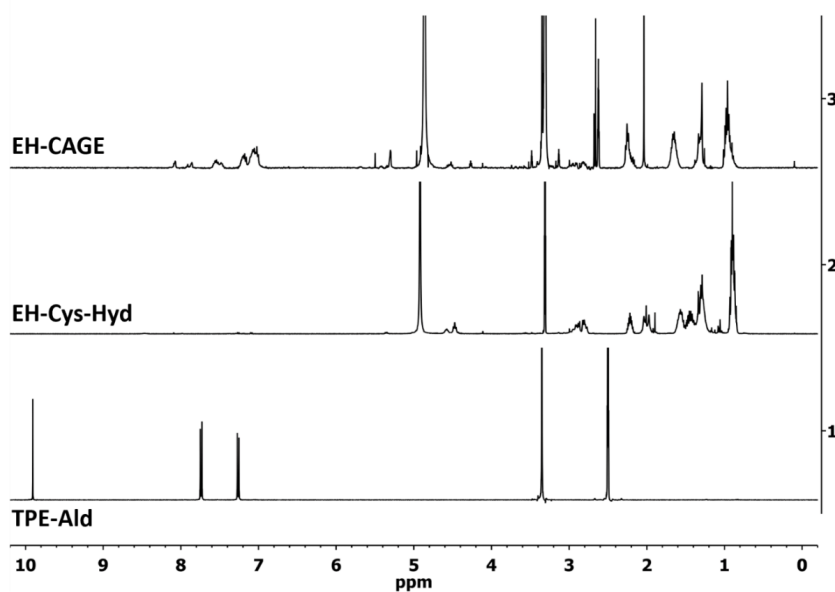


Figure S33. Comparison of 1H NMR spectra of **EH-Cage** and 1H NMR of substrates **EH-Cys-Hyd** and **TPE-Ald** at 298K (400 MHz).

6. Molecular modelling

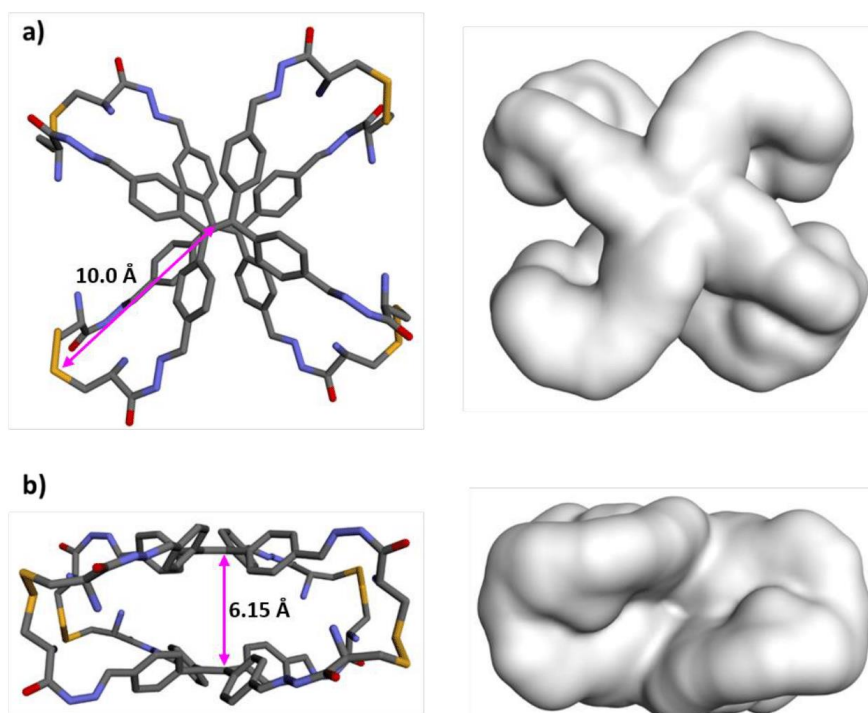
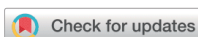


Figure S34. The structure of *N*-unmodified cage optimized using semiempirical method Recife Model 1 (RM1), a reparameterization of AM1 semiempirical method for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I (Rocha, G. B., Freire, R. O., Simas, A. M. and Stewart, J. J., *J. Comput. Chem.*, (2006) 27: 1101-1111.); a) top view, approx. radius 10 Å and b) side view, approx. height 6.15 Å. Estimated spherical volume 2000 Å³. The CPK surface shows no internal cavity inside the molecule.

Cite this: *RSC Adv.*, 2018, 8, 29840Received 9th July 2018
Accepted 16th August 2018

DOI: 10.1039/c8ra05835k

rsc.li/rsc-advances

Highly efficient one-step microwave-assisted synthesis of structurally diverse bis-substituted α -amino acid derived diimides†

Marcin Konopka,^{‡ab} Grzegorz Markiewicz^{‡ab} and Artur R. Stefankiewicz^{‡ab}

We report herein a facile and widely applicable microwave-assisted protocol for the synthesis of symmetrical diimides based on three structurally distinct aromatic dianhydrides: pyromellitic (PMA), biphenyl-tetracarboxylic acid (BPDA) and benzophenone-tetracarboxylic (BTDA) and five natural amino acids (Phe, Tyr, Ile, Lys, Cys). Fifteen symmetrical diimides with different structural characteristics containing a variety of functional groups can be produced with high yields and on a large scale.

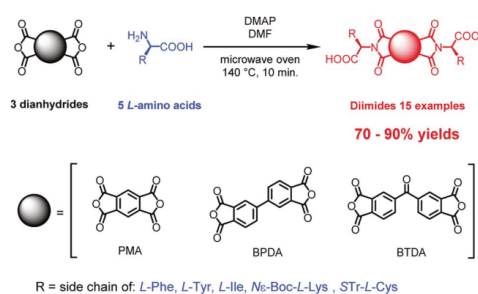
Introduction

Symmetrical diimides have found a wide spectrum of uses in the last decade.¹ The vast majority of these materials have structures based on naphthalene diimide (NDI) or perylene bisimide (PBI) cores.^{1,2} Both systems have constituted essential components of numerous non-covalent polymers^{3,4} and self-assembled supramolecular architectures,^{5,6} and have been used in DNA complexation⁷⁻⁹ and biomolecular recognition.^{10,11} Currently, there is an increased interest in this class of compounds, especially those bearing unique functional substituents and containing alternative central diimide cores, due to their significant application potential in materials chemistry and receptors in supramolecular chemistry.¹²⁻¹⁴ Despite the widely reported synthetic methodologies for the preparation of NDI and PBI derivatives, the literature protocols concerning compounds that are alternatives to them are scant.

It has been previously shown that α -amino acid derived NDIs can be obtained in high yields by microwave assisted synthesis.^{15,16} Although the protocols developed have considerably improved the preparation of these molecules in terms of time and ease of workup, the studies were devoted to a single group of diimides only *i.e.* NDIs, leaving the others to be synthesised by classical synthesis which was found to be dependent in an ill understood manner on the particular choice of dianhydride and amine. Thus, the synthesis of this important group of molecules is still associated with time-consuming and complicated protocols often leading to contaminated products

in low yields.¹⁷⁻¹⁹ In addition, purification of these molecules is usually very difficult because of their generally low solubility and tendency to form undefined polymeric materials. For these reasons, the development of an accessible methodology based on microwave-assisted synthesis of non-NDI/PBI diimides in short reaction times, with easy work up and in high yields is greatly desirable from the viewpoints of both synthesis and the application potential of these molecules.

Here, we describe a one-step process for microwave assisted synthesis of symmetrical α -amino acid derived diimides based on three structurally distinct aromatic cores namely, pyromellitic dianhydride (PMA),²⁰ biphenyl-tetracarboxylic acid dianhydride (BPDA)²¹ and benzophenone-tetracarboxylic acid dianhydride (BTDA)²² (Scheme 1). We chose these anhydrides due to their potential to deliver diimides with properties different to those of NDIs and PBIs. The PMA little core was found as an interesting platform for designing n-channel transistor semiconductors based on pyromellitic diimides.²³ BPDA introduces a free rotation axis in the center of diimide



Scheme 1 General synthetic method for the microwave assisted preparation of symmetrical diimides from three distinct dianhydrides and α -amino acids.



^aFaculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Umultowska 89b, 61-614 Poznań, Poland. E-mail: ars@amu.edu.pl

^bCenter for Advanced Technologies, Adam Mickiewicz University, Umultowska 89c, 61-614 Poznań, Poland

† Electronic supplementary information (ESI) available: ¹H and ¹³C NMR spectra. See DOI: 10.1039/c8ra05835k

‡ These authors contributed equally to this work.

molecule and this offers a means to engender of new class of symmetrical diimides with greater conformational lability. BTDA has a ketone group in the center of molecule which offers prospects for further modification or provision of an attachment point for coupling of two or more diimide molecules into larger systems.²⁴ Use of well-known reversible reactions like imine formation, reductive amination or formation of hemithioacetals was seen as a pathway to further variations. All three aromatic platforms were functionalized with five different amino acids: *L*-phenylalanine, *L*-tyrosine, *L*-isoleucine, *Nε*-Boc-*L*-lysine and *S*-Tr-*L*-cysteine. These were selected as structurally diverse species providing a stringent test of the sensitivity of our methods to the presence of several functional groups. We have prepared fifteen diimides, nine of them new, in very high yields independent of the reaction scale, and without evidence of racemization at the chiral centers.

Results and discussion

General synthetic methodology

The enantiomerically pure diimides were synthesized as shown in Scheme 1. The reactions were conducted in pressure-resistant glass vessels with a total volume of ~10 mL, designed for CEM microwave ovens and closed with silicone/PTFE caps.

The optimal scale for these reactions was to use 0.5 mmol of an anhydride, 1.0 mmol of amino acid, and ~2 mmol of base, which is equal to less than 1 g of total material load. We found that higher loadings led to significant contamination with thermal decomposition products. The reaction mixtures were irradiated for 10 min at 140 °C using full microwave power (300 W) for the temperature ramping (~30 s) followed by short pulses (20–40 W) to maintain the scheduled conditions. After cooling to room temperature, the reaction mixtures were poured into hydrochloric acid (1.0 mol × dm⁻³), the solid product was filtered off, washed with deionized water and dried in high vacuum for 12 h. This procedure turned out to be sufficient to obtain the desired products with high spectroscopic and analytical purity (See Experimental section for details).

Method optimisation

We found that the procedure originally presented by Pantoş *et al.*^{15,16} for naphthalene diimides (NDI), which utilizes DMF as a solvent and triethylamine (Et₃N) as a base catalyst, could also

be used for the systems described here but the use of these reagents is associated with certain difficulties. Although DMF is perfectly suited for conducting nucleophilic reactions under microwave conditions, due to its high dipole moment and low vapor pressure, as well as its stability under microwave conditions, very often its residues are problematic during reaction work-up and purification of the products. Et₃N, due to its very high volatility, generates high pressures (0.5–1.0 MPa) in the closed reaction systems, which limits its application only to expensive high-pressure reactors with fixed volume and synthesis scales. To facilitate reaction work-up and be able to carry out reaction on the larger scales at atmospheric pressure, we therefore investigated modification of this procedure. The reaction between PMA and *L*-phenylalanine was chosen as a model for the optimization of the synthetic methodology. These reagents give the diimide, PMI-Phe, in the form of very fine powder requiring only a simple water wash during workup. Two different solvents, *N,N*-dimethylformamide (DMF) and acetonitrile (MeCN), and three bases: triethylamine (Et₃N), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP), and 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) were selected for the test reactions.

The outcomes of the reactions performed under the different conditions are shown in Table 1. The highest yield (~87%) was observed when DMF and DMAP were employed as solvent and base, respectively. Despite the fact that MeCN slightly reduces the reaction yields (down to ~79% and ~63% for the DABCO and DMAP, respectively), it is an interesting alternative for DMF, especially when fully aliphatic amino acids are used (see ahead). Complete removal of DMF from the products was possible through a combination of several water rinses, ultrasonic irradiation and pumping in vacuum, but in some cases, it was a very time-consuming process. The previously proposed pre-evaporation of the DMF^{15,16} from the reaction mixtures seems to be helpful but it does not solve the trace contamination problem. What we have now found is that the use of acetonitrile instead of DMF greatly facilitates the work-up, and significantly improves the separation and drying processes.

The poorest results were obtained when DMF/DABCO and MeCN/Et₃N pairs were employed. While the first pair is inefficient and gives contaminated products, the second generates high overpressure, which is problematic even for a dedicated microwave reactor. On the basis of these initial observations, we decided to synthesize the entire series of symmetrically functionalised diimides using the DMF/DMAP pair, since this gave the highest yield for the model reaction. As shown in Table 2, all

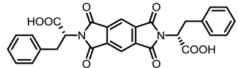
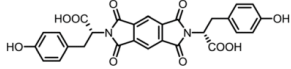
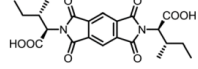
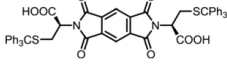
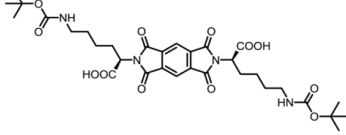
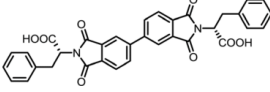
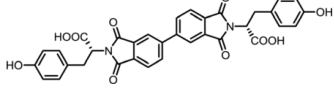
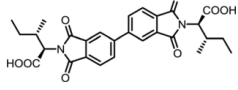
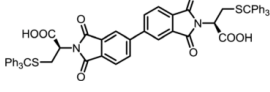
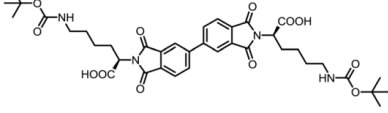
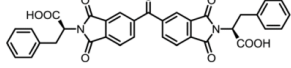
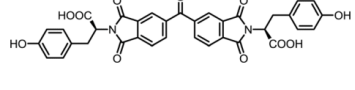
Table 1 Comparison between the reaction yields under different solvent/base conditions for representative reaction between PMA and *L*-Phe

Entry ^a	Base	Solvent	Reaction time ^b (min)	Temp. (°C)	Yield ^c (%)
1	Et ₃ N	DMF	10	140	71–75
2	Et ₃ N	MeCN	10	140	72–74
3	DABCO	DMF	10	140	51–56
4	DABCO	MeCN	10	140	77–81
5	DMAP	DMF	10	140	85–88
6	DMAP	MeCN	10	140	61–65

^a Reactions were carried out on 0.5 mmol of dianhydride, 1.0 mmol of amino acid, 2.0 mmol of base and 5 mL of the solvent. ^b Excluding temperature ramping. ^c Each reaction was repeated 3-times, giving isolation yields in the ranges shown.



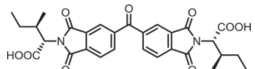
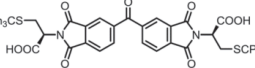
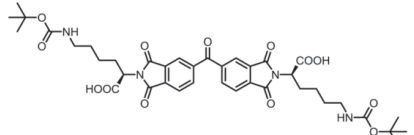
Table 2 List of synthesized symmetrical diimides with structures and abbreviations

Entry	Dianhydride	Amino acid	Product ^a	Abbreviation	Reaction time ^b (min)	Reaction temp. (°C)	Yield ^c (%)
1	PMA	L-Phe		PMI-Phe	10	140	87
2	PMA	L-Tyr		PMI-Tyr	10	140	87
3	PMA	L-Ile		PMI-Ile	10	140	72
4	PMA	S-Tr-L-Cys		PMI-Cys	10	140	75
5	PMA	Nε-Boc-L-Lys		PMI-Lys	10	140	70
6	BPDA	L-Phe		BPDI-Phe	10	140	84
7	BPDA	L-Tyr		BPDI-Tyr	10	140	72
8	BPDA	L-Ile		BPDI-Ile	10	140	72
9	BPDA	S-Tr-L-Cys		BPDI-Cys	10	140	90
10	BPDA	Nε-Boc-L-Lys		BPDI-Lys	10	140	75
11	BTDA	L-Phe		BTDI-Phe	10	140	75
12	BTDA	L-Tyr		BTDI-Tyr	10	140	76

Open Access Article. Published on 23 August 2018. Downloaded on 4/7/2021 2:27:40 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.



Table 2 (Contd.)

Entry	Dianhydride	Amino acid	Product ^d	Abbreviation	Reaction time ^b (min)	Reaction temp. (°C)	Yield ^c (%)
13	BTDA	L-Ile		BTDI-Ile	10	140	79
14	BTDA	S-Tr-L-Cys		BTDI-Cys	10	140	90
15	BTDA	Ne-Boc-L-Lys		BTDI-Lys	10	140	70

^a Reactions were carried out on 0.5 mmol of dianhydride, 1.0 mmol of amino acid and 2.0 mmol of DMAP in 5 mL of DMF. ^b Excluding temperature ramping. ^c Yield of isolated product.

fifteen different diimides were obtained in high yields and purities, indicating the broad utility of the procedure and thus that it should be useful for the synthesis of any desired diimide. We have not found any marked dependence on the structure of the substrates used and consider that the minor variations in yield are probably due to differences in solvation. In Fig. 1 we present the stacked ¹H-NMR spectra of molecules PMI-Phe (blue), BPDl-Phe (green), BTDI-Phe (red) with L-phenylalanine and three structurally different dianhydrides. Signals due to the α-CH and β-CH₂ protons of the amino acid residue appear at essentially identical positions (≈ 5.2 and 3.4 ppm, respectively).

Importantly, it was previously found that racemization of amino acid may occur when the fusion with anhydride is

conducted at high temperature.²⁵ In the present case, due to the presence of two chiral centers, it is possible to generate three products with *LL*, *DD* and *DL* configurations. However, the high symmetry of signals in the ¹H NMR spectra, namely single set of resonances for α-CH and β-CH₂ protons implies that the applied methodology leads to the formation of enantiomerically pure products. The only noticeable but obvious difference between the three spectra is the distribution of aromatic signals from central aromatic cores.

To further confirm this, we performed the test reaction between PMA dianhydride and racemic tyrosine. Indeed as expected, the use of the substrate in its racemic form has led to a mixture of diastereomeric products whose presence was manifested by the multiplication of all resonances in the ¹H NMR spectrum, in contrast to the fully symmetrical spectrum observed when chirally pure amino acids were used (Fig. 2).

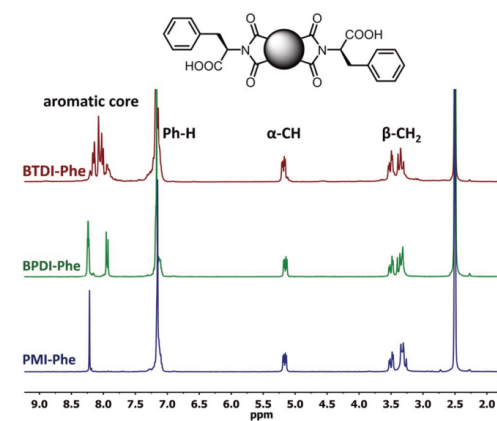


Fig. 1 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) spectra of PMI-Phe (blue), BPDl-Phe (green), BTDI-Phe (red). Peaks description: α-CH (2H), β-CH₂ (4H) and Ph-H (10H) stands from L-phenylalanine moieties.

Large scale synthesis

The synthesis of symmetrical diimides is usually the first step in the synthesis of functionalized monomers used in self-assembled systems such as dynamers,²⁶ so relatively large quantities of these precursors are often required. Therefore, we investigated whether the method above might be applied in reaction at a larger scale while maintaining the high yields and purities obtained in test reactions.

The high scale reactions were performed using 10.0 mmol of appropriate amino acid, and 5.0 mmol of dianhydride. The non-pressurized DMF/DMAP system was found to be well suited for the open vessel conditions. Reactions were conducted in a standard 100 mL round-bottom flask with an air-cooled condenser to provide reflux. Using the standard reaction times (10 min) the expected products were obtained in essentially identical yields compared to that observed in low scale under pressurized conditions. We were able to obtain up to 5 g



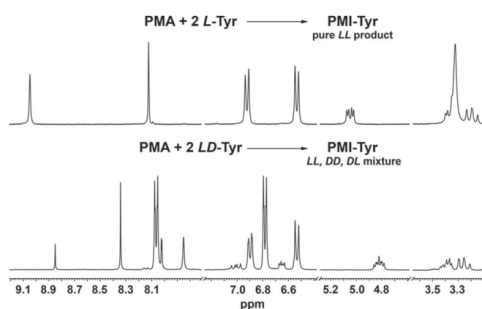


Fig. 2 ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spectra of the products isolated after reaction of PMA dianhydride with chirally pure L-tyrosine (top) and racemic tyrosine (bottom).

of pure diimide in one large-scale batch and use it for further modification. The MeCN/DABCO system was also found to be useful in open-vessel reactions but due to the low boiling point of acetonitrile (82°C), it was necessary to extend the reaction time up to 20 minutes in order to obtain yields comparable to that obtained under high pressure. The results of six large scale syntheses are shown in Table 3.

By conducting reactions at lower temperature (82°C , 10 min) in the MeCN/DABCO mixture we were able to observe reaction intermediates, among which the most interesting are mono-substitution products that are essential in the synthesis of unsymmetrical bis-substituted compounds. Unfortunately, despite the utilisation of both thermodynamic and stoichiometric control, we were not able to isolate them using methodology presented in this work, as their high solubility in all range of solvents prevents their effective precipitation from reaction mixtures. Although it was possible to separate the monosubstituted products by reverse phase HPLC methods, we believe that easier and more efficient synthetic and isolation protocols may be developed which will open the way for the desymmetrisation of the presented diimides in the future.

Experimental

General considerations

All chemicals and solvents were purchased from commercial sources and used as received. NMR solvents were purchased

from Deutero GmbH (Germany). NMR spectra were acquired on Bruker Fourier 300 spectrometer equipped with $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 5 mm probe, at 298 K and were referenced on solvent residual peaks. Mass spectra were recorded on Bruker Impact HD Q-TOF spectrometer in negative ion mode. Elemental analyses were obtained using an Elemental Analyser Vario EL III. Samples were dried for 12 h under high vacuum prior to analysis. The microwave assisted reactions were performed on CEM Discover SP oven.

General method for the synthesis of symmetrical diimides

A representative example is that of the PMA and L-phenylalanine reaction. L-Phenylalanine (165.2 mg, 1.0 mmol), PMA (109.0 mg, 0.5 mmol) and DMAP (244.0 mg, 2.0 mmol) were placed in a glass vessel and suspended in 5 mL of dry DMF. The mixture was sonicated until complete dissolution had occurred. The vessel was sealed with a silicon cap and placed in a microwave oven. The mixture was heated at 140°C for 10 min. After cooling, the mixture was poured into 50 mL of hydrochloric acid ($1\text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$). The precipitate was filtered off and washed with 200 mL of water to remove residual DMF. The solid residue was dried under high vacuum. Yield: 223 mg (87%) of PMI-Phe.

General method for the large-scale synthesis of symmetrical diimides

A representative example again is that of the PMA/L-phenylalanine reaction. PMA (1.09 g, 5.0 mmol), L-phenylalanine (1.65 g, 10.0 mmol) and DMAP (2.44 g, 20.0 mmol) were placed in 100 mL round-bottom flask and dissolved in 50 mL of dry DMF. The solution was heated in the microwave oven at 180 W for 10 min under open vessel conditions with an air condenser. The resulting solution was concentrated to a 10 mL volume on a rotary evaporator before being mixed with 200 mL of hydrochloric acid ($1\text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$). The white precipitate was filtered off, washed with 500 mL of water and dried under high vacuum. Yield 2.12 g (83%) of PMI-Phe.

PMI-Phe. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.47 (s, 2H), 8.22 (s, 2H), 7.23–7.07 (m, 10H), 5.16 (dd, $J = 11.3, 4.8$ Hz, 2H), 3.50 (dd, $J = 14.1, 4.8$ Hz, 2H), 3.39–3.24 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 169.61, 165.18, 137.11, 136.24, 128.75, 128.40, 126.66, 118.51, 53.60, 33.92. ESI-MS: m/z calculated for: $[\text{M} - \text{H}]^-$ 511.1147, found: 511.1153. Elemental analysis calcd (%) for

Table 3 Large scale synthesis results

Entry	Product ^a	Solvent	Base	Reaction time ^b (min)	Reaction temp. ($^\circ\text{C}$)	Yield ^c (%)
1	PMI-Phe	DMF	DMAP	10	145 ^c	88
2	PMI-Ile	MeCN	DABCO	20	82 ^d	70
3	BPDI-Phe	DMF	DMAP	10	145 ^c	82
4	BPDI-Ile	DMF	DMAP	10	145 ^c	71
5	BTDI-Phe	DMF	DMAP	10	145 ^c	73
6	BTDI-Ile	MeCN	DABCO	20	82 ^d	75

^a Reactions were carried out on 5.0 mmol of dianhydride, 10.0 mmol of amino acid and 20.0 mmol of base in 50 mL of given solvent. ^b At constant microwave power = 180 W. ^c $\pm 5^\circ\text{C}$ maintained at constant power. ^d Boiling point of the solvent. ^e Yield of isolated product.



$C_{28}H_{20}N_2O_8$: C 65.62, H 3.93, N 5.47; found: C 65.75, H 3.82, N 5.52.

PMI-Tyr. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.40 (s, 2H), 9.15 (s, 2H), 8.22 (s, 2H), 6.92 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 6.53 (d, J = 7.9 Hz, 4H), 5.05 (dd, J = 11.6, 4.8 Hz, 2H), 3.43–3.29 (m, 2H), 3.25–3.13 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 169.69, 165.21, 155.89, 136.26, 129.70, 127.05, 118.48, 115.23, 53.97, 33.07. ESI-MS: m/z calculated for: $[M - H]^-$ 543.1045, found: 543.1048. Elemental analysis calcd (%) for $C_{28}H_{20}N_2O_{10}$: C 61.77, H 3.70, N 5.15; found: C 61.72, H 3.73, N 5.11.

PMI-Ile. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.16 (s, 2H), 8.33 (s, 2H), 4.60 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 2.45–2.31 (m, 2H), 1.50 (ddd, J = 13.4, 7.6, 3.6 Hz, 2H), 1.06 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 1.03–0.92 (m, 2H), 0.81 (t, J = 7.3 Hz, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 169.46, 165.80, 136.54, 118.44, 57.02, 34.05, 25.28, 16.66, 10.93. ESI-MS: m/z calculated for: $[M - H]^-$ 443.1460, found: 443.1461. Elemental analysis calcd (%) for $C_{22}H_{24}N_2O_8$: C 59.46, H 5.44, N 6.30; found: C 59.34, H 5.48, N 6.34.

PMI-Lys. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.27 (s, 2H), 8.32 (s, 2H), 6.71 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 4.80 (dd, J = 7.7 Hz, 2H), 2.84 (q, J = 6.4 Hz, 4H), 2.14–2.05 (m, 4H), 1.40–1.21 (m, 26H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 170.15, 165.66, 155.55, 136.67, 118.31, 77.27, 52.34, 28.99, 28.18, 27.71, 23.06. ESI-MS: m/z calculated for: $[M - H]^-$ 673.2726, found: 673.2737. Elemental analysis calcd (%) for $C_{32}H_{44}N_4O_{12}$: C 56.97, H 6.27, N 8.30; found: C 57.13, H 6.25, N 8.40.

PMI-Cys. 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13.66 (s, 2H), 8.38–8.27 (m, 2H), 7.30–7.26 (m, 32H), 4.59 (ddp, J = 14.2, 9.2, 4.8 Hz, 2H), 3.11–3.03 (m, 2H), 3.01–2.94 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 168.52, 165.02, 143.75, 136.42, 129.03, 128.31, 128.12, 126.22, 66.66, 55.82, 39.52, 30.37. ESI-MS: m/z calculated for: $[M - H]^-$ 907.2153, found: 907.2158. Elemental analysis calcd (%) for $C_{54}H_{40}N_2O_8S_2$: C 71.35, H 4.44, N 3.08; found: C 71.44, H 4.73, N 3.11.

BPDI-Phe. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.38 (s, 2H), 8.31–8.18 (m, 4H), 7.94 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.22–7.08 (m, 10H), 5.15 (dd, J = 11.6, 4.8 Hz, 2H), 3.50 (dd, J = 14.1, 4.9 Hz, 2H), 3.42–3.35 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 170.04, 166.68, 144.64, 137.30, 134.14, 131.70, 130.46, 128.74, 128.37, 126.61, 124.05, 122.61, 53.11, 33.96. ESI-MS: m/z calculated for: $[M - H]^-$ 587.1460, found: 587.1465. Elemental analysis calcd (%) for $C_{34}H_{24}N_2O_8$: C 69.38, H 4.11, N 4.76; found: C 69.42, H 4.27, N 4.82.

BPDI-Tyr. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.32 (s, 2H), 9.15 (s, 2H), 8.29–8.16 (m, 4H), 7.97–7.93 (m, 2H), 6.94 (d, J = 8.1 Hz, 4H), 6.55 (d, J = 8.1 Hz, 4H), 5.05 (dd, J = 11.6, 4.9 Hz, 2H), 3.37 (dd, J = 14.2, 4.9 Hz, 2H), 3.25 (dd, J = 14.2, 11.7 Hz, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 170.16, 166.77, 155.89, 144.68, 134.14, 131.77, 130.53, 129.71, 127.27, 124.06, 122.62, 115.23, 53.44, 33.14. ESI-MS: m/z calculated for: $[M - H]^-$ 619.1358, found: 619.1359. Elemental analysis calcd (%) for $C_{34}H_{24}N_2O_{10}$: C 65.81, H 3.90, N 4.51; found: C 65.77, H 4.03, N 4.62.

BPDI-Ile. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.07 (s, 2H), 8.33 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 8.05 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 4.55 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 2.39 (t, J = 8.3 Hz, 2H), 1.49 (ddd, J = 13.5, 7.5, 3.5 Hz, 2H), 1.07 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 1.04–0.94 (m, 2H), 0.81 (t, J = 7.3 Hz, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 169.87, 167.13, 144.77,

134.09, 132.05, 130.78, 124.19, 122.63, 56.56, 33.94, 16.85, 10.87. ESI-MS: m/z calculated for: $[M - H]^-$ 519.1773, found: 519.1764. Elemental analysis calcd (%) for $C_{28}H_{28}N_2O_8$: C 64.61, H 5.42, N 5.38; found: C 64.67, H 5.73, N 5.31.

BPDI-Lys. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.19 (s, 2H), 8.33 (d, J = 7.3 Hz, 4H), 8.04 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.74 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 4.76 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 2.86 (q, J = 6.2 Hz, 4H), 2.20–2.02 (m, 4H), 1.30 (s, 26H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 170.53, 167.04, 155.56, 144.70, 133.98, 132.21, 130.93, 124.15, 122.52, 77.27, 51.91, 29.02, 28.97, 28.20, 27.80, 23.16. ESI-MS: m/z calculated for: $[M - H]^-$ 749.3039, found: 749.3042. Elemental analysis calcd (%) for $C_{38}H_{46}N_4O_{12}$: C 60.79, H 6.18, N 7.46; found: C 60.73, H 6.23, N 7.51.

BPDI-Cys. 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.33 (dd, J = 24.6, 16.7 Hz, 4H), 8.04 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.28–7.20 (m, 30H), 4.56 (dd, J = 11.4, 4.5 Hz, 2H), 3.09 (t, J = 12.9 Hz, 2H), 2.91 (dd, J = 13.1, 4.3 Hz, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 168.86, 166.50, 143.97, 143.76, 129.02, 128.32, 128.10, 127.76, 127.50, 126.88, 126.22, 66.50, 55.77, 39.52, 30.59. ESI-MS: m/z calculated for: $[M - H]^-$ 983.2466, found: 983.2485. Elemental analysis calcd (%) for $C_{60}H_{44}N_2O_8S_2$: C 73.15, H 4.50, N 2.84; found: C 73.24, H 4.63, N 2.89.

BTDI-Phe. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.49 (s, 2H), 8.24–8.10 (m, 3H), 8.06–7.97 (m, 3H), 7.18 (d, J = 4.2 Hz, 10H), 5.18 (dd, J = 11.6, 4.8 Hz, 2H), 3.51 (dd, J = 14.1, 5.0 Hz, 2H), 3.35 (dd, J = 14.0, 11.5 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 193.05, 169.86, 166.28, 141.85, 137.22, 136.35, 133.59, 130.86, 128.73, 128.38, 126.64, 124.05, 123.85, 53.28, 33.94. ESI-MS: m/z calculated for: $[M - H]^-$ 615.1409, found: 615.1413. Elemental analysis calcd (%) for $C_{35}H_{24}N_2O_9$: C 68.18, H 3.92, N 4.54; found: C 68.33, H 3.83, N 4.61.

BTDI-Tyr. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.43 (s, 2H), 9.17 (s, 2H), 8.19–8.00 (m, 6H), 6.94 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 6.56 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 5.08 (dd, J = 11.5, 4.9 Hz, 2H), 3.38 (dd, J = 14.2, 4.9 Hz, 2H), 3.24 (dd, J = 14.2, 11.6 Hz, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 193.09, 169.98, 166.34, 155.89, 141.86, 136.39, 133.67, 130.94, 129.69, 127.16, 124.07, 123.85, 115.23, 53.61, 33.10. ESI-MS: m/z calculated for: $[M - H]^-$ 647.1307, found: 647.1309. Elemental analysis calcd (%) for $C_{35}H_{24}N_2O_{11}$: C 64.82, H 3.73, N 4.32; found: C 64.87, H 3.93, N 4.26.

BTDI-Ile. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.12 (s, 2H), 8.26–8.09 (m, 6H), 4.57 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 2.47–2.30 (m, 2H), 1.62–1.38 (m, 2H), 1.07 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 1.02–0.86 (m, 2H), 0.81 (t, J = 7.3 Hz, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 193.30, 169.68, 166.75, 141.86, 136.24, 134.03, 131.26, 124.13, 123.93, 56.74, 33.99, 25.33, 16.75, 10.91. ESI-MS: m/z calculated for: $[M - H]^-$ 547.1722, found: 547.1725. Elemental analysis calcd (%) for $C_{29}H_{28}N_2O_9$: C 63.50, H 5.15, N 5.11; found: C 63.57, H 5.25, N 5.24.

BTDI-Lys. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.22 (s, 2H), 8.27–7.97 (m, 6H), 6.73 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.77 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.86 (dd, J = 12.5, 6.3 Hz, 4H), 2.09 (t, J = 7.9 Hz, 4H), 1.48–1.11 (m, 26H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 193.31, 170.38, 166.66, 155.57, 141.81, 136.17, 134.20, 131.41, 124.02, 123.92, 77.31, 52.10, 29.02, 28.22, 27.80, 27.73, 23.14. ESI-MS: m/z calculated for: $[M - H]^-$ 777.2989, found: 777.3006. Elemental analysis



calcd (%) for C₃₉H₄₆N₄O₁₃: C 60.15, H 5.95, N 7.19; found: C 60.32, H 6.13, N 7.27.

BTDI-Cys. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.57 (s, 2H), 8.27–8.20 (m, 3H), 8.17–8.09 (m, 3H), 7.29 (dd, *J* = 9.2, 5.9 Hz, 30H), 4.62 (dd, *J* = 11.0, 5.0 Hz, 2H), 3.15–3.08 (m, 2H), 2.98 (dd, *J* = 14.1, 5.0 Hz, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 193.14, 168.78, 166.10, 143.96, 143.77, 129.07, 129.05, 128.33, 128.13, 127.81, 127.51, 126.92, 126.23, 66.66, 55.85, 30.46. ESI-MS: *m/z* calculated for: [M – H][–] 1011.2415, found: 1011.2435. Elemental analysis calcd (%) for C₆₁H₄₄N₂O₉S₂: C 72.32, H 4.38, N 2.77; found: C 72.51, H 4.51, N 2.71.

Conclusions

In conclusion, the use of microwave heating and an appropriate choice of solvent/base pair provide an efficient means of preparing a diverse family of symmetrical diimides based on three structurally distinct aromatic cores and five different amino acids. The developed methodology shows that the syntheses are equally efficient under pressure (small scale) or in open vessels (large scale). The reactions proceed without racemization at α-centre and led to enantiomerically clean products. Short reaction times and facile workup make the developed protocol extremely useful, the present work having provided a library of functionalised diimides with a variety of possible applications.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We thank the Polish National Centre for Research and Development (LIDER 024/391/L-5/13/NCBR/2014) and Polish National Science Centre (UMO-2017/25/N/ST5/00451) for funding.

Notes and references

- 1 M. Al Kobaisi, S. V. Bhosale, K. Latham, A. M. Raynor and S. V. Bhosale, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 11685–11796.
- 2 M. J. Robb, B. Newton, B. P. Fors and C. J. Hawker, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**, 6360–6365.
- 3 T. Seki, S. Yagai, T. Karatsu and A. Kitamura, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 3328–3335.
- 4 F. Fennel, J. Gershberg, M. Stolte and F. Würthner, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, **20**, 7612–7620.
- 5 M. A. Squillaci, G. Markiewicz, A. Walczak, A. Ciesielski, A. R. Stefankiewicz and P. Samori, *Chem. Commun.*, 2017, **53**, 9713–9716.
- 6 A. R. Stefankiewicz, E. Tamanini, G. D. Pantoş and J. K. Sanders, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 5725–5728.
- 7 V. L. Malinovskii, D. Wenger and R. Haner, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 410–422.
- 8 D. Gori, X. Zhang and F. Würthner, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 6328–6348.
- 9 J. Gershberg, M. Radić Stojković, M. Škugor, S. Tomić, H. Rehm Thomas, S. Rehm, R. Saha-Möller Chantou, I. Piantanida and F. Würthner, *Chem.–Eur. J.*, 2015, **21**, 7886–7895.
- 10 R. E. Dawson, A. Hennig, D. P. Weimann, D. Emery, V. Ravikumar, J. Montenegro, T. Takeuchi, S. Gabutti, M. Mayor, J. Mareda, C. A. Schalley and S. Matile, *Nat. Chem.*, 2010, **2**, 533–538.
- 11 M. Safont-Sempere Marina, P. Osswald, K. Radacki and F. Würthner, *Chem.–Eur. J.*, 2010, **16**, 7380–7384.
- 12 D.-J. Liaw, F.-C. Chang, J.-H. Liu, K.-L. Wang, K. Faghihi, S.-H. Huang, K.-R. Lee and J.-Y. Lai, *Polym. Degrad. Stab.*, 2007, **92**, 323–329.
- 13 X. Cao, A. Gao, H. Lv, H. Lan, Q. Cheng and N. Zhao, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 48500–48505.
- 14 Q. Zheng, J. Huang, A. Sarjeant and H. E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 14410–14411.
- 15 P. Pengo, G. D. Pantoş, S. Otto and J. K. Sanders, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 7063–7066.
- 16 K. Tambara, N. Ponnuswamy, G. Henrich and G. D. Pantoş, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 3338–3347.
- 17 H. Toiserkani and M. Rafiaee, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2013, **86**, 289–295.
- 18 A. Feyzi, K. Faghihi, A. Raesi, M. Koushki and M. Farahani, *J. Chil. Chem. Soc.*, 2013, **58**, 1884–1887.
- 19 K. A. Murphy, A. S. Zebertavage, B. E. Kiliman and D. A. Shipp, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2013, **51**, 4637–4642.
- 20 B. K. Manukian, P. Niklaus and H. Ehrsam, *Helv. Chim. Acta*, 1969, **52**, 1259–1273.
- 21 H. Iataaki and H. Yoshimoto, *J. Org. Chem.*, 1973, **38**, 76–79.
- 22 N. Finch, C. W. Gemenden and B. P. Korzun, *J. Org. Chem.*, 1976, **41**, 2509–2514.
- 23 Q. Zheng, J. Huang, A. Sarjeant and H. E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 14410–14411.
- 24 T. Abdinejad, M. R. Zamanloo, T. Alizadeh and N. O. Mahmoodi, *Dyes Pigm.*, 2017, **146**, 203–209.
- 25 J. C. Sheehan, D. W. Chapman and R. W. Roth, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 3822–3825.
- 26 N. Roy, B. Bruchmann and J. M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 3786–3807.



Electronic Supplementary Information (ESI)

Highly efficient one-step microwave-assisted synthesis of structurally diverse bis-substituted α -amino acid derived diimides

Marcin Konopka^{§a, b}, Grzegorz Markiewicz^{§a, b} and Artur R. Stefankiewicz^{*a, b}

^a Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań, Poland.

^b Center for Advanced Technologies, Adam Mickiewicz University, ul. Umultowska 89c, 61-614 Poznań, Poland.

[§] These authors contributed equally to this work.

Table of contents

1. ¹ H and ¹³ C NMR Spectra	2
1.1 PMIs	2
1.2 BPDIs	7
1.3 BTDis	12

1. ¹H and ¹³C NMR Spectra

1.1 PMIs

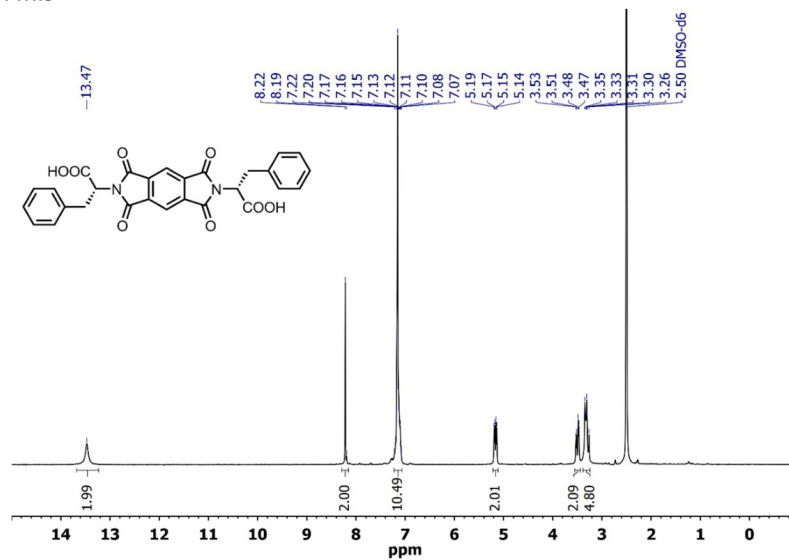


Figure S1. ¹H NMR (300 MHz DMSO *d*-6) spectrum of PMI-Phe.

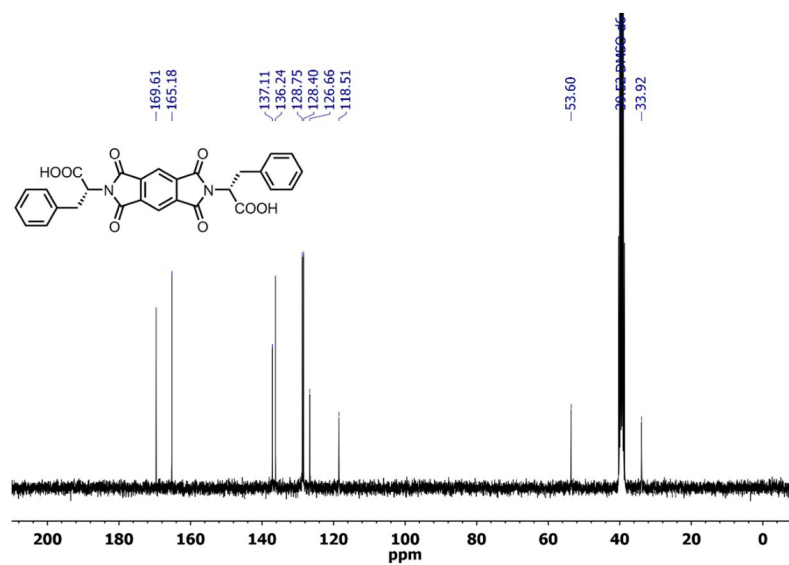


Figure S2. ¹³C NMR (75 MHz DMSO *d*-6) spectrum of PMI-Phe.

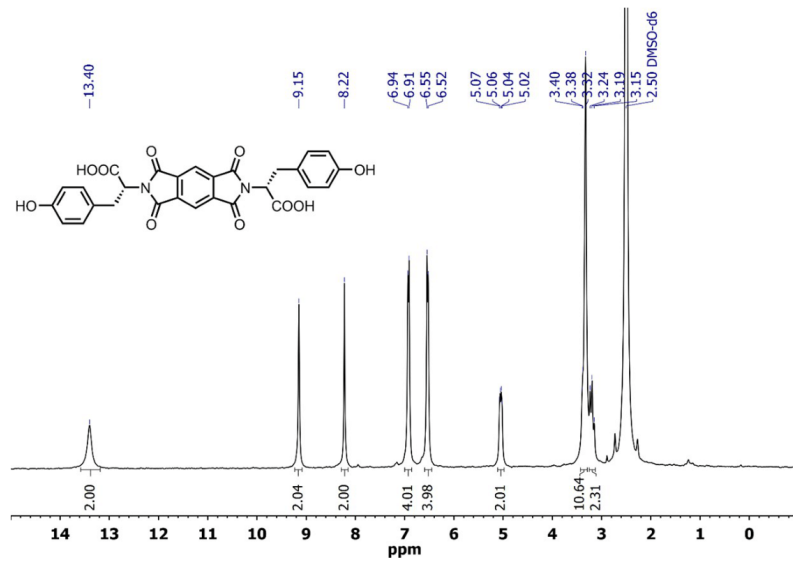


Figure S3. ¹H NMR (300 MHz DMSO *d*-6) spectrum of PMI-Tyr.

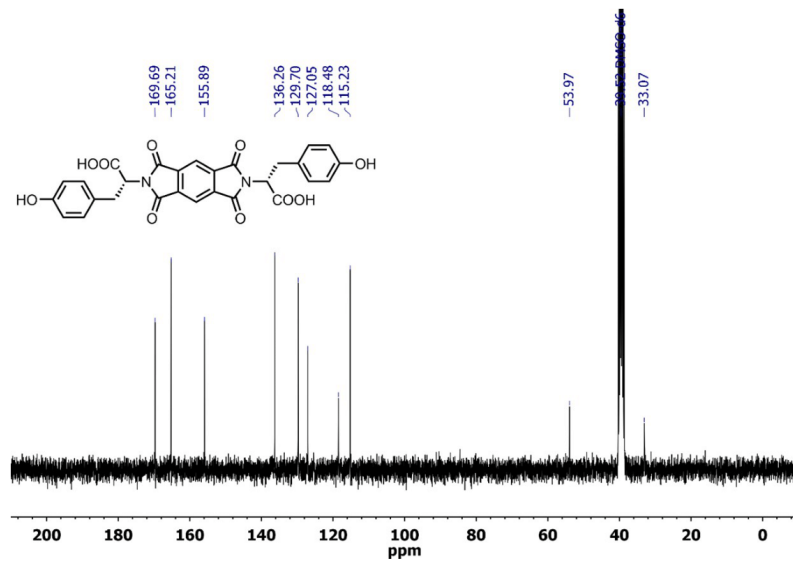


Figure S4. ¹³C NMR (75 MHz DMSO *d*-6) spectrum of PMI-Tyr.

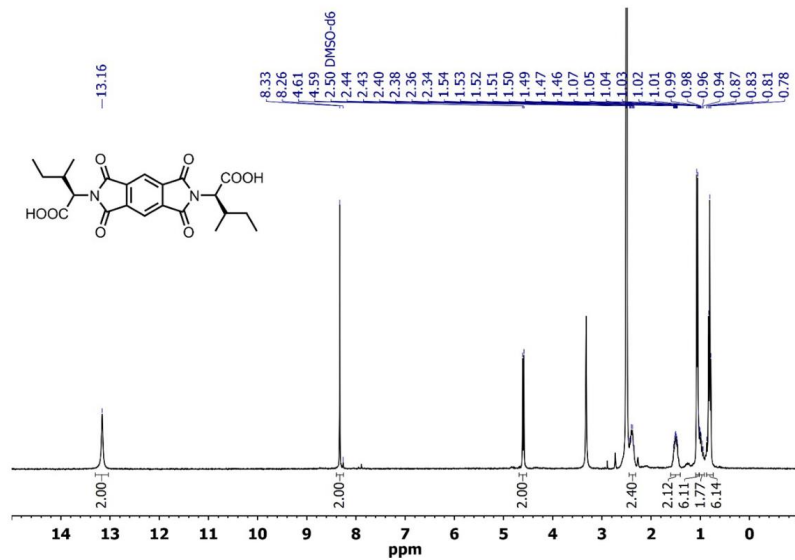


Figure S5. ^1H NMR (300 MHz DMSO *d*-6) spectrum of PMI-Ile.

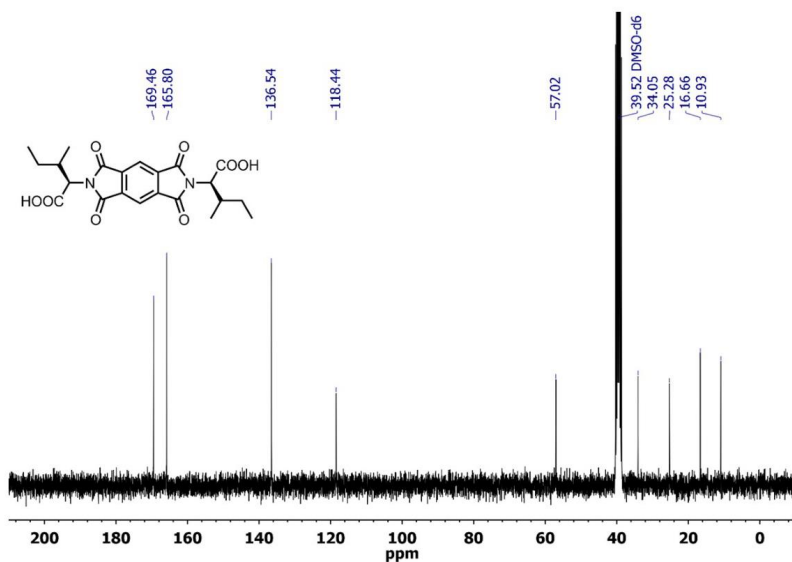


Figure S6. ^{13}C NMR (75 MHz DMSO *d*-6) spectrum of PMI-Ile.

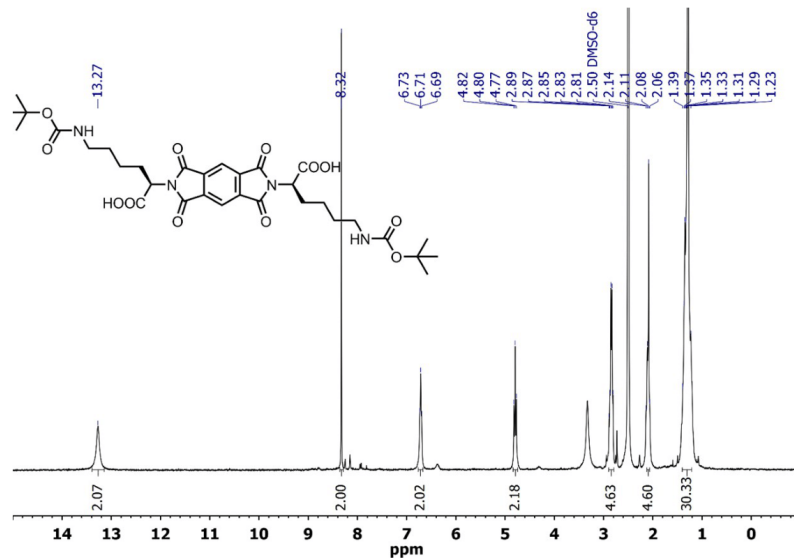


Figure S7. ¹H NMR (300 MHz DMSO *d*-6) spectrum of PMI-Lys.

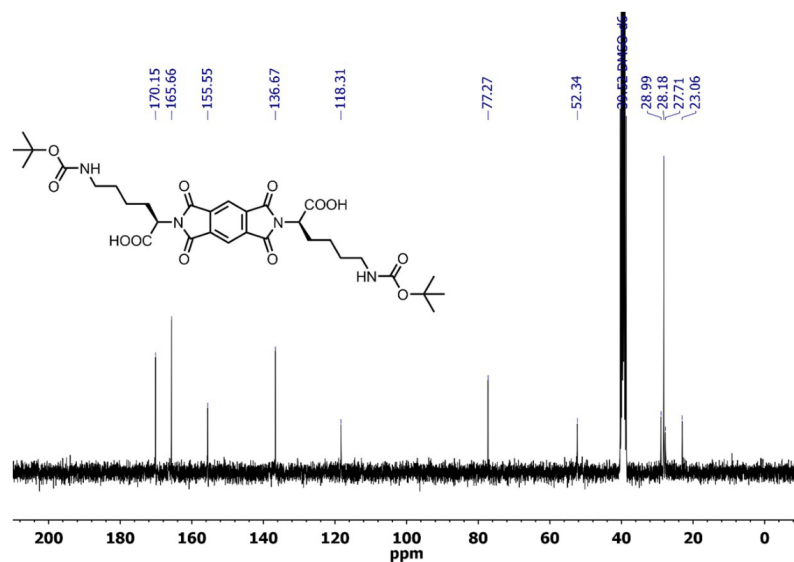


Figure S8. ¹³C NMR (75 MHz DMSO *d*-6) spectrum of PMI-Lys.

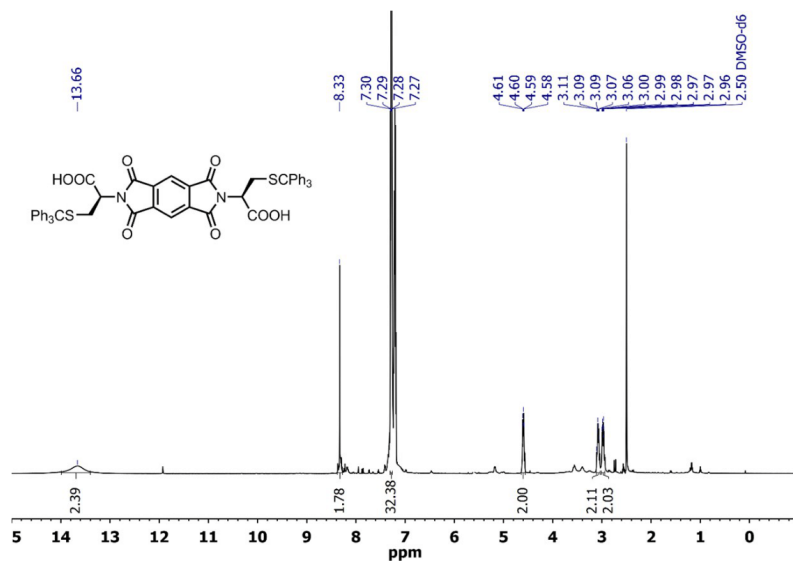


Figure S9. ¹H NMR (300 MHz DMSO *d*-6) spectrum of PMI-Cys.

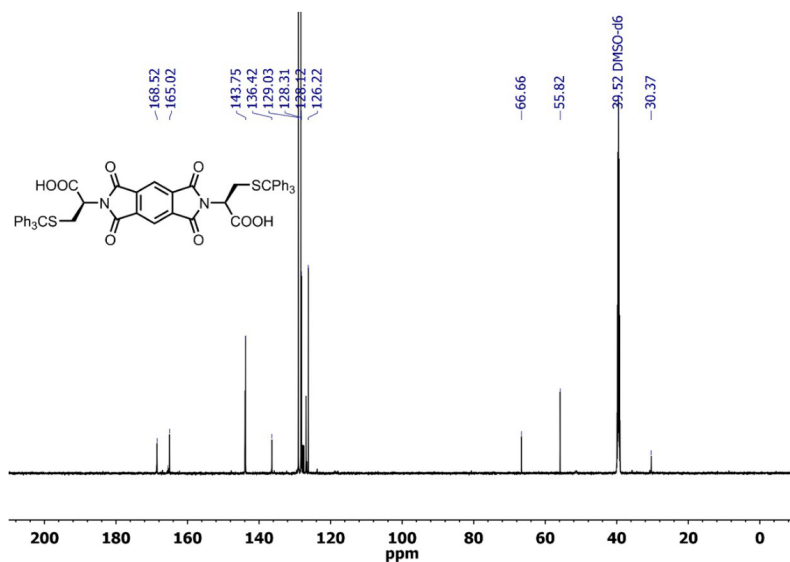


Figure S10. ¹³C NMR (75 MHz DMSO *d*-6) spectrum of PMI-Cys.

1.2 BPDIs



Figure S11. ^1H NMR (300 MHz DMSO *d*-6) spectrum of BPDl-Phe.

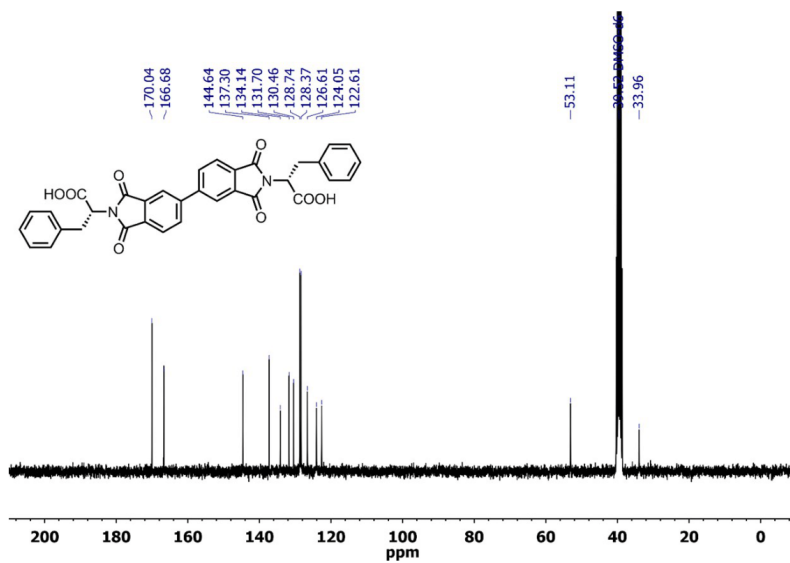


Figure S12. ^{13}C NMR (75 MHz DMSO *d*-6) spectrum of BPDl-Phe.

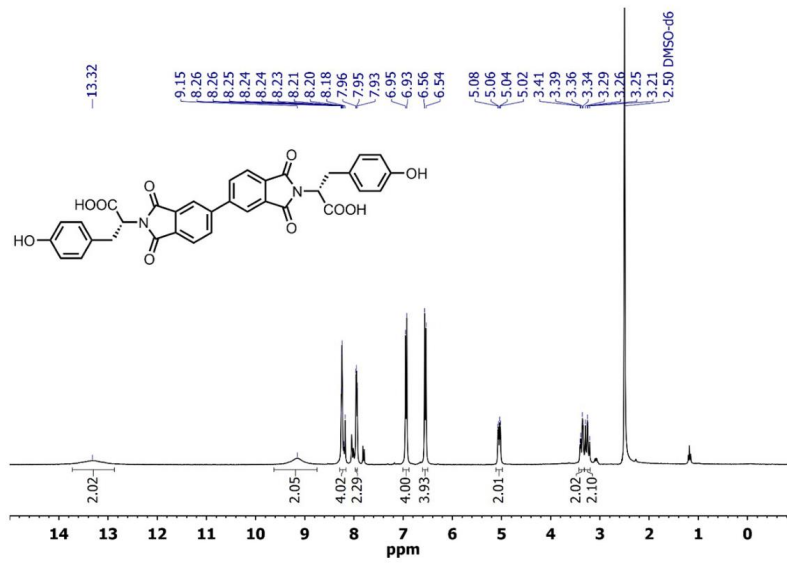


Figure S13. ^1H NMR (300 MHz DMSO d_6) spectrum of BPDl-Tyr.

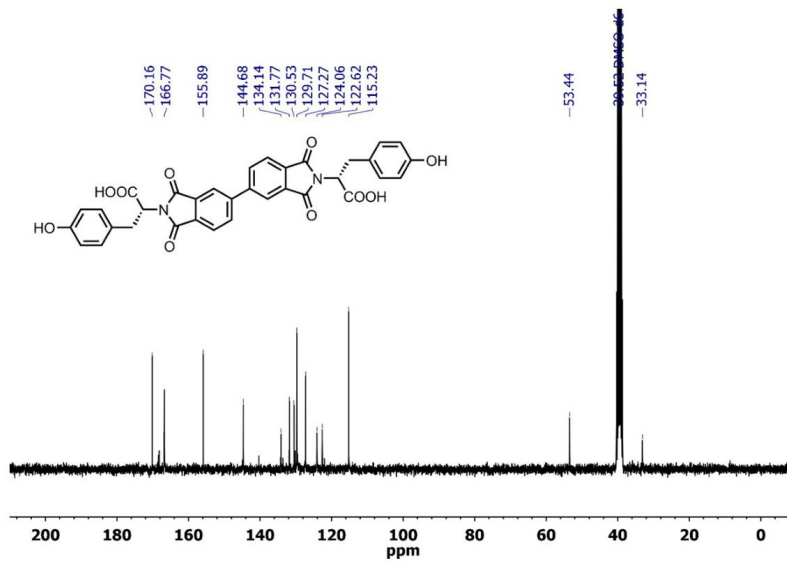


Figure S14. ^{13}C NMR (75 MHz DMSO d_6) spectrum of BPDl-Tyr.

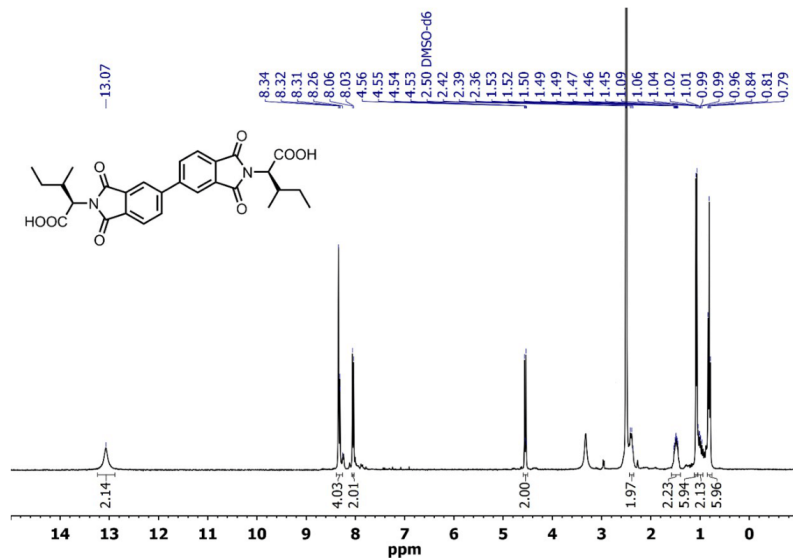


Figure S15. ^1H NMR (300 MHz DMSO *d*-6) spectrum of BPDI-Ile.

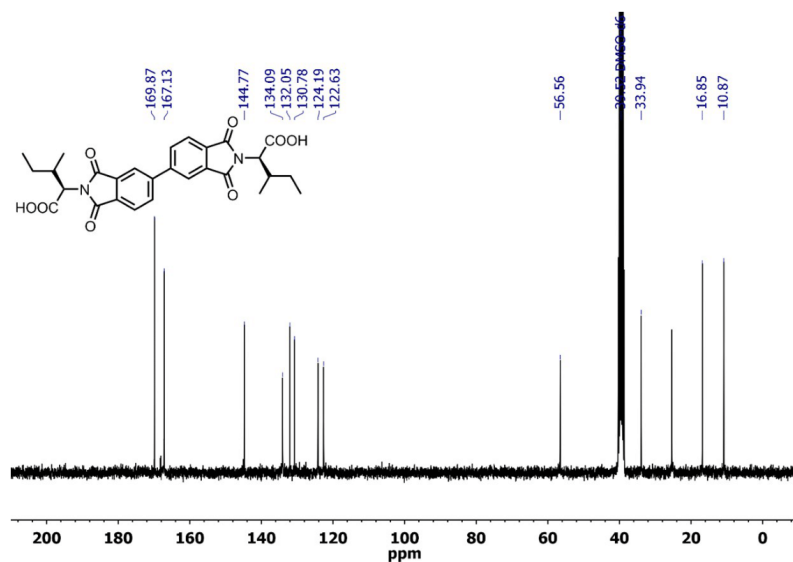


Figure S16. ^{13}C NMR (75 MHz DMSO *d*-6) spectrum of BPDI-Ile.

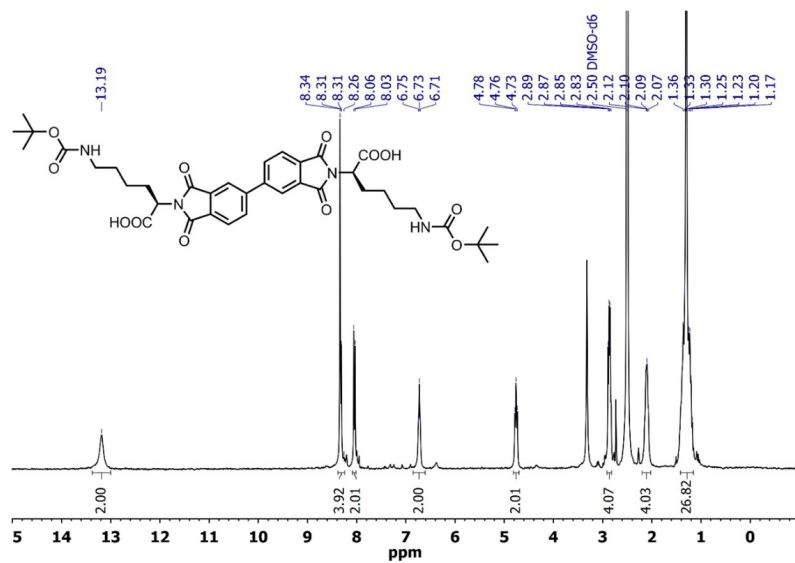


Figure S17. ^1H NMR (300 MHz DMSO d_6) spectrum of BPDl-Lys.

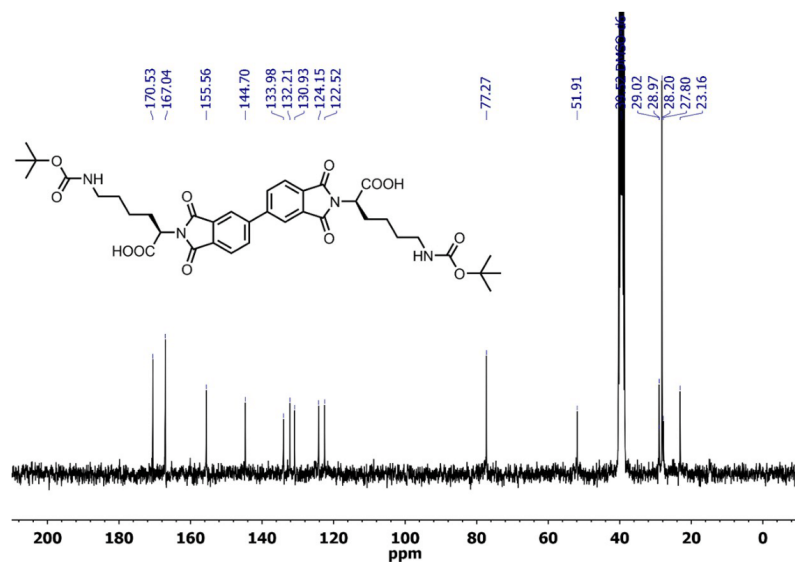


Figure S18. ^{13}C NMR (75 MHz DMSO d_6) spectrum of BPDl-Lys.

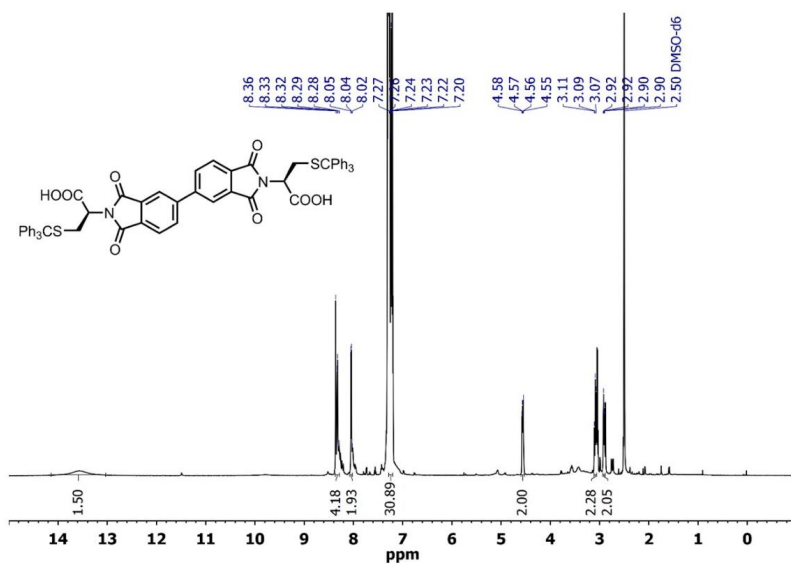


Figure S19. ^1H NMR (300 MHz DMSO *d*-6) spectrum of BPDI-Cys.

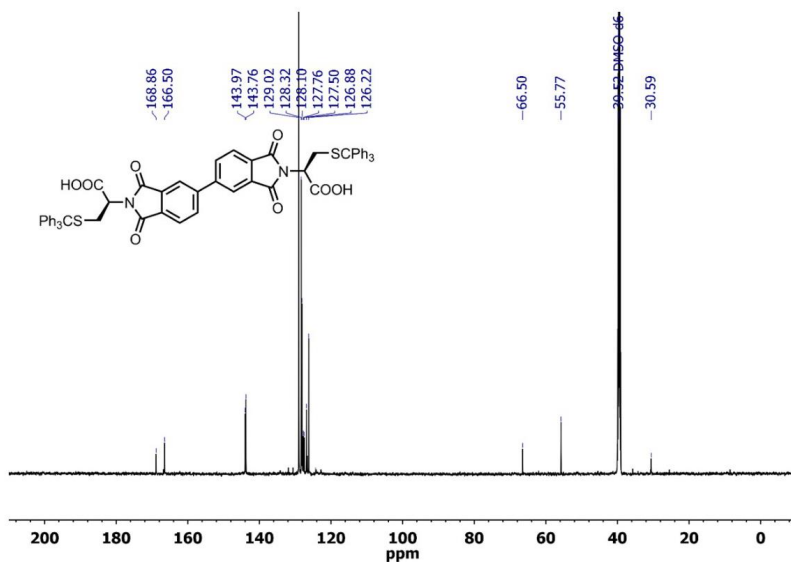


Figure S20. ^{13}C NMR (75 MHz DMSO *d*-6) spectrum of BPDI-Cys.

1.3 BTDIs

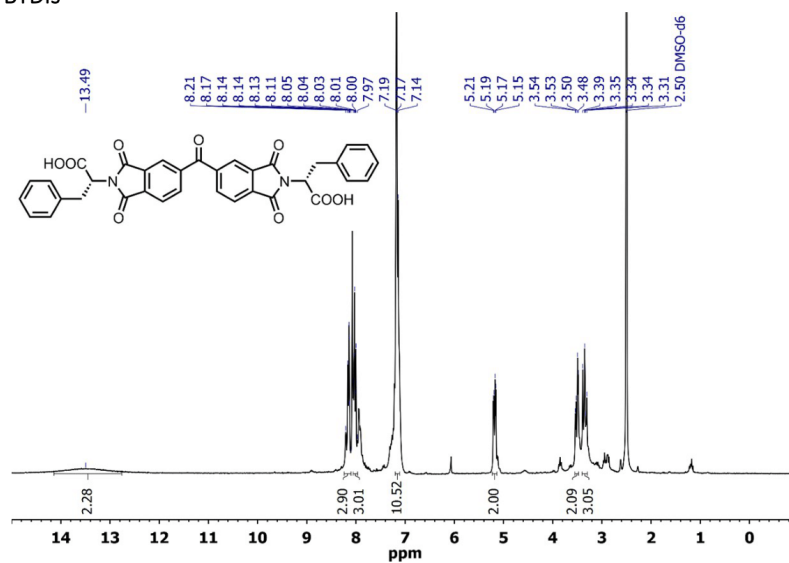


Figure S21. ¹H NMR (300 MHz DMSO-*d*-6) spectrum of BTDI-Phe.

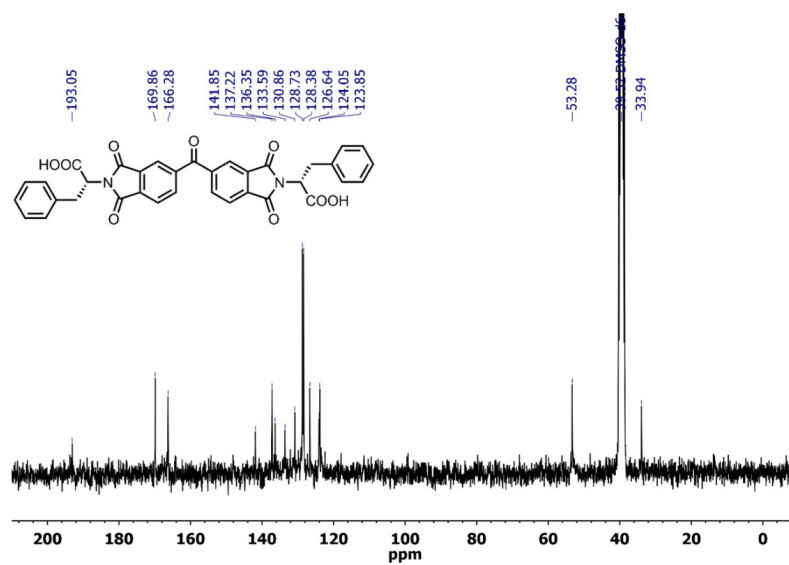


Figure S22. ¹³C NMR (75 MHz DMSO-*d*-6) spectrum of BTDI-Phe.

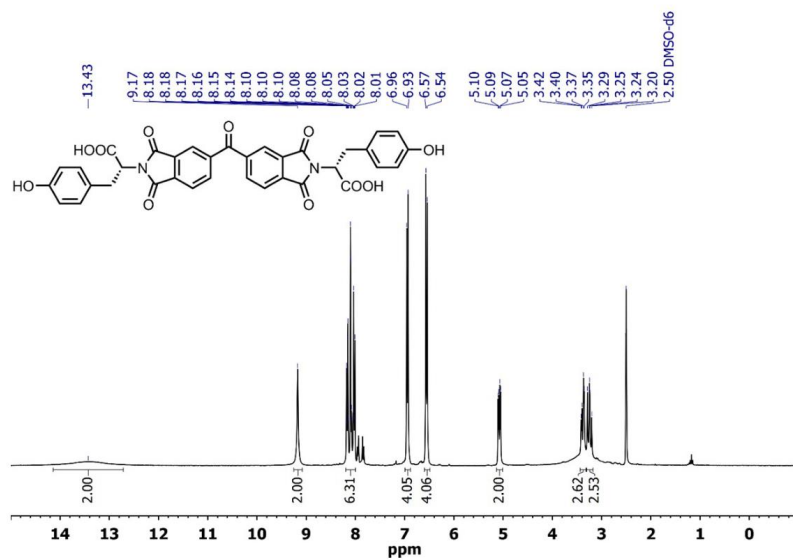


Figure S23. ^1H NMR (300 MHz DMSO *d*-6) spectrum of BTDI-Tyr.

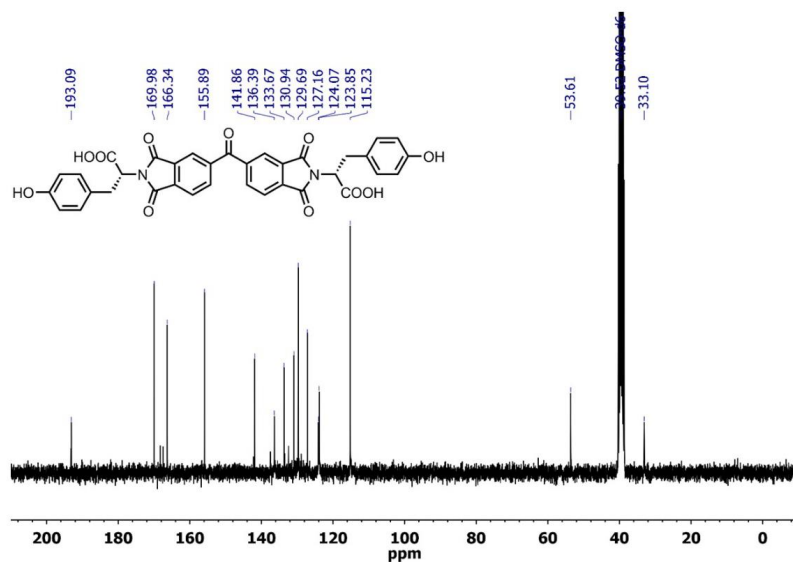


Figure S24. ^{13}C NMR (75 MHz DMSO *d*-6) spectrum of BTDI-Tyr.

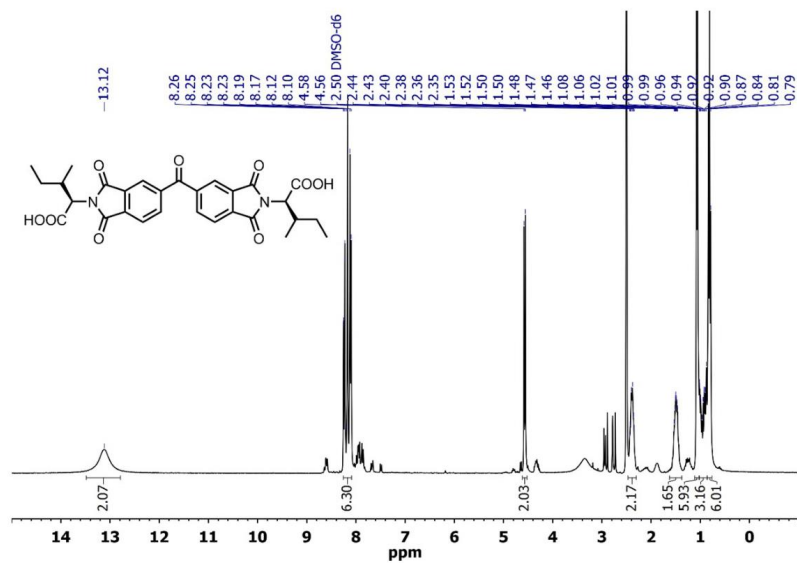


Figure S25. ^1H NMR (300 MHz DMSO d_6) spectrum of BPDl-Ile.

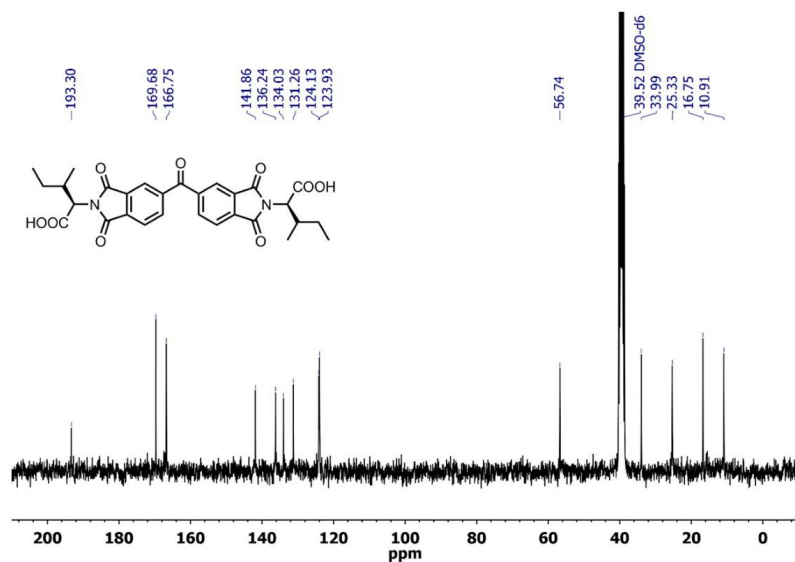


Figure S26. ^{13}C NMR (75 MHz DMSO d_6) spectrum of BTDl-Ile.

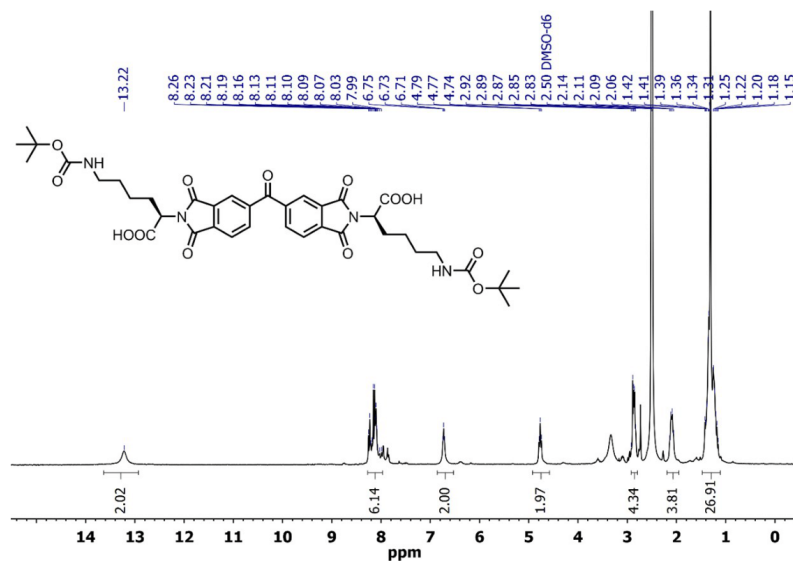


Figure S27. ^1H NMR (300 MHz DMSO *d*-6) spectrum of BTDI-Lys.

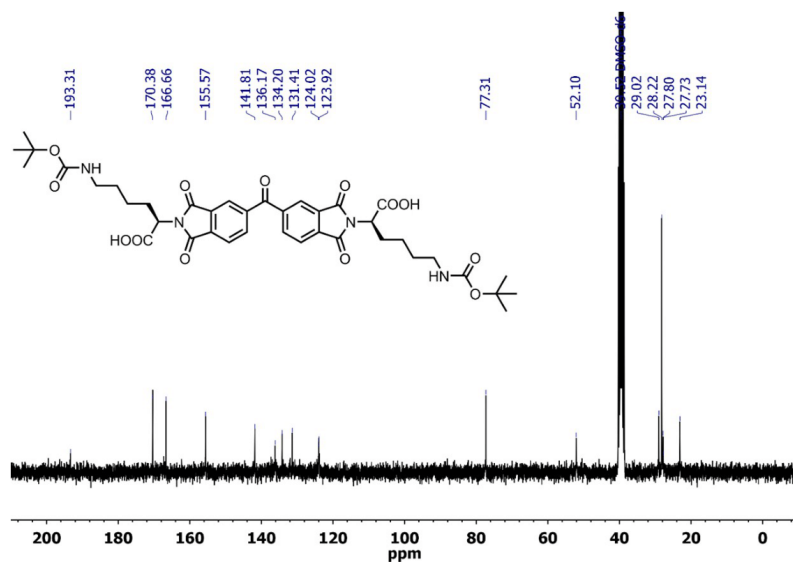


Figure S28. ^{13}C NMR (75 MHz DMSO *d*-6) spectrum of BTDI-Lys.



OPEN Expanding structural diversity in a library of disulfide macrocycles through in-situ imide hydrolysis

Marcin Konopka^{1,2} & Artur R. Stefankiewicz^{1,2}✉

We describe here an unorthodox approach to dynamic covalent chemistry in which the initially-unexpected in-situ hydrolysis of a bis-imide is employed to control the composition of a library of structurally diverse macrocycles. A single building block is used to generate a library of numerous disulfide-based architectures in a one-pot single-step process. The dual-stimuli method is based on simultaneous changes in pH and DMSO concentration to expand the structural diversity of the macrocyclic products. Mechanistic details of this complex process are investigated by the kinetics analysis. We delivered a facile strategy for the synthesis of water-soluble, multicomponent and dynamic macrocycles equipped with number of different functional groups, thus giving a prospect of their application in guest-driven phase transfer.

Dynamic combinatorial chemistry (DCC) is of continuing interest among various fields of modern chemistry^{1–3}. Many reversible linkages are employed in DCC, such as imines, acyl hydrazones, disulfides, boronic esters, or coordination bonds^{4–6}. Dynamic disulfides are of particular interest due to their useful applications as chemical receptors^{7,8}, nanocapsules for molecular transport^{9–11}, or in metallosupramolecular architectures¹². Recently, there has been a growing interest in the search for new methods and conditions for the oxidation of thiols to disulfides in DCC using metalloidal catalysis^{13,14}, solvent effects¹⁵, iodine¹⁶ or mechanochemical stimuli^{17–19}. To date, numerous water-soluble disulfide systems of distinct topologies such as macrocycles, cages, catenanes or knots have been described, most of which are based on organic cysteine-functionalized components^{20–29}. Macrocyclic structures, especially those based on modified naphthalenediimides (NDIs) have been heavily explored in the last decade as they present interesting properties and functions such as molecular sensors, host–guest complexes, molecular devices, catalysis through π -anion interactions and non-covalent binding with DNA for bio-applications^{30,31}. Several different strategies of controlled, stimuli-based, modification of the dynamic library composition through physical and chemical factors have been described for these systems³². However, it remains a challenge to externally control DCL compositions and product constitutions.

Here we present an unorthodox approach to disulfide DCC by employing *in-situ* imide hydrolysis which leads in our system to expanded library diversity and larger macrocycles. We describe a robust method for the use of a mixture of water and DMSO as an excellent environment for the oxidation and exchange of thiols and we show the control of the library composition through appropriate pH and DMSO concentration. Previously, we described new building blocks based on 3,3',4,4'-Biphenyltetracarboxylic dianhydride (BPDA)³³, similar to the NDI-based components, but with an extra degree of geometrical flexibility. One of these was the bis-imide equipped with two cysteine moieties **A** (Fig. 1). During the standard DCL procedure (water, pH 8.0) with **A**, instead of the expected macrocyclic oligomer library we noticed products resulting from the hydrolysis of **A**. Literature evidence on this process encouraged us to investigate the potential of this phenomenon in concert with disulfide DCC^{34,35}. In basic aqueous solution, imide hydrolysis may take place, and results in opening of the five-membered ring, thereby providing additional features in conformational flexibility, polarity (new carboxylic groups) and intramolecular non-covalent interactions (NH hydrogen bond donor) during disulfide formation.

Results and discussion

The work began with the synthesis of dithiol component **A** starting from the BPDA and S-Trityl-L-cysteine. We employed our earlier reported microwave method³³ to obtain an intermediate STr-protected diimide product. In the second step the trityl groups were removed by the standard Et₃SiH/TFA/DCM reaction. Natural L-cysteine provides several important functions for further self-assembly, such as the carboxyl groups ensuring

¹Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland. ²Center for Advanced Technology, Adam Mickiewicz University, Uniwersytetu Poznańskiego 10, 61-614 Poznań, Poland. ✉email: ars@amu.edu.pl

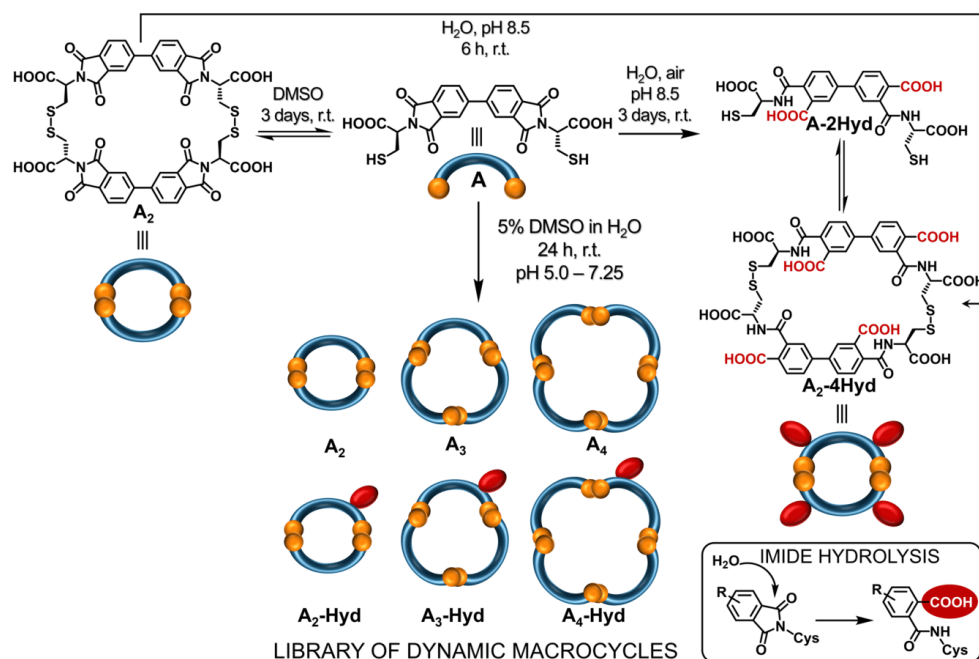


Figure 1. Schematic representation of the DCLs formed from component **A** under three different conditions, in DMSO, in water at pH 8.5, and in 5% DMSO/aqueous AcONH₄ buffer. The inset contains a diagram of the irreversible imide hydrolysis. The -COOH group resulting from the imide hydrolysis is marked as a red ellipse.

high polarity and water solubility, a stable amino-acid chiral centre, and -SH groups for oxidation located on a conformationally labile arm.

Additionally, the component **A** contains a single bond between two phenyl rings, which provides additional rotational flexibility to the entire system, a significant difference compared with rigid NDIs.

In the first experiment a simple aqueous solution of **A** at pH 8.5 in unsealed vial was set up (see ESI S2 for details). After several minutes we observed complete decay of **A** and the formation of a single new product. This was isolated and based on NMR and MS analysis was shown to be the unsymmetrical product of double hydrolysis of **A** where the newly formed two amide groups are placed *para* and *meta* to the inter-biphenyl bond **A-2Hyd** (Fig. 2). Analysis of the ¹H and COSY (see Fig. S8 in ESI) spectra in DMSO clearly shows the formation of a pair of amide N-H signals (δ8.83 and δ8.75 ppm) coupled to a pair of methine C-H cysteine signals.

By chemical intuition, one would expect a symmetrical product with a double *meta* or *para* configuration. Presumably, due to electronic and entropic factors, the system favors two-step hydrolysis path, which leads to an unsymmetrical product (for more details see Fig.S34). To the best of our knowledge, such directional hydrolysis has not been recorded previously for BPDA derivatives. After hydrolysis, the **A-2Hyd** should display extra structural flexibility. To check how this new feature of **A-2Hyd** influences the formation of disulfides, we set a new solution of **A** at pH 8.5 for oxidation with air exposure (Fig. 3a). The post-reaction mixture contained mostly one product (90%), which was identified by ¹H NMR spectroscopy (Fig. 4c) and ESI-MS as the mono-protonated cation [M + H]⁺ remarkable cyclic *m*-, *p*-dimer with two disulfide bonds (**A₂-4Hyd**) formed from two molecules of **A-2Hyd**. The second component **AS** (10%) is the monomeric **A-2Hyd** derivative cyclised by a single intramolecular disulfide bond.

To accelerate the oxidation, we used the known DMSO effect¹⁵. We started with **A** dissolved in pure DMSO (Fig. 4a) with expectation of rapid and full conversion^{36,37}. After 3 days we observed via LC-MS the selective formation of only one product, which was identified as dimeric macrocycle **A₂** with two disulfide bonds (Fig. 3b). This compound was isolated and analyzed by NMR (Fig. 4b). The ¹H spectrum of the dimer **A₂** shows the upfield shifts of aromatic signals characteristic of tight aromatic macrocycles, and downfield shifts of aliphatic C-H and CH₂ signals. The absence of any amide signals indicates that no hydrolysis took place. A comparison of both **A₂** and **A₂-Hyd** dimers shows that **A** has a structural tendency to form dimeric systems.

Here we also checked whether hydrolysis is possible after thiol oxidation. The isolated **A₂** was dissolved in water (5 mM, pH 8.5, r.t.) and monitored by HPLC. After 6 h the complete hydrolysis of **A₂** to **A₂-4Hyd** occurred

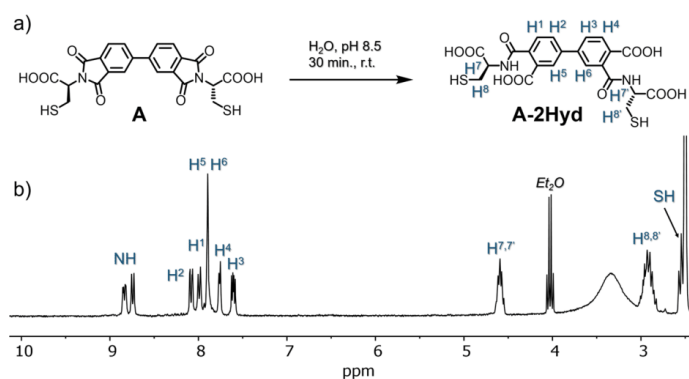


Figure 2. (a) Scheme of the unsymmetric hydrolysis of **A** into **A-2Hyd**, (b) ^1H NMR spectrum (300 MHz, 298 K, DMSO-d_6) of **A-2Hyd**.

(Fig. 1, top). Placing the sample of **A₂-4Hyd** in pure DMSO (5 mM, r.t.) did not lead to **A₂** imide again, confirming the irreversible nature of the hydrolysis process under such conditions.

Based on the results so far, we decided to use a combination of pH control and DMSO in an attempt to expand to DCLs with larger macrocycles (Fig. 3c–f). To find the right conditions, we screened both concentration of DMSO and the pH in the range from 4.0 to 8.5 in 0.1 M AcONH_4 buffer adjusted to the desired pH with AcOH and ammonia (see Figs. S28–30).

It became clear that pH had the greatest influence on the DCL product distribution. In this system, the most interesting results occur for pH 6.5 and 7.25, which fits with the usual optimal thiol oxidation conditions (Fig. 3e–f)³⁸. pH 8.5 is usually applied to fully deprotonate the COOH groups and thus achieve water solubility although such a high pH is not optimal for the thiol oxidation. At lower pH values, the concentration of thiolate ion in the reaction mixture is lower, while its nucleophilicity (reactivity) is higher. Ultimately, we used a 5% DMSO solution in ammonium acetate buffer at pH 6.5, which provides much better conditions for the oxidation of thiols. We did not observe any significant changes in the library composition (pH 6.5) over the range 5–50% DMSO. However, the presence of DMSO can act as a switch that changes the resulting DCL composition substantially.

Our combined method with the appropriate pH and the DMSO as oxidation accelerator resulted in a multi-component library containing trimeric and tetrameric macrocycles. Based on LC–MS analysis (Fig. 3g), we found that in most cases (pH 5.0–7.25) a dynamic combinatorial library of six products was formed, which were identified as dimers, trimers and tetramers (as monoprotonated species $[\text{M} + \text{H}]^+$). These are three pairs of dimeric (**A₂** and **A₂-Hyd**), trimeric (**A₃** and **A₃-Hyd**) and tetrameric (**A₄** and **A₄-Hyd**) macrocycles, in which the first member is completely unhydrolyzed, while the second has one hydrolyzed imide group (based on MS). In the case of mono-hydrolyzed products, it should be noted that the ring-opening during the hydrolysis can take place either in *meta* or *para* position. However, these isomers are indistinguishable by LC–MS, so we were unable to determine exactly which isomers are observed in the generated DCLs.

We showed that the library composition can be controlled by pH. At slightly acidic pH (4.0), an unhydrolyzed dimer **A₂** dominates; a pH close to neutral (6.5–7.25) promotes the formation of the tetramer **A₄**; while basic pH 8.5 causes the formation of a hydrolyzed dimer **A₂-Hyd**. Due to similarity in the polarity of the library components, we were unable to isolate preparative amounts of separate products despite numerous attempts. Therefore we decided to analyze the intact DCL. The library was isolated by evaporation to dryness and analyzed by NMR (Fig. 4d). The ^1H spectrum of the library contains significantly more signals (in comparison to **A** and **A₂**), indicating a loss of symmetry of the trimeric and tetrameric products. In the COSY spectrum, tiny N–H signals coupled with the C–H signals (similar to **A₂-Hyd**) are observed. This is additional proof for the presence of amides in the structures of some mono-hydrolyzed macrocycles in DCL.

We were excited to get a deeper understanding of the system kinetics and mechanistic features. We employed HPLC to monitor the DCL equilibration over time (1 ml volume, pH 6.5, 5% DMSO, 5 mM of **A**). The DCL was analyzed every 30 min for 24 h at room temperature. The first injection (t_0) has been done immediately after **A** was dissolved in the reaction buffer. The distribution curves of individual species during the equilibration were plotted, based on the integrations of the relative peak areas (RPA) from the collected chromatograms (Fig. 5).

It revealed that the system reaches equilibrium just after approx. 10 h and does not change any further up to 24 h. Several preliminary conclusions concerning the kinetics and mechanism of this complex process can be drawn. Firstly, substrate **A** (brown plot) irreversibly hydrolyzes to **A-Hyd** (reaction I, grey) and reach 10% abundance after approx. 2 h. Simultaneously, **A** dimerizes into a linear **AA** intermediate (II, black) with a single S–S bond and reaches maximum abundance of about 20% after approx. 1.5 h. Then **AA** undergoes intramolecular cyclization to macrocyclic **A₂** (IV, green). It seems that the synthesis of the larger macrocycles **A₃** (gold) and **A₄** (yellow) depends on the presence of **AA** and **A₂** (VI–IX) because they appear in the mixture only after 2 h. No

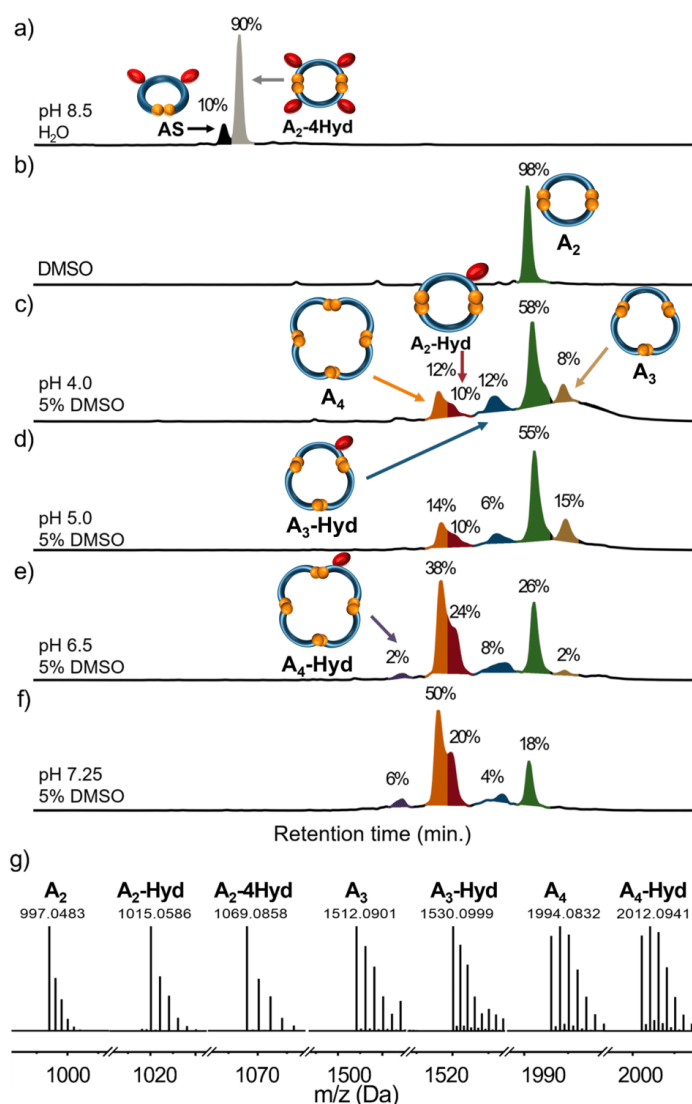


Figure 3. (a–f) HPLC chromatograms (254 nm) of 3 days old A DCLs in various conditions of DMSO concentration and pH. The library material distribution is represented as percentages next to the corresponding peaks (relative peak area). The peak colour indicates each macrocycle. See Figs. S17–S24 for LC–MS details. (g) HR–MS analysis of macrocycles as ions $[M+H]^+$ (or $[M+NH_4]^+$ for A_3 , A_3 -Hyd, see Figs. S18–27).

traces of the expected AAA and AAAA linear intermediates were found in the obtained HPLC–MS data. However, intermediates AAA and AAAA seem to be an obvious step in chain elongation and ring closure processes. Therefore, it should be assumed that these individuals are formed in a mixture from the smaller molecules (A and AA) and are immediately consumed in the cyclization reaction to the macrocyclic products (A_3 and A_4). Similar results were observed for mono-hydrolyzed macrocycles, which seem to be strongly dependent from the A-Hyd concentration. The A-Hyd reacts with available A and forms AA-Hyd intermediate (III), which is rapidly intermolecularly cyclized into the major mono-hydrolyzed A_2 -Hyd macrocycle (V, red). The synthesis of the

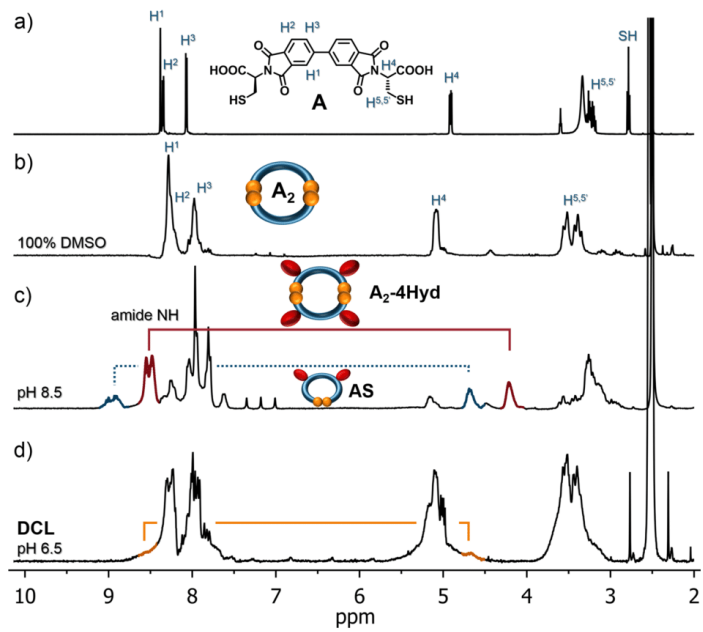


Figure 4. Comparison of ^1H NMR spectra (300 MHz, 298 K, DMSO-d_6) of (a) **A**, (b) **A₂**, (c) **A₂-4Hyd** (contaminated with **AS**) and (d) **DCL** mixture from Fig. 3f. Ties show coupled N–H signals with C–H signals (based on COSY, see Figs. S32–33).

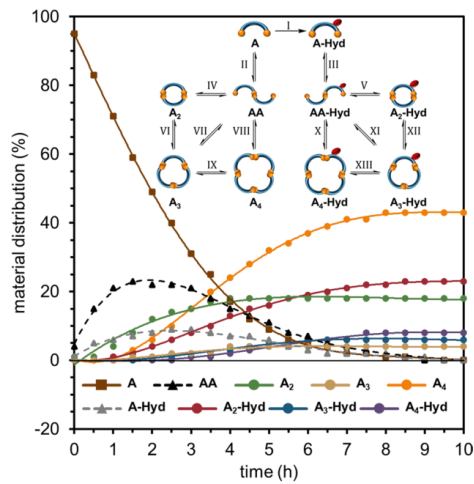


Figure 5. Kinetic plots of **A** DCL equilibration at pH 6.5 (substrate and products), and scheme of crucial reactions in the equilibrating mixture.

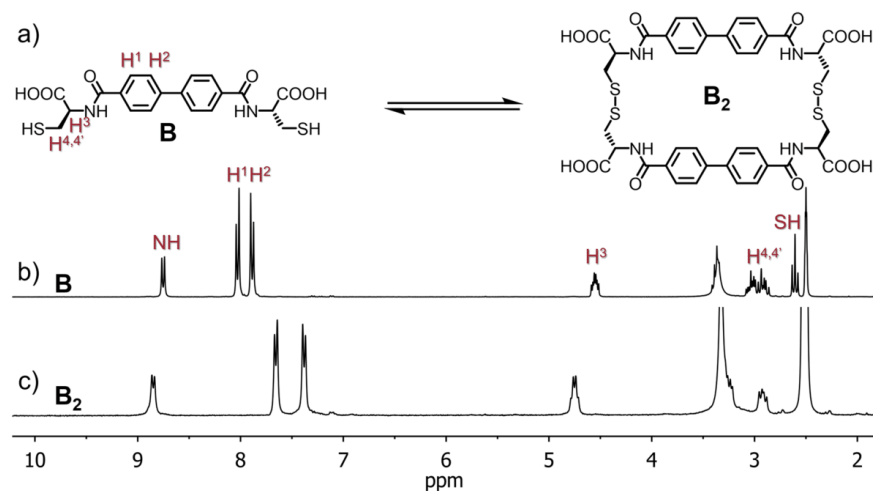


Figure 6. (a) synthesis scheme of the dimeric macrocycle B_2 and comparison of ^1H NMR spectra (300 MHz, 298 K, DMSO-d_6) of (b) **B** and (c) B_2 .

A_3 -Hyd (blue) and A_4 -Hyd (violet) may go through various pathways (X–XIII). It could also be observed that the DMSO accelerated oxidation and imides hydrolysis run in parallel with a slight vantage of first one during the first two hours. It confirms our main hypothesis that both reactions occur orthogonally during the entire process of DCL equilibration. The final ratio of the hydrolyzed to non-hydrolyzed products is approx. 3:6 (see Fig. 3f). The observed unusual imide hydrolysis in slightly acidic conditions may be powered by the presence of thiols. There are examples in the literature of the thiol-catalyzed hydrolysis of acyl groups^{39,40}. We observed that the sample of unhydrolyzed A_2 placed in pH 6.5 buffer has not changed over time (3 days). The addition of NaOH to pH 8.5 resulted in a rapid hydrolysis into the A_2 -4Hyd (as shown in Fig. 1). These results indicate that the hydrolysis in DCLs at pH 4–6.5 is dependent on the presence of unoxidized thiols. The latter significantly slow down the hydrolysis process or stop it completely when the oxidation is complete.

Thus, we have shown that the use of a cysteine-modified phthalimide analogue gives unusual properties and allows the formation of multi-component DCLs. In order to demonstrate that the dynamics of the described system are strongly dependent on the hydrolysis of imides, and are not a property of the biphenyl structure, we performed a control experiment. We synthesized component **B** based on modified biphenyl-4,4'-dicarboxylic acid with two cysteine moieties (Fig. 6).

This compound is linear and has no imide groups but is otherwise analogous to component **A**. We repeated all the experiments that were described earlier with **A**. Under all pH and DMSO conditions only the cyclic dimer B_2 was observed as the result of oxidation. Those experiments unequivocally confirmed the correlation between imide presence and component **A** activity.

Conclusions

We have successfully demonstrated that the use of hydrolysable imides in dynamic disulfide chemistry can effectively act to enhance disulfide exchange factor for building multi-component DCLs. Additionally, we have shown that this effect could be externally modulated by pH and DMSO concentration. Until now, DMSO has been considered only as an oxidation accelerant, and we have shown that by changing the DMSO concentration, the library composition could be controlled. The presented methodology can be applied in the generation of new dynamic molecular transporters or receptors (e.g. cages or macrocycles) in which the water solubility could be modulated through a controlled process of imides hydrolysis. Finally, we delivered new insights into the kinetics and mechanistic properties of such type of complex disulfide system.

Received: 31 August 2021; Accepted: 13 December 2021

Published online: 07 January 2022

References

- Zhang, Y., Qi, Y., Ulrich, S., Barboiu, M. & Ramström, O. Dynamic covalent polymers for biomedical applications. *Mater. Chem. Front.* **4**, 489–506. <https://doi.org/10.1039/C9QM00598F> (2020).
- Phan, N.-M., Percástegui, E. G. & Johnson, D. W. Dynamic covalent chemistry as a facile route to unusual main-group thiolate assemblies and disulfide hoops and cages. *ChemPlusChem* **85**, 1270–1282. <https://doi.org/10.1002/cplu.202000257> (2020).

3. Ulrich, S. Growing prospects of dynamic covalent chemistry in delivery applications. *Acc. Chem. Res.* **52**, 510–519. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00591> (2019).
4. Corbett, P. T. *et al.* Dynamic combinatorial chemistry. *Chem. Rev.* **106**, 3652–3711. <https://doi.org/10.1021/cr020452p> (2006).
5. Lehn, J. M. From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **36**, 151–160. <https://doi.org/10.1039/b616752g> (2007).
6. Lehn, J.-M. & Eliseev, A. V. Dynamic combinatorial chemistry. *Science* **291**, 2331. <https://doi.org/10.1126/science.1060066> (2001).
7. Nial, J. W., Craig, R. B., Collins, J. G., Sharon, K. & Janice, R.A.-W. DNA Intercalators in cancer therapy: Organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. *Mini-Rev. Med. Chem.* **7**, 627–648. <https://doi.org/10.2174/138955707780859413> (2007).
8. Bravin, C., Guidetti, A., Licini, G. & Zonta, C. Supramolecular cages as differential sensors for dicarboxylate anions: Guest length sensing using principal component analysis of ESI-MS and 1H-NMR raw data. *Chem. Sci.* **10**, 3523–3528. <https://doi.org/10.1039/C8SC05527K> (2019).
9. Markiewicz, G. *et al.* Selective C70 encapsulation by a robust octameric nanospheroid held together by 48 cooperative hydrogen bonds. *Nat. Commun.* **8**, 15109. <https://doi.org/10.1038/ncomms15109> (2017).
10. Durot, S., Taesch, J. & Heitz, V. Multiporphyrinic cages: Architectures and functions. *Chem. Rev.* **114**, 8542–8578. <https://doi.org/10.1021/cr400673y> (2014).
11. Jedrzejewska, H. & Szumna, A. Peptide-based capsules with chirality-controlled functionalized interiors: Rational design and amplification from dynamic combinatorial libraries. *Chem. Sci.* **10**, 4412–4421. <https://doi.org/10.1039/c8sc05455j> (2019).
12. Drożdż, W. *et al.* Multivalent metallosupramolecular assemblies as effective DNA binding agents. *Chem. Eur. J.* **24**, 10802–10811. <https://doi.org/10.1002/chem.201801552> (2018).
13. Collins, M. S., Carnes, M. E., Nell, B. P., Zakharov, L. N. & Johnson, D. W. A facile route to old and new cyclophanes via self-assembly and capture. *Nat. Commun.* **7**, 11052. <https://doi.org/10.1038/ncomms11052> (2016).
14. Phan, N.-M., Choy, E. P. K. L., Zakharov, L. N. & Johnson, D. W. Self-sorting in dynamic disulfide assembly: New biphenyl-bridged “nanohoops” and unsymmetrical cyclophanes. *Chem. Commun.* **55**, 11840–11843. <https://doi.org/10.1039/C9CC06503B> (2019).
15. Atcher, J. & Alfonso, I. The effect of DMSO in the aqueous thiol–disulfide dynamic covalent chemistry of model pseudopeptides. *RSC Adv.* **3**, 25605. <https://doi.org/10.1039/c3ra45811c> (2013).
16. Ulatowski, F., Sadowska-Kuziola, A. & Jurczak, J. “Choose-a-size” approach in dynamic combinatorial chemistry: A single substrate dynamic combinatorial library of oligomacrocycles that adapts to the size and shape of carboxylates. *J. Org. Chem.* **79**, 9762–9770. <https://doi.org/10.1021/jo501595h> (2014).
17. Sobczak, S. *et al.* Dynamic covalent chemistry under high-pressure: A new route to disulfide metathesis. *Chem. Eur. J.* **24**, 8769–8773. <https://doi.org/10.1002/chem.201801740> (2018).
18. Fritze, U. F. & von Delius, M. Dynamic disulfide metathesis induced by ultrasound. *Chem. Comm.* **52**, 6363–6366. <https://doi.org/10.1039/C6CC02034H> (2016).
19. Belenguer, A. M., Michalchuk, A. A. L., Lampronti, G. I. & Sanders, J. K. M. Understanding the unexpected effect of frequency on the kinetics of a covalent reaction under ball-milling conditions. *Beilstein J. Org. Chem.* **15**, 1226–1235. <https://doi.org/10.3762/bjoc.15.120> (2019).
20. Ponnuswamy, N., Cougnon, F. B. L., Clough, J. M., Pantoş, G. D. & Sanders, J. K. M. Discovery of an organic trefoil knot. *Science* **338**, 783–785. <https://doi.org/10.1126/science.1227032> (2012).
21. Ponnuswamy, N., Cougnon, F. B. L., Pantoş, G. D. & Sanders, J. K. M. Homochiral and meso figure eight knots and a solomon link. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 8243–8251. <https://doi.org/10.1021/ja4125884> (2014).
22. Dehkordi, M. E., Luxami, V. & Pantoş, G. D. High-yielding synthesis of chiral donor-acceptor catenanes. *J. Org. Chem.* **83**, 11654–11660. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b01629> (2018).
23. Prakasam, T. *et al.* Simultaneous self-assembly of a [2]catenane, a trefoil knot, and a Solomon link from a simple pair of ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 9956–9960. <https://doi.org/10.1002/anie.201302425> (2013).
24. Au-Yeung, H. Y., Pantoş, G. D. & Sanders, J. K. M. Amplifying different [2]catenanes in an aqueous donor–acceptor dynamic combinatorial library. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 16030–16032. <https://doi.org/10.1021/ja906634h> (2009).
25. Lafuente, M., Alfonso, I. & Solá, J. Structurally selective assembly of a specific macrobicycle from a dynamic library of pseudopeptidic disulfides. *ChemSystemsChem* **1**, 25–31. <https://doi.org/10.1002/syst.201900002> (2019).
26. Fritze, U. F., Craig, S. L. & von Delius, M. Disulfide-centered poly(methyl acrylates): Four different stimuli to cleave a polymer. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **56**, 1404–1411. <https://doi.org/10.1002/pola.29021> (2018).
27. Stefankiewicz, A. R. & Sanders, J. K. M. Diverse topologies in dynamic combinatorial libraries from tri- and mono-thiols in water: Sensitivity to weak supramolecular interactions. *Chem. Commun.* **49**, 5820–5822. <https://doi.org/10.1039/c3cc41158c> (2013).
28. Drożdż, W., Kołodziejki, M., Markiewicz, G., Jenczak, A. & Stefankiewicz, R. A. Generation of a multicomponent library of disulfide donor-acceptor architectures using dynamic combinatorial chemistry. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms160716300> (2015).
29. Konopka, M., Cecot, P., Harrowfield, J. M. & Stefankiewicz, A. R. Structural self-sorting of pseudopeptide homo and heterodimeric disulfide cages in water: Mechanistic insights and cation sensing. *J. Mater. Chem. C* **9**, 7607–7614. <https://doi.org/10.1039/d1tc01445c> (2021).
30. Al Kobaisi, M., Bhosale, S. V., Latham, K., Raynor, A. M. & Bhosale, S. V. Functional naphthalene diimides: Synthesis, properties, and applications. *Chem. Rev.* **116**, 11685–11796. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00160> (2016).
31. Stefankiewicz, A. R., Tamanini, E., Pantoş, G. D. & Sanders, J. K. M. Proton-driven switching between receptors for C60 and C70. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 5725–5728. <https://doi.org/10.1002/anie.201100806> (2011).
32. Black, S. P., Sanders, J. K. M. & Stefankiewicz, A. R. Disulfide exchange: Exposing supramolecular reactivity through dynamic covalent chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 1861–1872. <https://doi.org/10.1039/c3cs60326a> (2014).
33. Konopka, M., Markiewicz, G. & Stefankiewicz, A. R. Highly efficient one-step microwave-assisted synthesis of structurally diverse bis-substituted α -amino acid derived diimides. *RSC Adv.* **8**, 29840–29846. <https://doi.org/10.1039/C8RA05835K> (2018).
34. Hasan, S. K. & Abbas, S. A. Alkaline hydrolysis products of n-substituted phthalimides. *Can. J. Chem.* **53**, 2450–2453. <https://doi.org/10.1139/v75-348> (1975).
35. Khan, M. N. & Khan, A. A. Kinetics and mechanism of base-catalysed hydrolysis of phthalimide. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 796–798. <https://doi.org/10.1039/P29790000796> (1979).
36. Drożdż, W. *et al.* Generation of multicomponent molecular cages using simultaneous dynamic covalent reactions. *Chem. Eur. J.* **23**, 18010–18018. <https://doi.org/10.1002/chem.201703868> (2017).
37. Konopka, M., Cecot, P., Ulrich, S. & Stefankiewicz, A. R. Tuning the solubility of self-assembled fluorescent aromatic cages using functionalized amino acid building blocks. *Front. Chem.* **7**, 503. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00503> (2019).
38. Nagy, P. Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 1623–1641. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4973> (2012).
39. Hupe, D. J. & Jencks, W. P. Nonlinear structure-reactivity correlations. Acyl transfer between sulfur and oxygen nucleophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 451–464. <https://doi.org/10.1021/ja00444a023> (1977).
40. Llinás, A. *et al.* Thiol-catalysed hydrolysis of benzylpenicillin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1521–1525. <https://doi.org/10.1039/B001091J> (2000).

Acknowledgements

We thank Prof. Jeremy K.M. Sanders for his insightful comments and discussions done for this project. M.K. thanks the Grant INNCHM no. POWR.03.02.00-00-1023/17 co-financed by the European Union through the European Social Fund under the Operational Program Knowledge Education Development. A.R.S. thanks the National Science Centre (Grant SONATA BIS 2018/30/E/ST5/00032) for financial support.

Author contributions

M.K. performed all experiments (synthesis, LC-MS, HPLC, NMR analysis) and co-wrote the paper. A.R.S. designed the project, interpreted results and co-wrote the paper.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03944-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.R.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Electronic Supplementary Information

Expanding Structural Diversity In A Library Of Disulfide Macrocycles Through *In-Situ* Imide Hydrolysis.

Marcin Konopka ^{a,b} and Artur R. Stefankiewicz ^{*a,b}

a) Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland.

b) Centre for Advanced Technologies, Adam Mickiewicz University, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 10, 61-614 Poznań, Poland.

Table of contents

Materials and methods	2
Synthesis of components	3
LC-MS Analysis	17
HPLC Data	27
References	34

Materials and methods

All chemicals and solvents were purchased from commercial sources. NMR solvents were purchased from Deutero GmbH (Germany).

NMR spectra were acquired on Bruker Fourier 300 spectrometer equipped with $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 5 mm DUAL EasyProbe or Bruker Ascend 600 MHz equipped with $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 5 mm probe, and referenced on solvent residual peaks.

ESI-MS spectra were recorded on Bruker Impact HD Q-TOF spectrometer. HPLC measurements were performed on Hewlett Packard 1050 Series HPLC system coupled to a diode array detector.

LC-MS measurement were performed on UHPLC UltiMate 3000 Thermo Scientific/Dionex conjugated with Bruker Impact HD Q-TOF spectrometer. All LC separations were performed on the Synergi Phenomenex 4u POLAR-RP 80A, 75 x 4.60 mm, 4 μm , with flow rate 0.5 ml/min in solvents gradient 10% MeCN in 90% H_2O to 100% MeCN in 20 min. Solvents (water and acetonitrile) were acidified with 0.1% HCOOH . Chromatograms were acquired at 254 nm wave length.

HPLC measurements were performed on HP1050 series equipped with DAD UV-VIS detector. All HPLC separations were performed on the Synergi Phenomenex 4u POLAR-RP 80A, 75 x 4.60 mm, 4 μm , with flow rate 1 ml/min in solvents gradient 10% MeCN in 90% H_2O to 100% MeCN in 10 min. Solvents (water and acetonitrile) were acidified with 0.1% HCOOH . Chromatograms were acquired at 254 nm wave length.

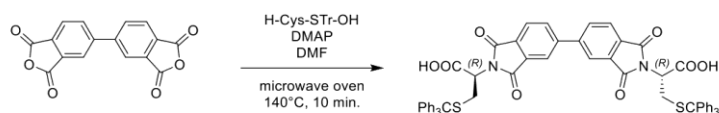
A typical analytical DCL was prepared in a 1.0 ml scale by dissolving an equimolar mixture of thiol components (5 mM) in pH 6.5 buffer solution (5% DMSO in 0.1 M aqueous NH_4OAc). The DCL was set in sealed HPLC 2 mL vial at room temperature until being analysed after 3 days. The pH of each library was checked before and after equilibration process to make sure it remained unchanged. The HPLC traces remained unchanged after 3 days indicating that thermodynamic equilibrium had been reached.

To ensure that the HPLC analyzes based on the relative peak area (RPA) are quantified, a series of UV-Vis concentration-dependent spectra was performed to compare the molar extinction coefficients between the substrate and the products.

All experiments containing DMSO were carried out in tightly sealed (otherwise unsealed) 2 ml vials in a 1.0 ml solution volume of 5 mM **A** or **B** solution, at r.t. The pH of each sample was checked before and after the experiment to make sure that it did not change over time. The samples were equilibrated for three days and the progress of the reaction was monitored by HPLC.

Synthesis of components

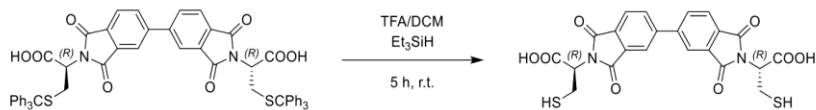
Synthesis of A-STr^[1]



The 3,3',4,4'-Biphenyltetracarboxylic dianhydride (1.47 g, 5.0 mmol), H-L-Cys-STr-OH (3.64 g, 10.0 mmol) and DMAP (2.44 g, 20.0 mmol) were dissolved in 50 mL of dry DMF in 100 mL round-bottom flask. The flask was equipped with an air condenser, placed in a microwave oven and heated at 140°C for 10 min under open vessel conditions. The post-reaction mixture was concentrated under vacuum and then poured into 200 mL of 1M HCl. The white precipitate was filtered off, washed with 500 mL of deionized water and dried under a high vacuum. Yield 4.23 g (86%) of **A-STr**.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.33 (dd, *J* = 24.6, 16.7 Hz, 4H), 8.04 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.28–7.20 (m, 30H), 4.56 (dd, *J* = 11.4, 4.5 Hz, 2H), 3.09 (t, *J* = 12.9 Hz, 2H), 2.91 (dd, *J* = 13.1, 4.3 Hz, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.86, 166.50, 143.97, 143.76, 129.02, 128.32, 128.10, 127.76, 127.50, 126.88, 126.22, 66.50, 55.77, 30.59. **ESI-MS**: *m/z* calculated for: [M+Na]⁺ 1007.2431, found: 1007.2240.

Synthesis of A



The **A-STr** (4.0 g, 4.0 mmol) was placed in a 100 mL round-bottom flask and dissolved under argon in a mixture of DCM 20 mL and trifluoroacetic acid (TFA) 5 mL. Then the Et₃SiH (1.92 mL, 12.0 mmol) was added via syringe and the mixture was stirred at room temperature for 5 h. After, that the liquids were removed under vacuum and the resulting residue was suspended in 20 ml of Et₂O and sonicated for a few minutes. The white precipitate was filtered off, washed with several portions of Et₂O and dried under a high vacuum. Yield 1.90 g (93%) of **A**.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.49 (s, 1H), 8.54 – 8.25 (m, 2H), 8.07 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.92 (dd, *J* = 10.2, 5.3 Hz, 1H), 3.33 – 3.13 (m, 2H), 2.79 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.21, 166.95, 144.73, 134.10, 132.19, 130.93, 124.23, 122.69, 54.82, 22.99. **ESI-MS**: *m/z* calculated for: [M+H]⁺ 501.0420, found: 501.0482, calculated for: [M+Na]⁺ 523.0240, found: 523.0298.

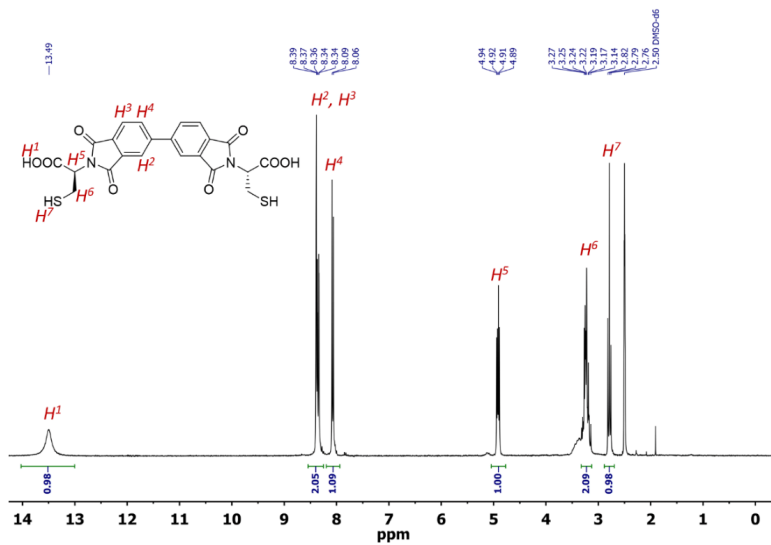


Figure S1: ^1H NMR spectrum of component A in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (300 MHz).

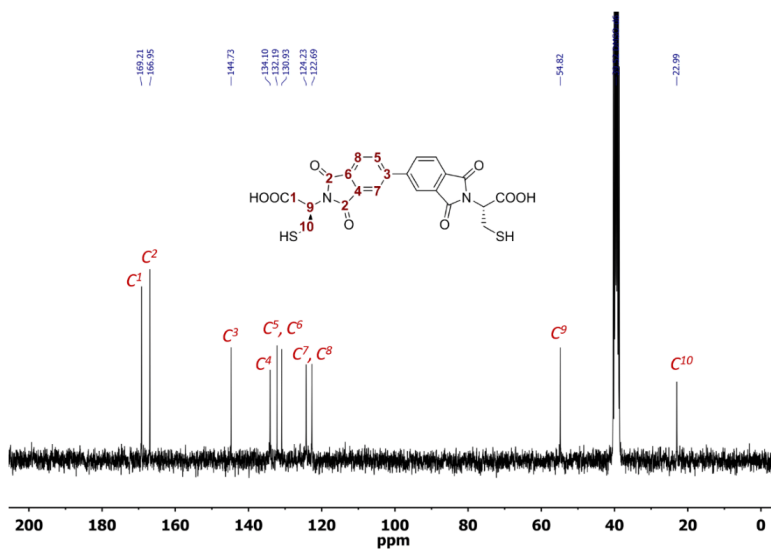


Figure S2: ^{13}C NMR spectrum of component A in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (75 MHz).

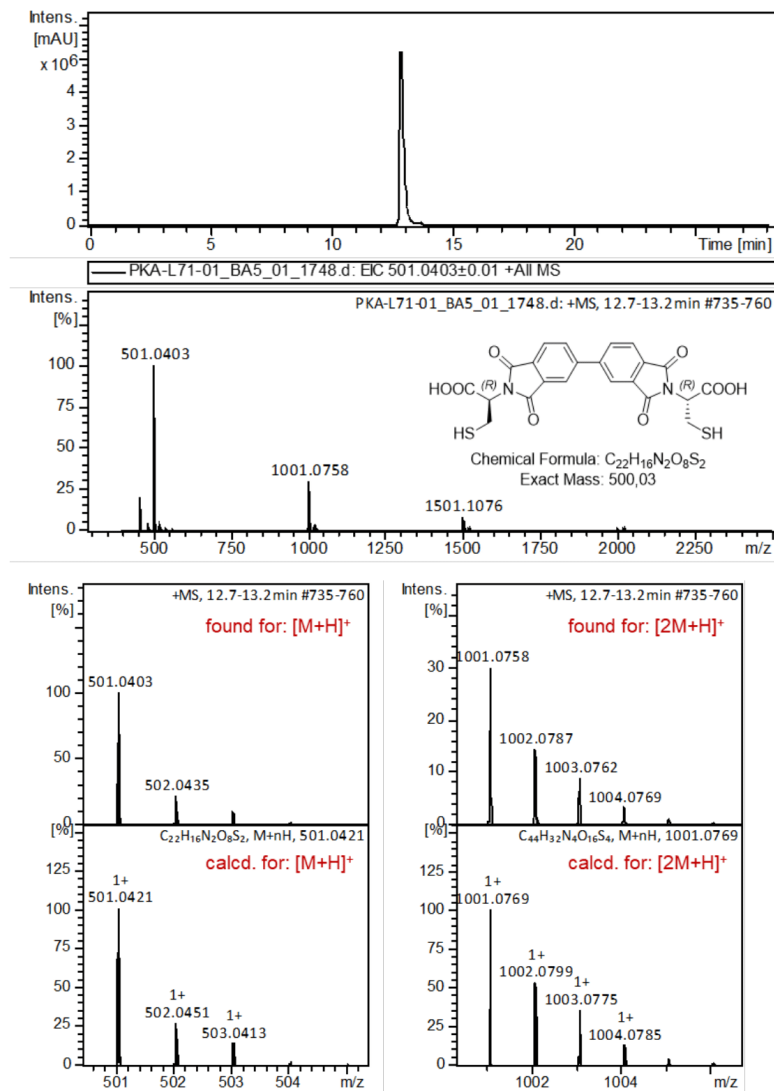


Figure S3: LC-MS analysis of **A**. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

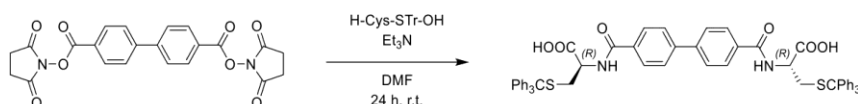
Synthesis of B-EA^[2]



The Biphenyl-4,4'-dicarboxylic acid (2.42 g, 10 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (3.45 g, 30 mmol) were dissolved in dry DMF (100 mL) in a 250 mL round-bottom flask. After 15 min. of stirring the EDC-HCl (5.77 g, 30 mmol) was added stepwise and then the stirring was continued for 24 h at r.t. Then the solvent was removed under vacuum. To the oily residue, the 200 mL of 1M HCl was added and stirred for 10 min. The white precipitate was filtered off, washed with an additional 500 mL of deionized water and dried under a high vacuum. Yield 3.54 g (81%) of **B-EA**.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.24 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H), 8.08 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H), 2.92 (s, 8H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.32, 161.52, 144.80, 130.82, 128.30, 124.45, 25.59. ESI-MS: *m/z* calculated for: [M+Na]⁺ 459.0799, found: 459.0805.

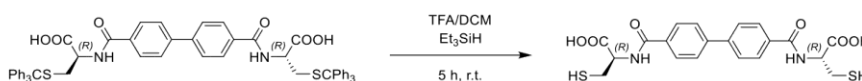
Synthesis of B-STr^[2]



To the solution of **B-EA** (3.5 g, 8.0 mmol) in dry DMF (150 mL), H-L-Cys-STr-OH (8.75 g, 24.0 mmol) and Et₃N (3.35 mL, 40 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature for 24 h under a argon atmosphere. Then the solvent was removed under vacuum. To the oily residue, the 200 mL of 1M HCl was added and then stirred for 10 min. The white precipitate was filtered off, washed with an additional 500 mL of deionized water and dried under a high vacuum. Yield 6.50 g (87%) of **B-STr**.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.82 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 8.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 7.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 7.40 – 7.21 (m, 30H), 4.33 (dq, *J* = 8.0, 4.7 Hz, 2H), 3.01 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.84 – 2.66 (m, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 179.69, 176.68, 144.35, 144.34, 129.15, 129.13, 129.11, 128.15, 128.08, 126.80, 120.60, 76.95, 66.14, 33.07. ESI-MS: *m/z* calculated for: [M+Na]⁺ 955.2846, found: 955.2796.

Synthesis of B



The **B-STr** (1.86 g, 2.0 mmol) was placed in a 100 mL round-bottom flask and dissolved under argon in a mixture of DCM 10 mL and trifluoroacetic acid (TFA) 2.5 mL. Then the Et₃SiH (0.48 mL, 3.0 mmol) was added via syringe and the mixture was stirred at room temperature for 5 h. After, that the liquids were removed under vacuum and the resulting residue was suspended in 20 ml of Et₂O and sonicated for a few minutes. The white precipitate was filtered off, washed with several portions of Et₂O and dried under a high vacuum. Yield 0.86 g (96%) of **B**.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.75 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.62 – 4.48 (m, 1H), 3.06 (dd, $J = 15.3, 8.3$ Hz, 1H), 2.97 – 2.86 (m, 1H), 2.61 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 171.86, 166.11, 141.92, 133.19, 128.23, 126.79, 55.60, 25.24. **ESI-MS:** m/z calculated for: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 449.0836, found: 449.0886, calculated for: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 471.0655, found: 471.0668.

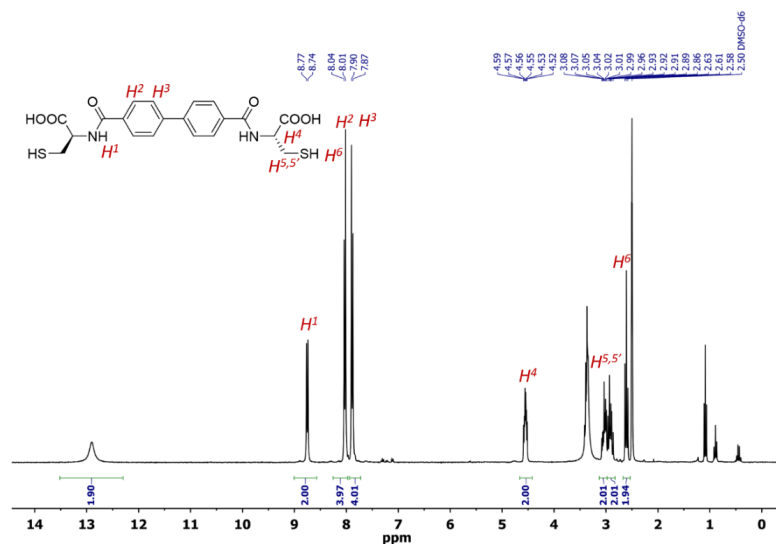


Figure S4: $^1\text{H NMR}$ spectrum of component **1** in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (300 MHz).

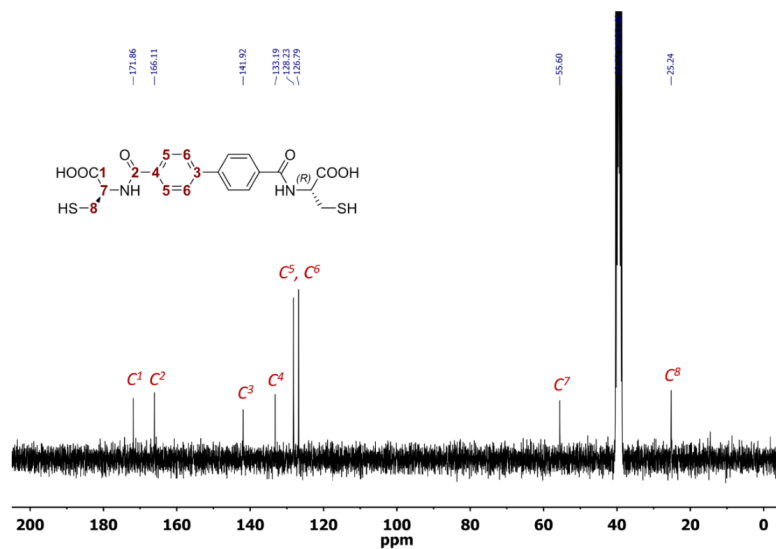


Figure S5: $^{13}\text{C NMR}$ spectrum of component **A** in $\text{DMSO-}d_6$ at 298 K (75 MHz).

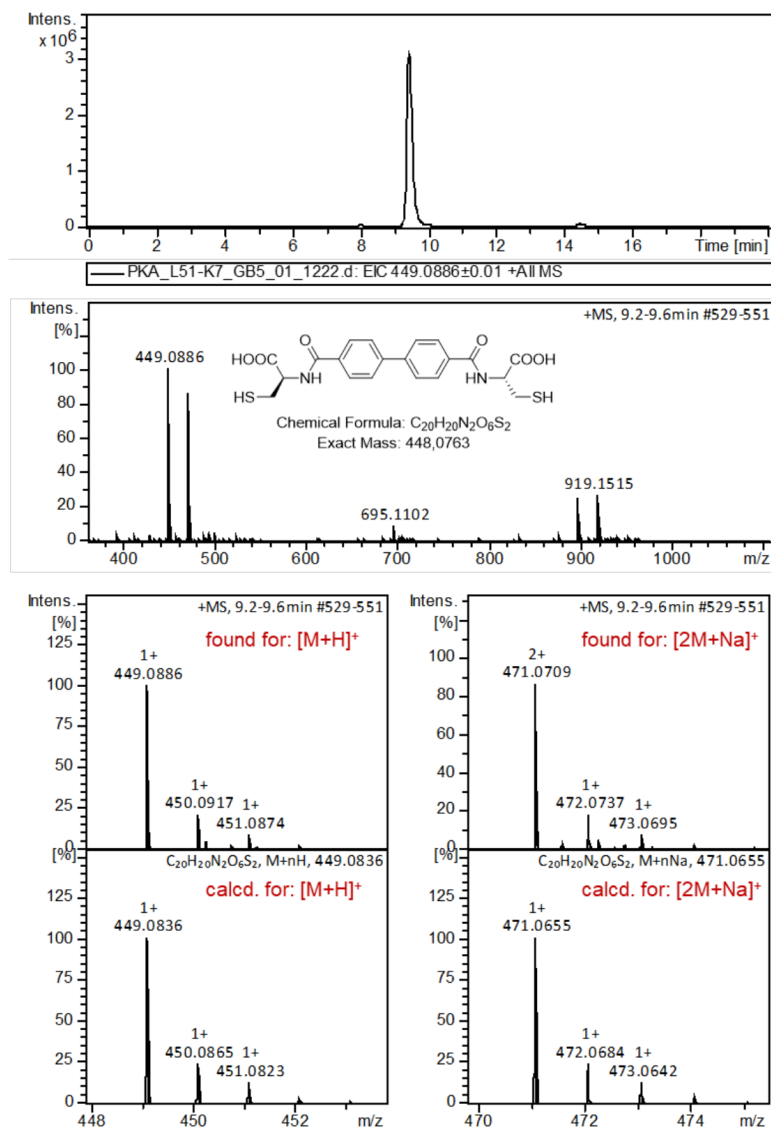
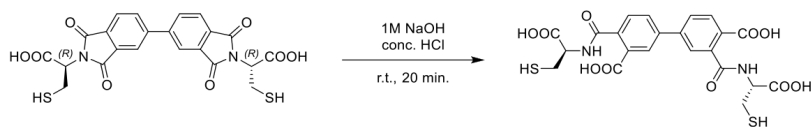


Figure S6: LC-MS analysis of component B. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

Synthesis of A-2Hyd



The 100 mg of **A** was dissolved in 1 mL of 1M NaOH in the vial and stirred. After 20 minutes, the mixture was acidified with 1 mL of concentrated aqueous HCl. The precipitated white solid was filtered off, washed with water and Et₂O, and then dried under high vacuum. Yield 98 g (99%) of **A-2Hyd**.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.83 (s, 2H), 8.84 (dd, *J* = 7.9, 3.1 Hz, 1H), 8.74 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.08 (dd, *J* = 8.3, 1.7 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.90 (s, 2H), 7.76 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J* = 7.9, 4.5 Hz, 1H), 4.60 (qd, *J* = 7.6, 7.0, 3.0 Hz, 2H), 2.92 (tdd, *J* = 15.7, 13.8, 8.1 Hz, 4H), 2.61 – 2.51 (t, 2H).
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.15, 171.84, 168.53, 168.12, 141.43, 141.38, 132.36, 132.28, 130.54, 129.99, 129.86, 129.47, 129.35, 128.37, 126.85, 126.71, 55.59, 39.89, 25.83. **ESI-MS**: *m/z* calculated for: [M+H]⁺ 537.0632, found: 537.0624.

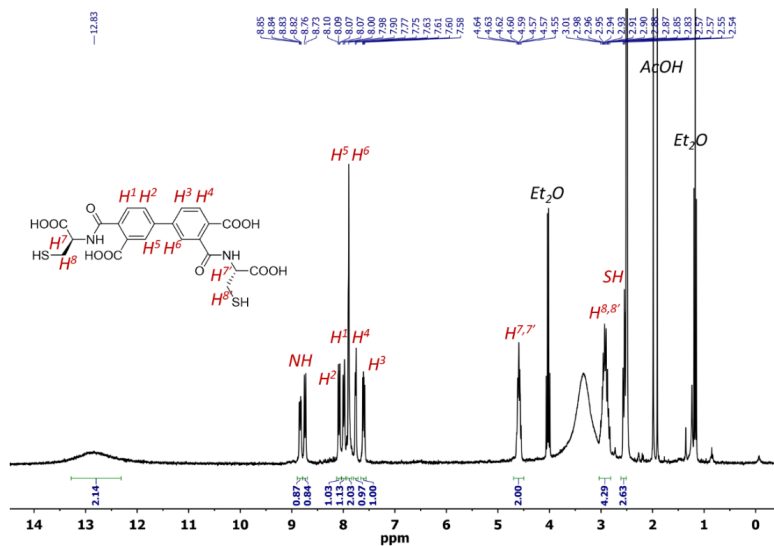


Figure S7: ¹H NMR spectrum of **A-2Hyd** in DMSO-*d*₆ at 298 K (300 MHz).

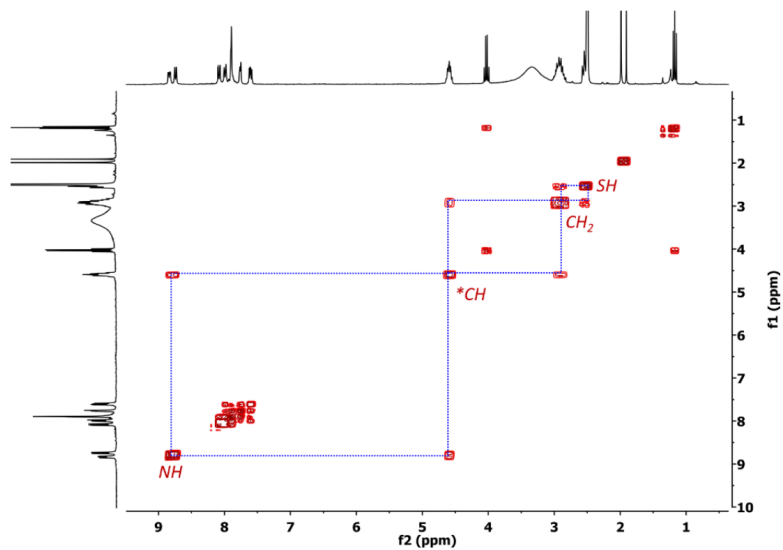


Figure S8: COSY NMR spectrum of A-2Hyd in DMSO- d_6 at 298 K (300 MHz).

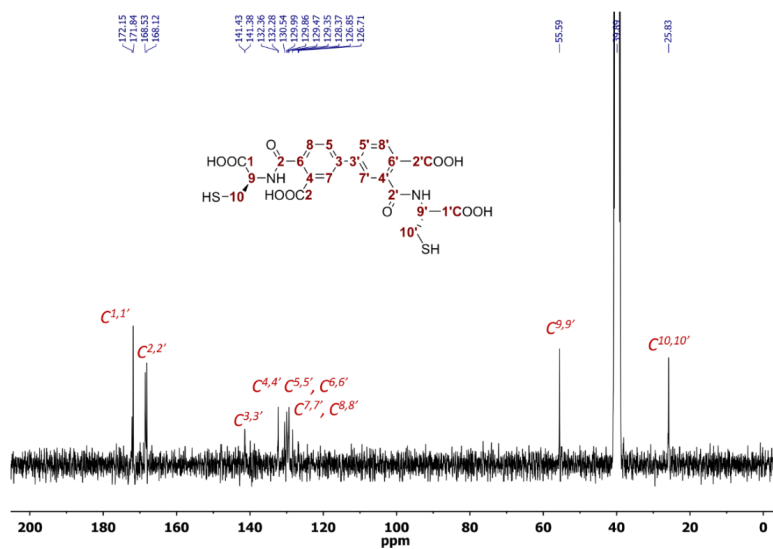


Figure S9: ^{13}C NMR spectrum of component A-2Hyd in DMSO- d_6 at 298 K (75 MHz).

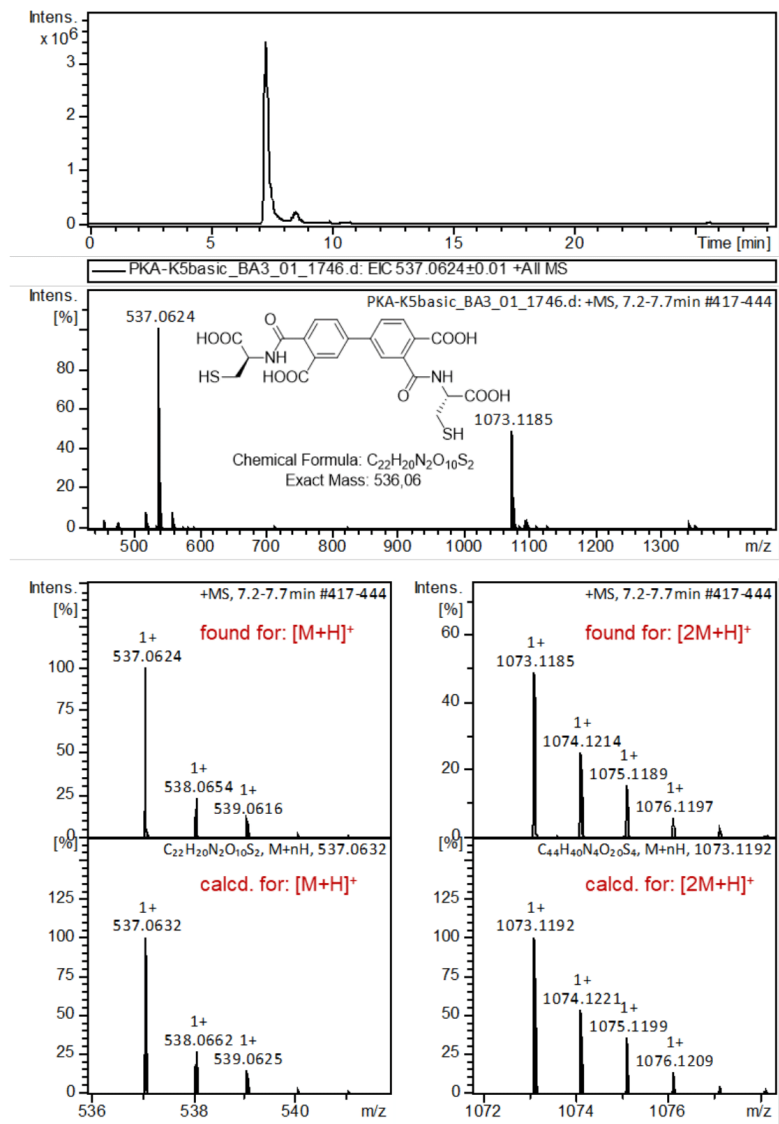


Figure S10: LC-MS analysis of **A-2Hyd**. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

Synthesis of A₂



The 50 mg of **A** (0.1 mmol) was dissolved in 1 mL of DMSO and stirred at r.t. for 3 days. After that 20 mL of cold Et₂O was added with vigorous stirring to precipitate the product. The white precipitate was centrifuged several times, each time washed with 10 mL of Et₂O. Then it was dried under a high vacuum. Yield 35 g (70%) of **A₂**.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.28 (s, 9H), 8.06 – 7.94 (m, 5H), 5.10 (q, *J* = 8.7, 5.4 Hz, 4H), 3.54 (d, *J* = 14.0 Hz, 4H), 3.38 (t, *J* = 12.1 Hz, 4H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.13, 169.31, 166.78, 144.76, 134.29, 132.00, 130.75, 124.35, 122.87, 51.26, 21.21. ESI-MS: *m/z* calculated for: [M+H]⁺ 997.0456, found: 997.0485.

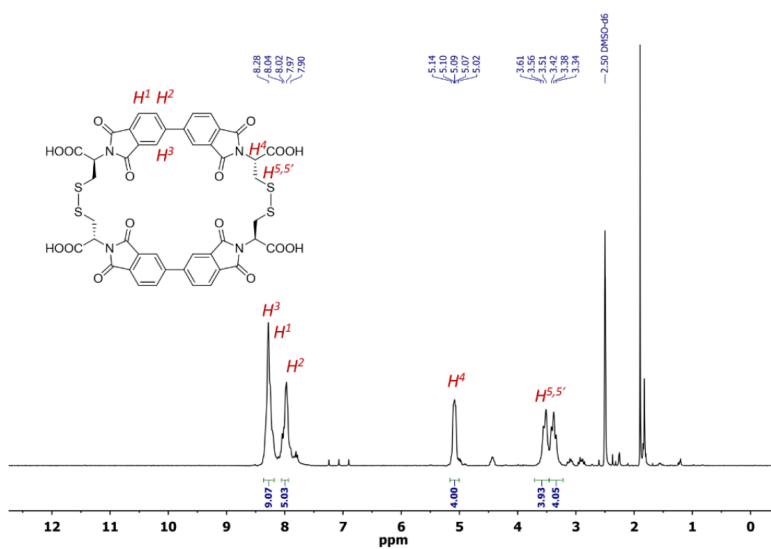


Figure S11: ¹H NMR spectrum of **A₂** in DMSO-*d*₆ at 298 K (300 MHz).

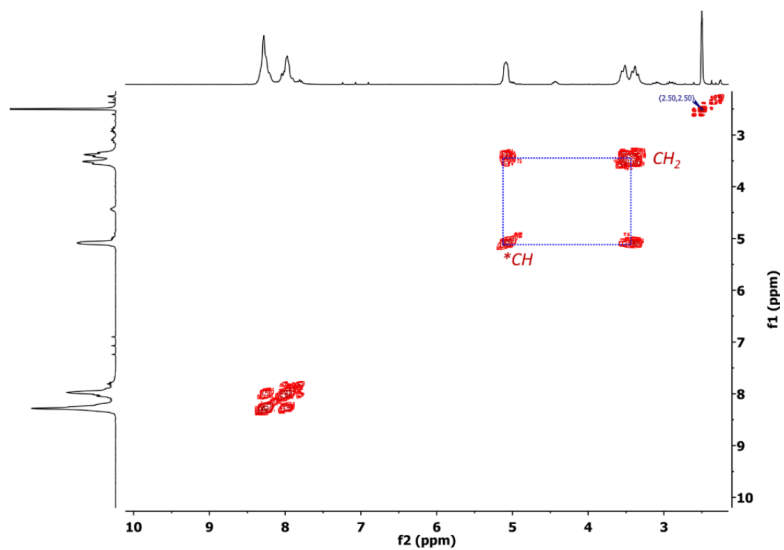


Figure S12: COSY NMR spectrum of **A₂** in DMSO-*d*₆ at 298 K (300 MHz).

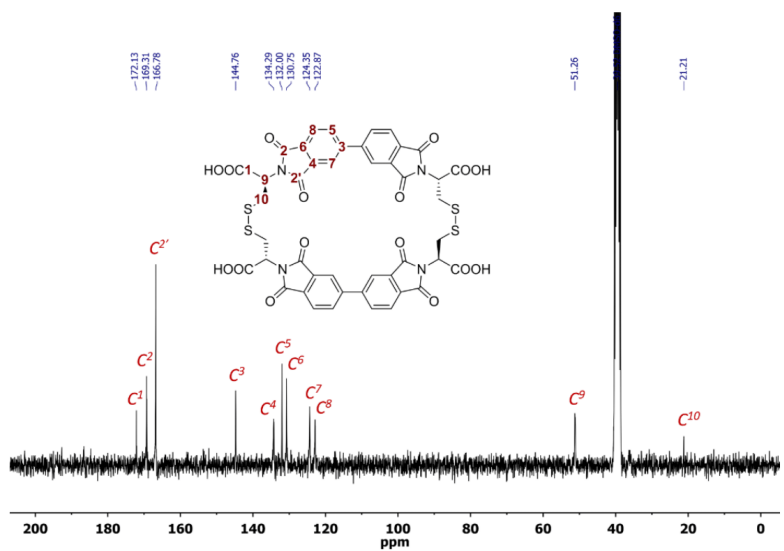
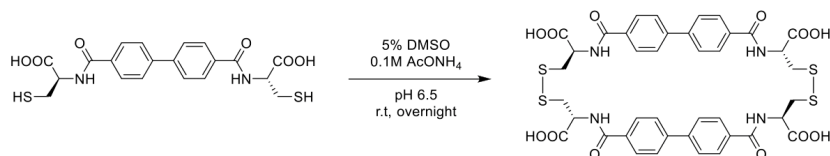


Figure S13: ¹³C NMR spectrum of component **A₂** in DMSO-*d*₆ at 298 K (75 MHz).

Synthesis of B₂



The 50 mg of B was dissolved in 2 mL of a mixture of 0.1M AcONH₄ buffer and 5% DMSO at pH 6.5 and stirred at r.t. overnight. The mixture was then acidified with 1 mL of 1M HCl. The precipitated white solid was filtered off, washed with water and Et₂O, and then dried under a high vacuum. Yield 46 g (92%) of B₂.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.89 (s, 4H), 8.85 (d, *J* = 7.4 Hz, 4H), 7.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 8H), 7.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 8H), 4.75 (q, *J* = 7.4 Hz, 4H), 3.29 – 3.18 (m, 4H), 2.92 (dd, *J* = 13.5, 8.1 Hz, 4H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.20, 166.12, 141.96, 133.10, 128.23, 126.86, 51.97, 15.33. ESI-MS: *m/z* calculated for: [M+H]⁺ 893.1285, found: 893.1251.

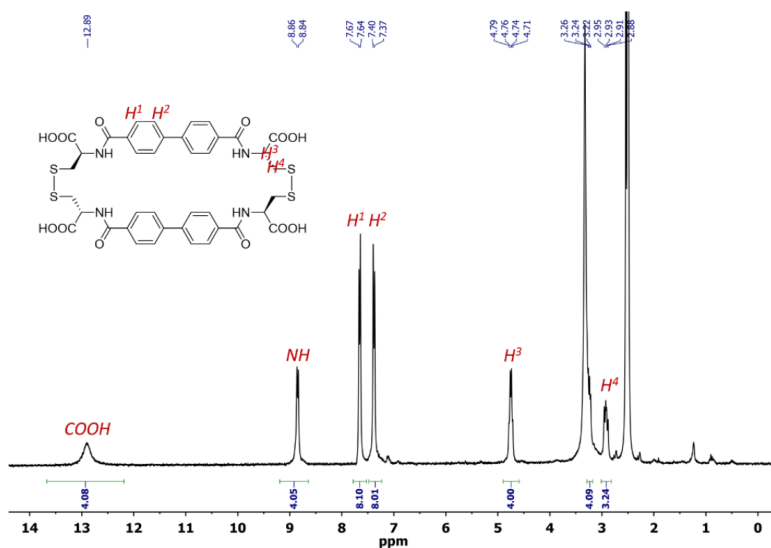


Figure S14: ¹H NMR spectrum of B₂ in DMSO-*d*₆ at 298 K (300 MHz).

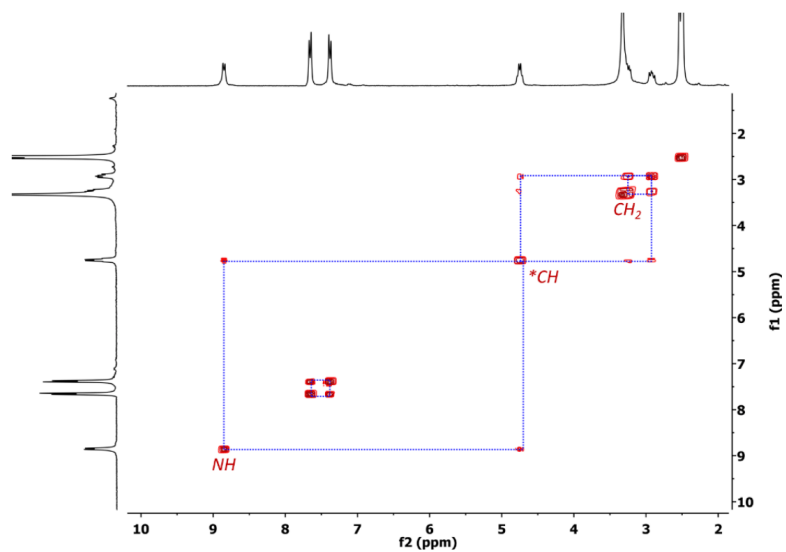


Figure S15: COSY NMR spectrum of **B**₂ in DMSO-*d*₆ at 298 K (300 MHz).

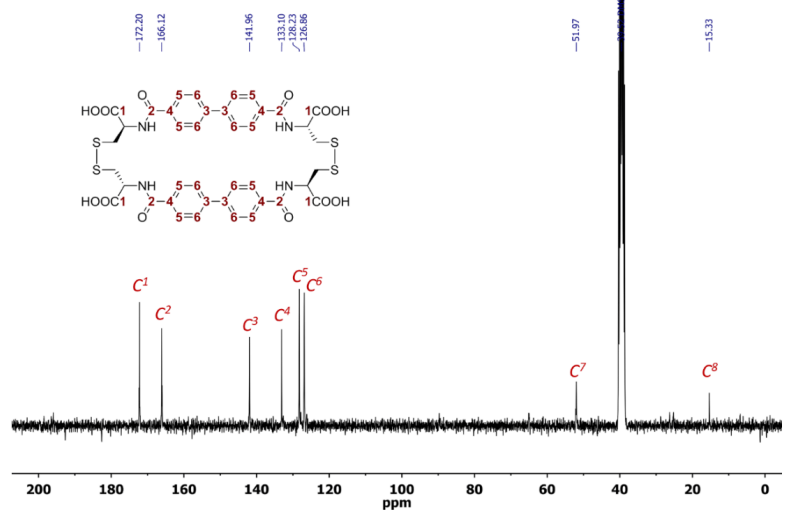


Figure S16: ¹³C NMR spectrum of **B**₂ in DMSO-*d*₆ at 298 K (75 MHz).

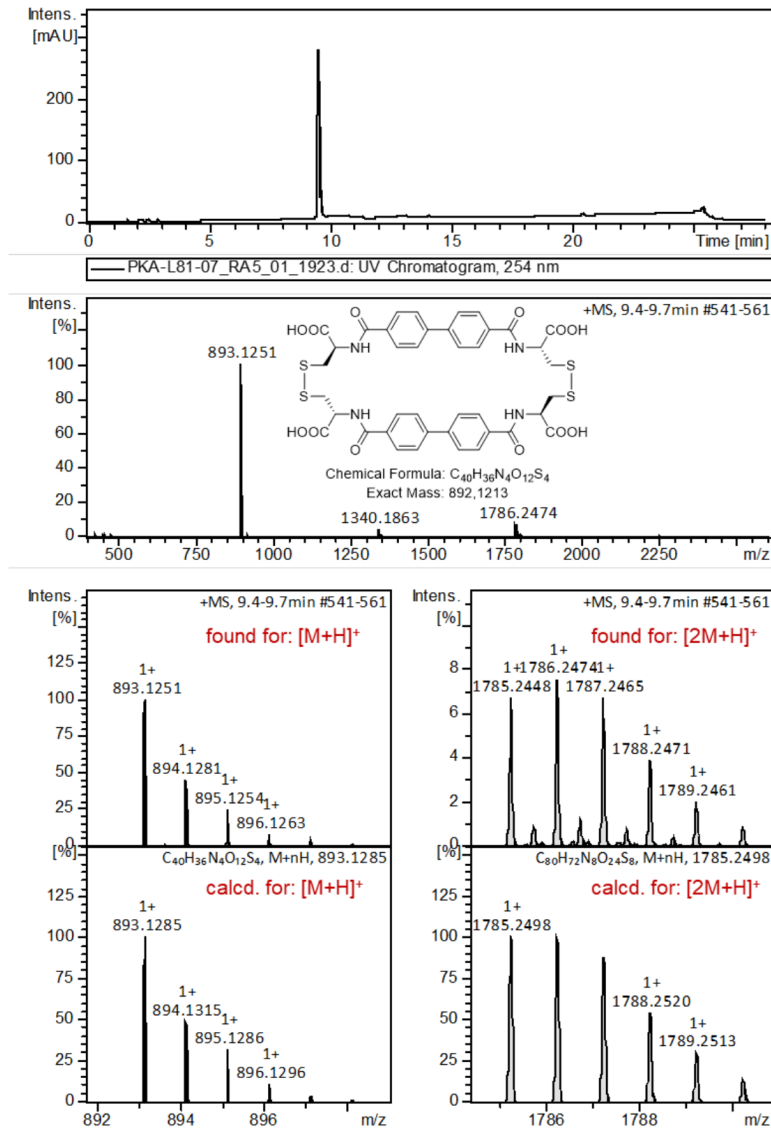


Figure S17: LC-MS analysis of **B₂**. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

LC-MS Analysis

A₂

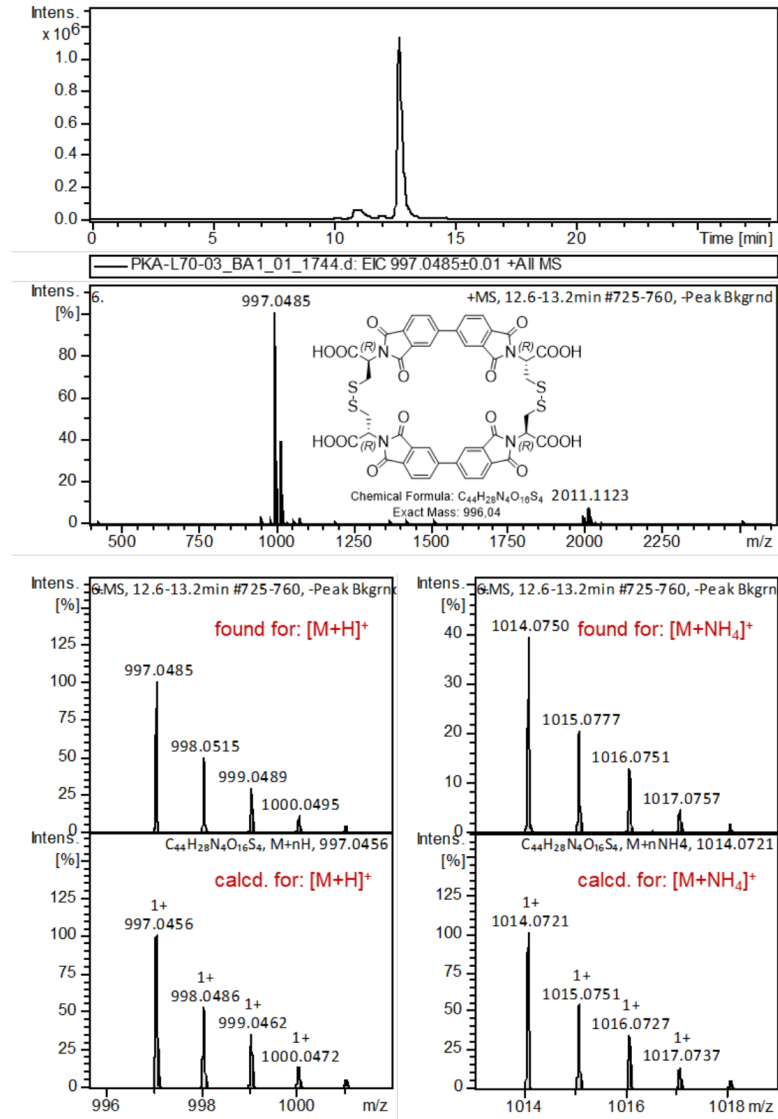


Figure S18: LC-MS analysis of A₂. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

A₂-Hyd

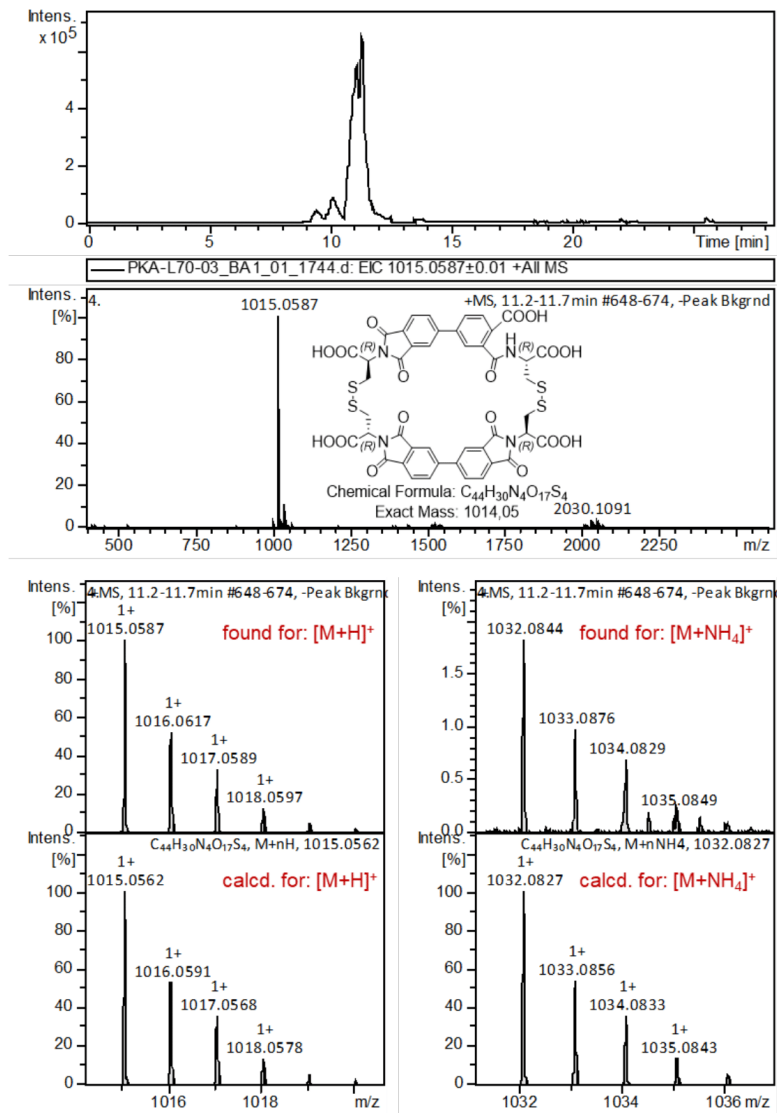


Figure S19: LC-MS analysis of **A₂-Hyd**. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

A₂-4Hyd

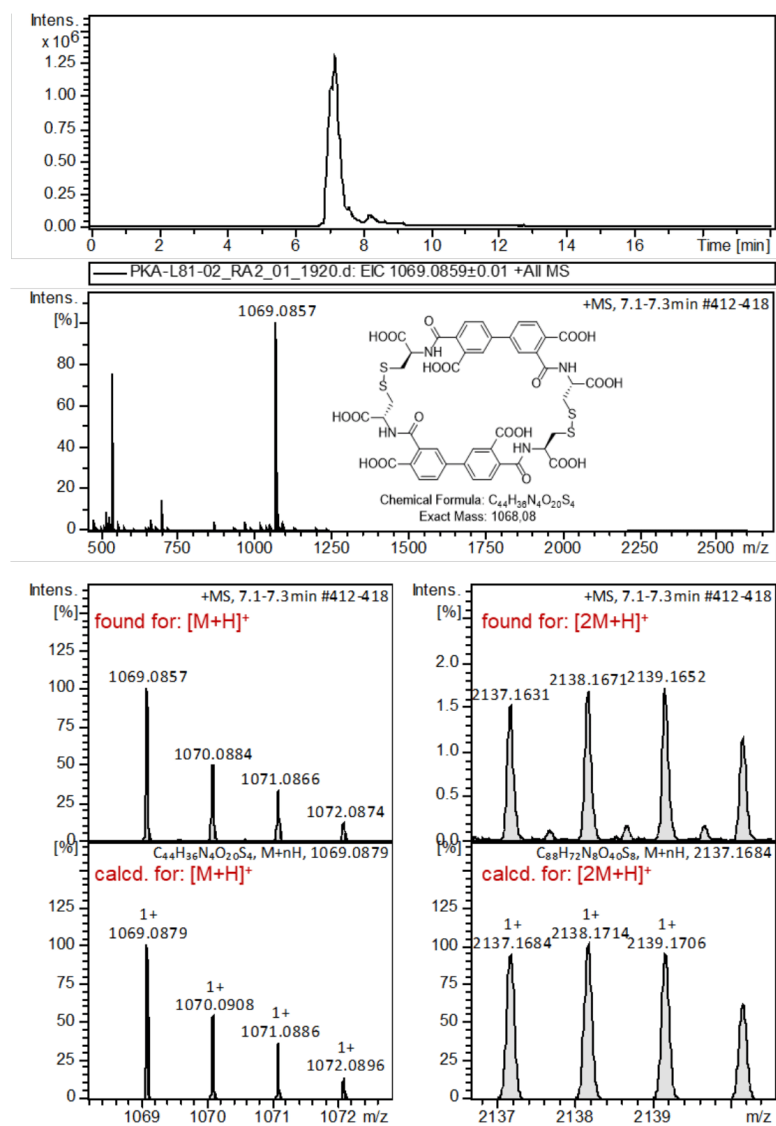


Figure S20: LC-MS analysis of **A₂-4Hyd**. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

A₃

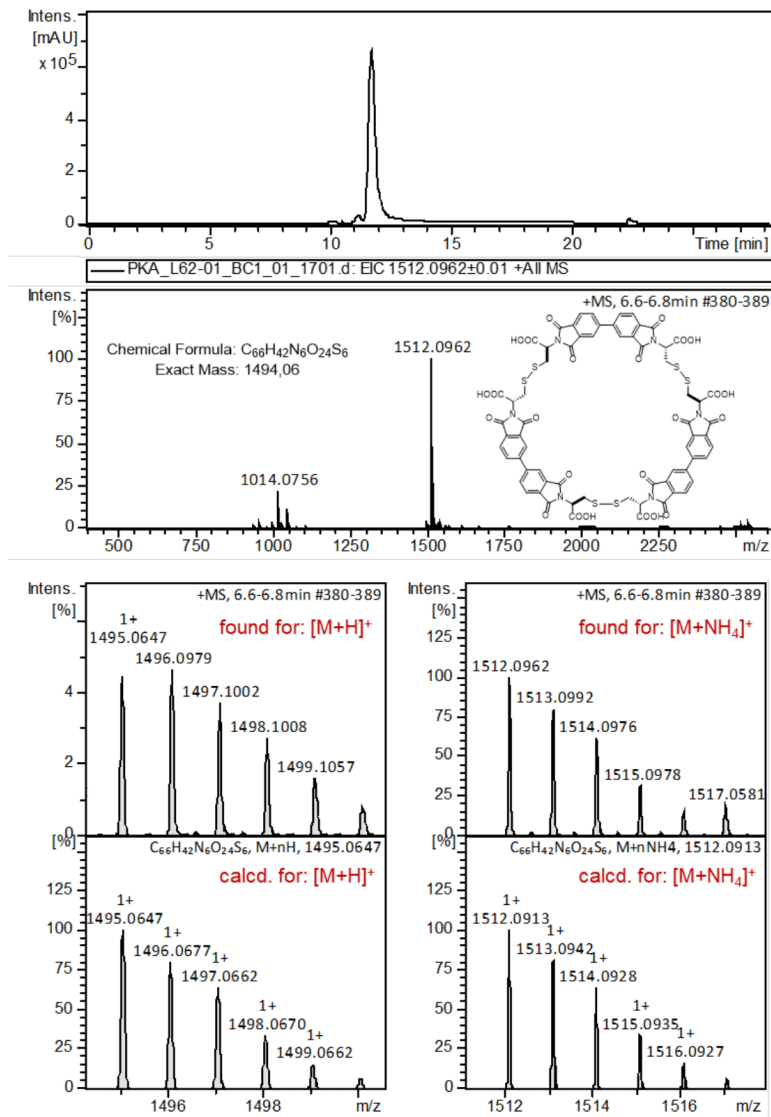


Figure S21: LC-MS analysis of A₃. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

S20

A₃-Hyd

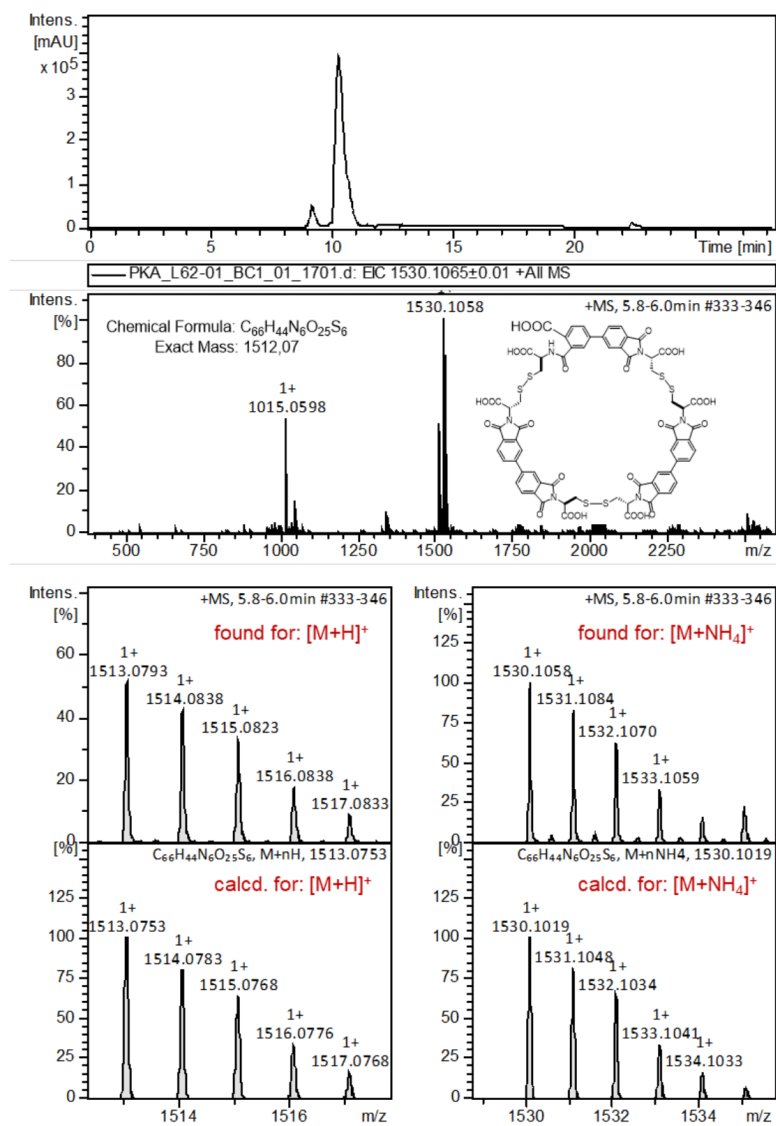


Figure S22: LC-MS analysis of **A₃-Hyd**. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

A₄

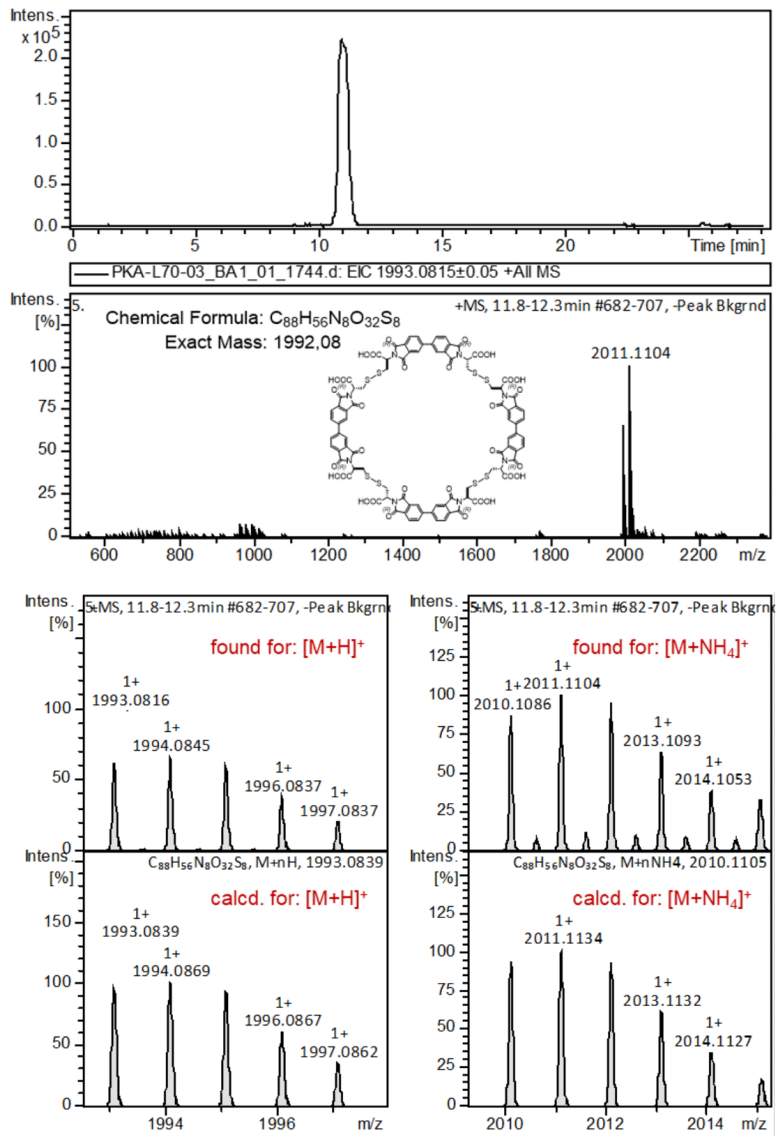


Figure S23: LC-MS analysis of A₄. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

S22

A₄-Hyd

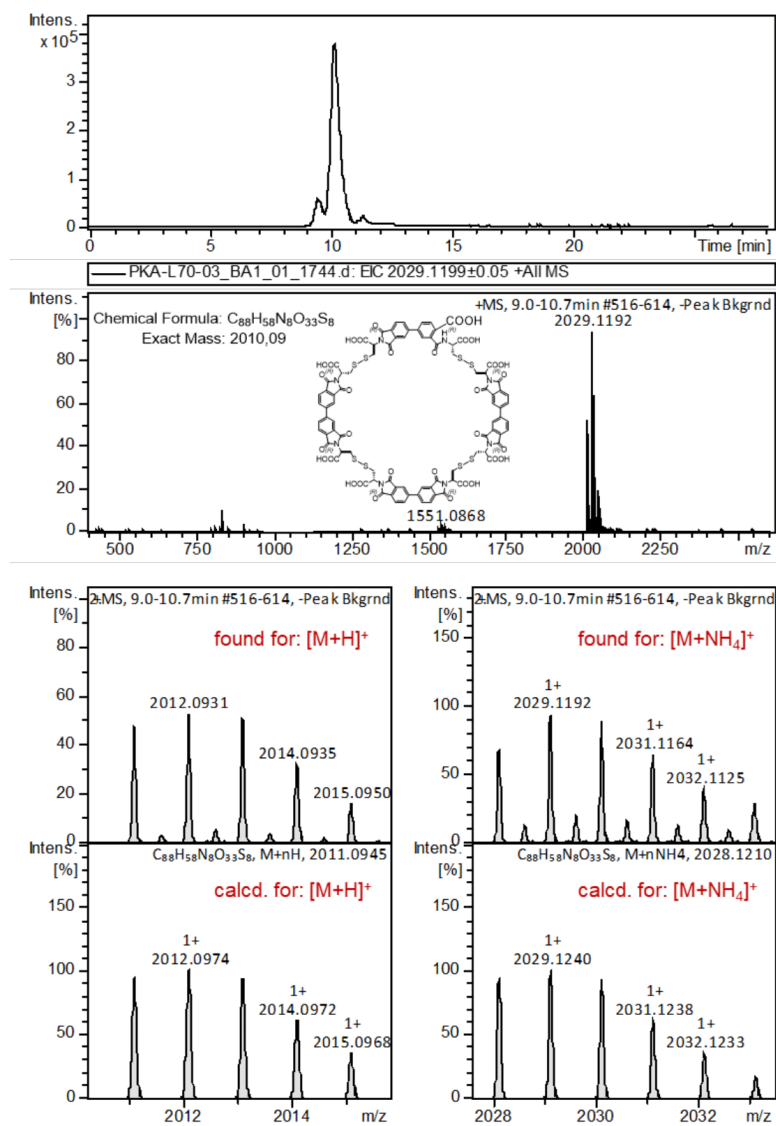


Figure S24: LC-MS analysis of **A₄-Hyd**. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

AS

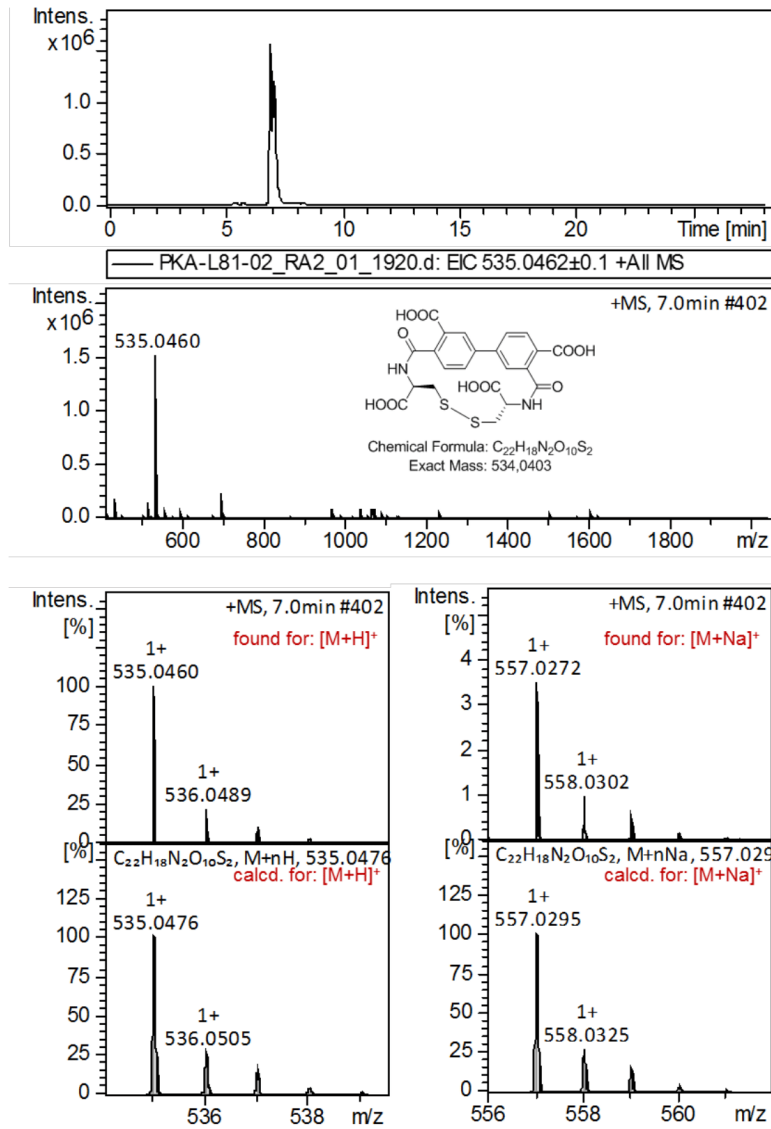


Figure S25: LC-MS analysis of AS. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

S24

AA

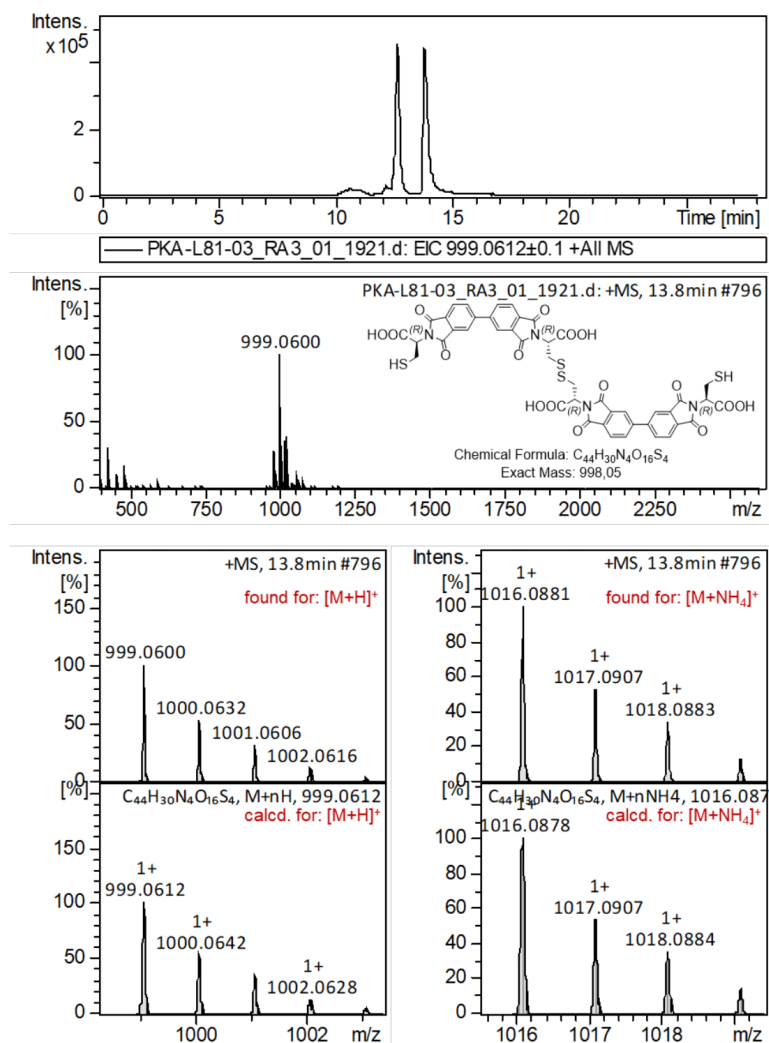


Figure S26: LC-MS analysis of AA. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

AA-Hyd

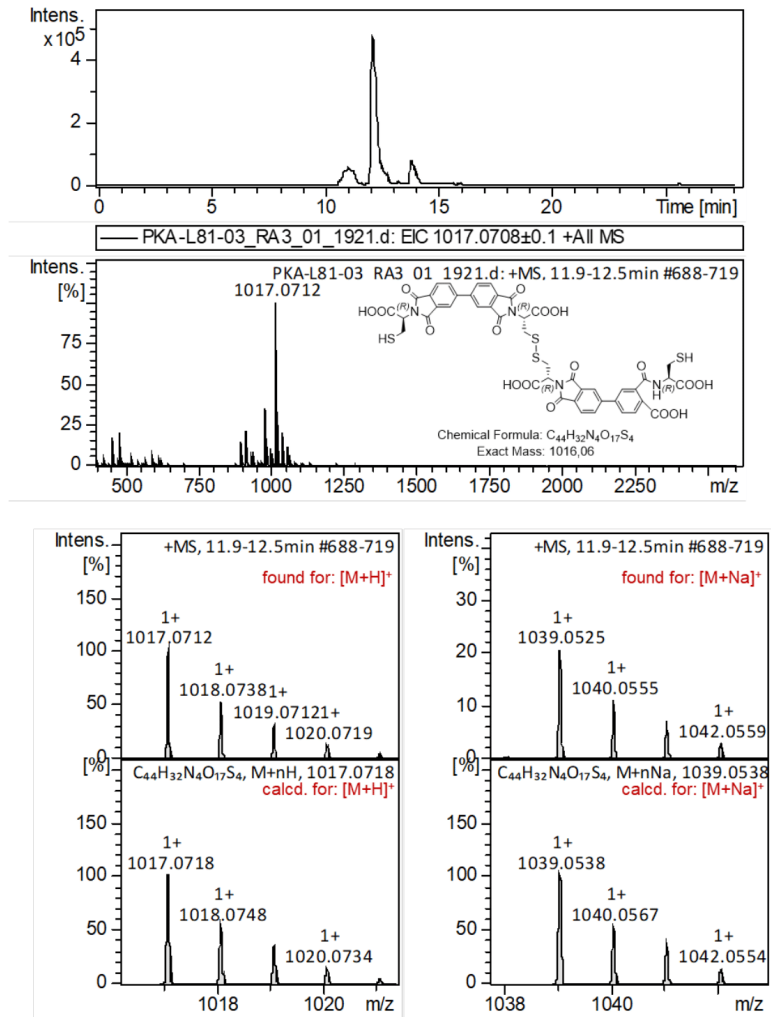


Figure S27: LC-MS analysis of AA-Hyd. Extracted ion chromatogram, +ESI-MS spectrum, simulated/found spectra comparison.

HPLC Data

DMSO/Water optimization

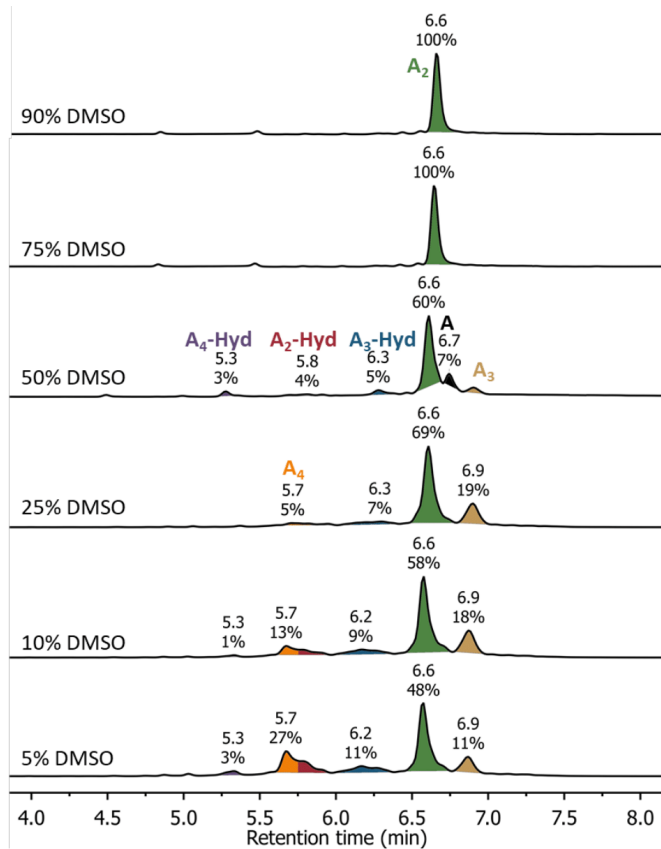


Figure S28: HPLC traces (254 nm) of DMSO/Water optimization DCLs.

DMSO/0.1M AcONH₄ optimization

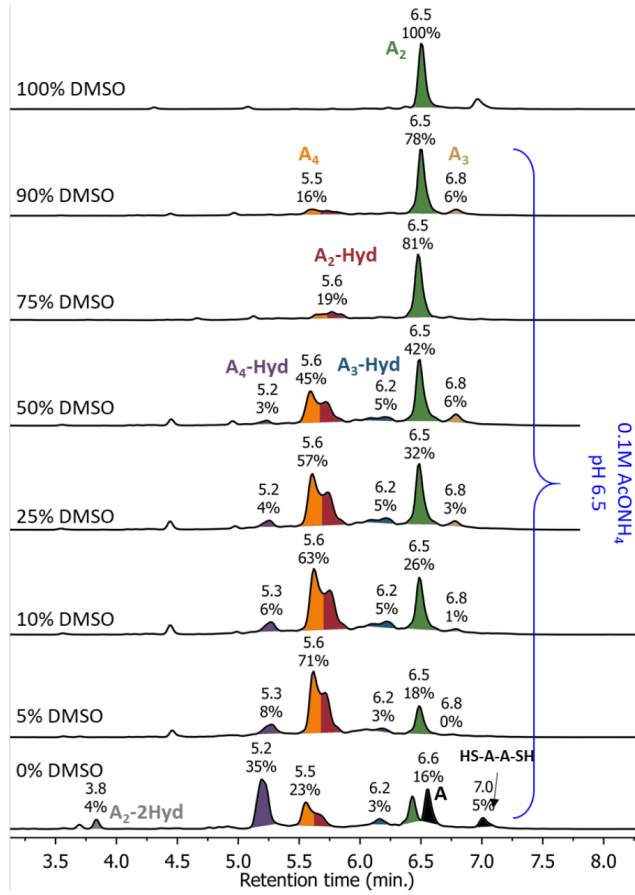


Figure S29: HPLC traces (254 nm) of DMSO/0.1M AcONH₄ optimization DCLs.

pH in 5%DMSO/0.1M AcONH₄ optimization

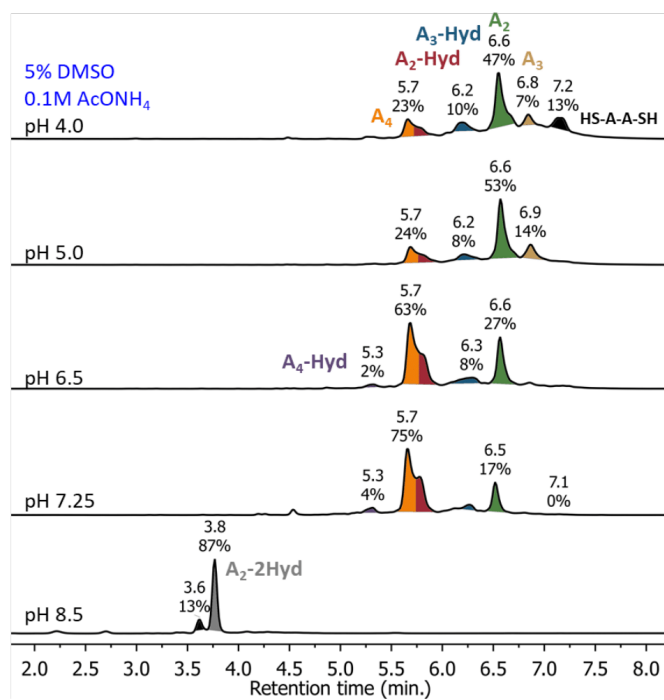


Figure S30: HPLC traces (254 nm) of pH in 5% DMSO/0.1M AcONH₄ optimization DCLs.

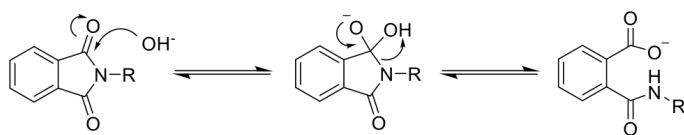


Figure S31: Scheme of the N-phthalimide derivative hydrolysis mechanism in basic conditions.^[3]

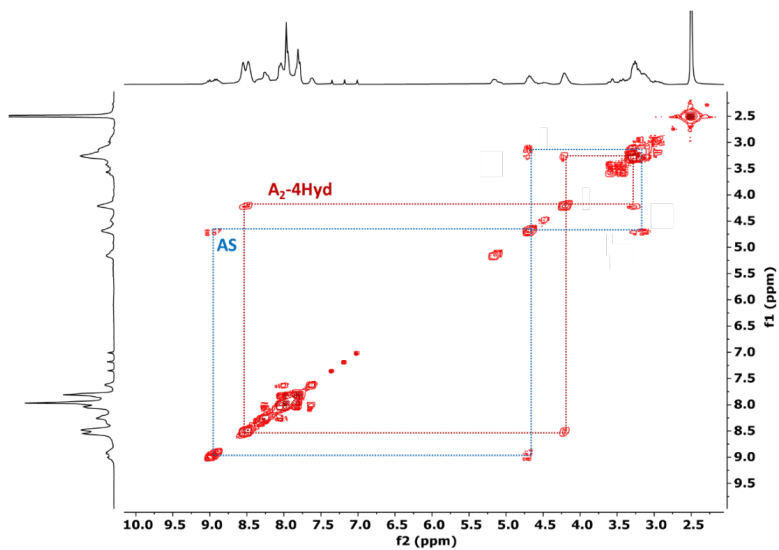


Figure S32: COSY NMR spectrum of **A₂-4Hyd** in DMSO-*d*₆ at 298 K (300 MHz).

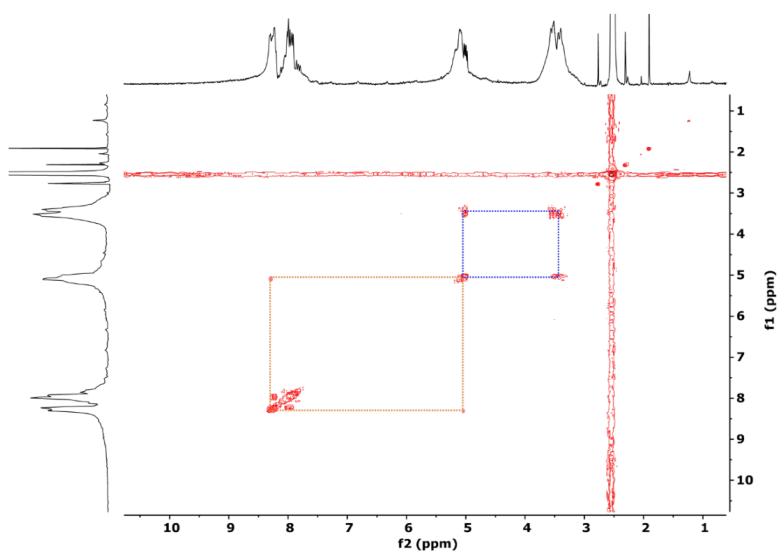
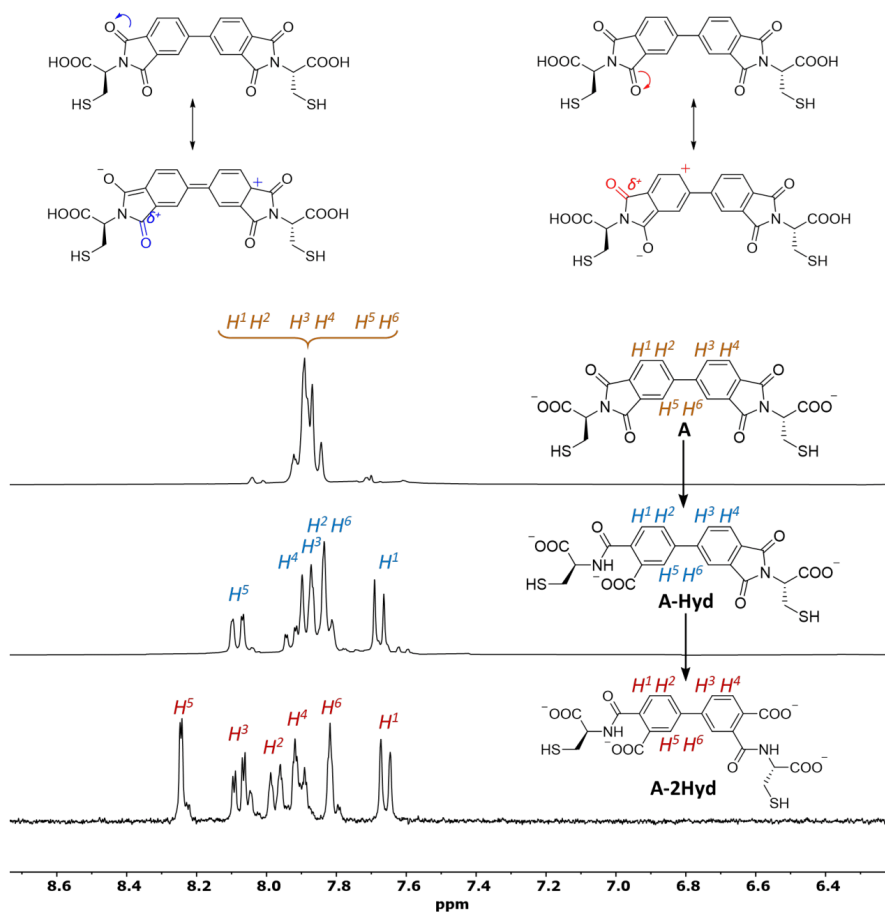


Figure S33: COSY NMR spectrum of **A DCL** (pH 7.25, 5% DMSO, Fig. 3f) in DMSO-*d*₆ at 298 K (300 MHz).



S31

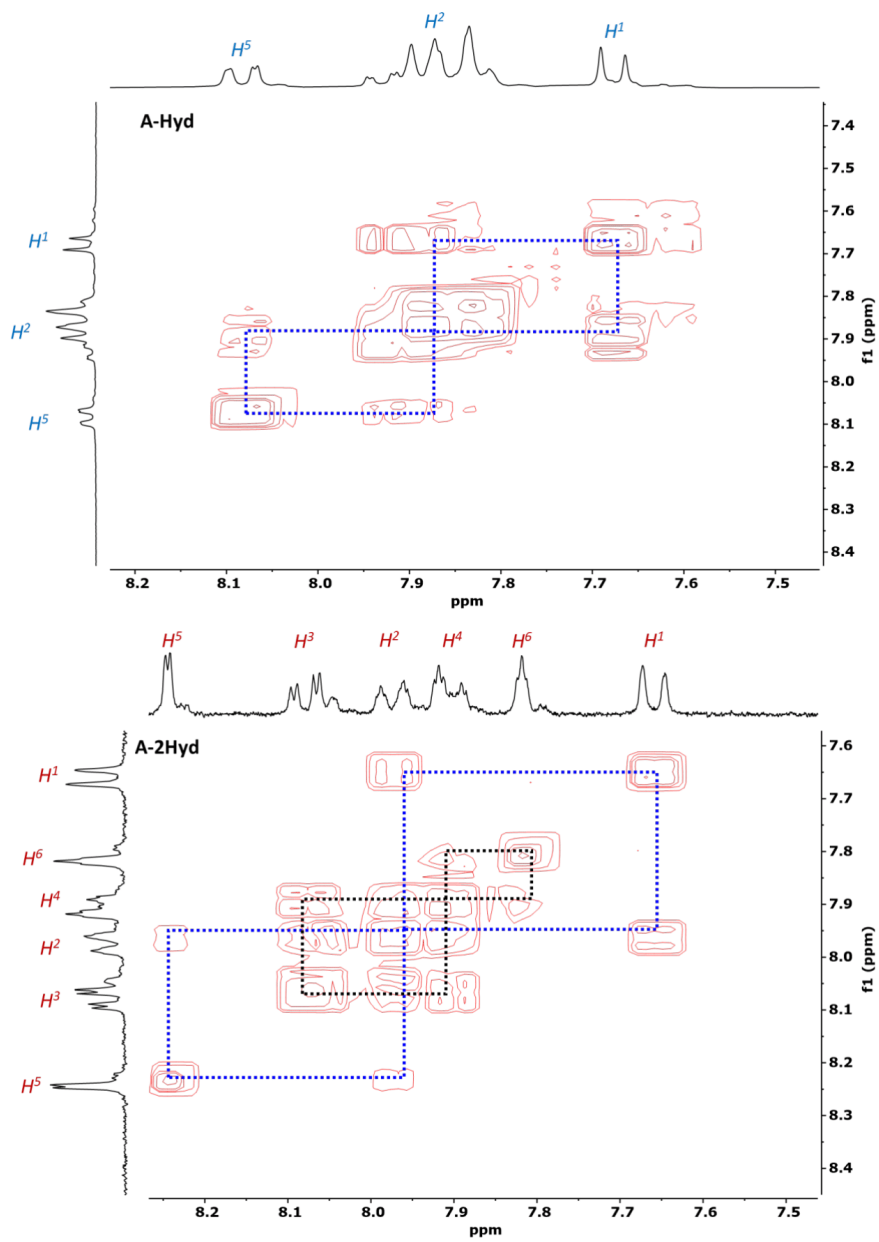


Figure S34: Comparison of ¹H NMR and COSY spectra of **A** to **A-2Hyd** hydrolysis in time (D₂O at 298 K, 300 MHz).

Four imide carbonyls of **A** can act as electron withdrawing groups resulting in the accumulation of single positive charge on the phenyl ring. A more stable resonance structure (due to formation of tertiary carbocation) is generated when electron withdraw takes place on the O-carbonyl atom in the *para* position with respect to the single bond between aromatic rings (see ESI, Fig. S34, left path). This makes the second carbonyl group (in the *meta* position, marked blue) more electrophilic, thus directing the hydrolysis process in this position. This has been confirmed by the ^1H NMR observation of this hydrolysis over time, which showed that the *para* amide was formed first (see Fig. S34).^[4]

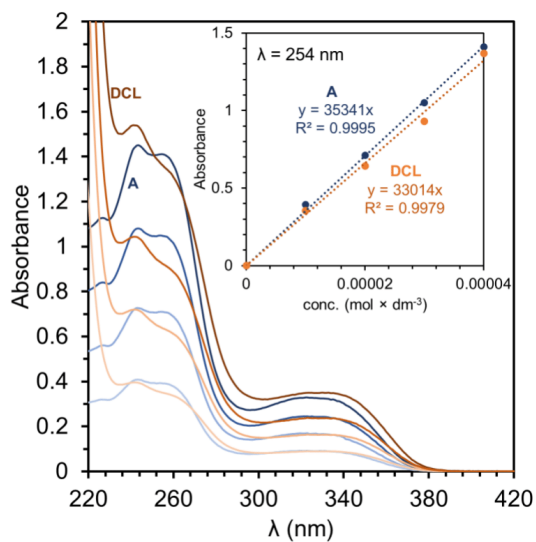


Figure S35: Comparison of UV-Vis spectra of **A** (blue) and DCL (brown, pH 6.5, conc. 1×10^{-5} M – 4×10^{-5} M, cuvette 1×1 cm). Inset contains the comparison of absorbance values at 254 nm at the same concentrations.

References

- [1] M. Konopka, G. Markiewicz, A. R. Stefankiewicz, *RSC Adv.* **2018**, *8*, 29840-29846.
- [2] A. R. Stefankiewicz, M. R. Sambrook, J. K. M. Sanders, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2326.
- [3] M. N. Khan, A. A. Khan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1979**, -, 796-798.
- [4] P. L. Corio, B. P. Dailey, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 3043-3048.