



**Instytut Chemii Organicznej
Polskiej Akademii Nauk**

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Automatyczna analiza reakcji chemicznych
oraz jej wykorzystanie w komputerowo-wspomaganej
i zautomatyzowanej syntezie związków organicznych**

mgr inż. Barbara Mikulak-Klucznik

**Rozprawa doktorska w formie cyklu publikacji
przedstawiona Radzie Naukowej Instytutu Chemii
Organicznej Polskiej Akademii Nauk
w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych**

Promotor: Prof. Bartosz A. Grzybowski

Warszawa, 2022

FINANSOWANIE



Grant SYMFONIA 2014/12/W/ST5/00592

„Rozwój ‘Komputerowej Lingwistyki Chemicznej’ i jej zastosowanie do efektywnego planowania wieloetapowych syntez chemicznych”
przyznany przez Narodowe Centrum Nauki



Institute for Basic Science, Republic of Korea (IBS-R020-D1)

Dziękuję

Profesorowi Grzybowskiemu - za całokształt opieki naukowej w ramach doktoratu oraz wszelką przekazaną wiedzę,

Całemu Zespołowi - za niepowtarzalną atmosferę i współpracę, bez której doktorat ten nie byłby możliwy,

Rodzicom - za trud wychowania oraz zapewnienie możliwości, które pozwoliły mi zająć tak daleko,

Tomkowi - za nieustające wsparcie oraz wielogodzinne dyskusje,

a także Tadziewi - za to, że codzienne uczy mnie więcej niż wszystkie lata szkoły razem wzięte.

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

W ostatnich latach komputerowo-wspomagana chemia organiczna przeżywa swój renesans, a wyzwania przed nią stojące są większe niż kiedykolwiek wcześniej. Błyskawicznie zmieniające się warunki klimatyczne, wyczerpywanie się zasobów naturalnych, a także opóźnienia w łańcuchach dostaw spowodowane pandemią SARS-CoV-2 sprawiają, że intensywnie poszukuje się nowych, efektywnych metod syntezy i separacji związków organicznych. Polegają one m.in. na zwiększeniu wydajności i szybkości procesów chemicznych zarówno poprzez opracowywanie nowych typów reakcji chemicznych, tworzenie optymalnych planów syntetycznych jak również konstruowanie zautomatyzowanych systemów do syntezy i separacji.

Początki komputerowo-wspomaganej chemii organicznej sięgają lat 60., w których E. J. Corey rozpoczął pracę nad pierwszym programem do analizy retrosyntetycznej – LHASA. Pomimo początkowego entuzjazmu zarówno ten jak i następne programy nie generowały użytecznych analiz i nie zyskały popularności wśród chemików. Powodem tego była m.in. niewystarczająca moc obliczeniowa ówczesnych komputerów i brak odpowiednich narzędzi algorytmicznych. Sytuacja zmieniła się dopiero w ciągu ostatnich kilku lat, kiedy Prof. Grzybowski wraz z zespołem opracował najbardziej rozbudowany program do analizy retrosyntetycznej – *Chematica/Synthia*TM.

Poprawność analiz programu Chematica została potwierdzona eksperymentalnie na przykładzie związków o znaczeniu medycznym. Natomiast przedmiotem moich badań było sprawdzenie możliwości wykorzystania programu do analizy retrosyntetycznej oraz syntezy laboratoryjnej związków naturalnych o wysokim stopniu skomplikowania strukturalnego, co wykazałam na przykładzie syntezy totalnej (*R,R,S*)-takamondyny. Wyniki te zostały opublikowane w czasopiśmie *Nature*¹.

W drugiej części moich badań skupiłam się na problemie automatycznej syntezy i separacji związków organicznych. Wykorzystując nowy typ rotującego reaktora opartego o nierównowagowe systemy rozpuszczalnikowe opracowałam metodę zautomatyzowanej, selektywnej ekstrakcji związków organicznych, co wykazałam na przykładzie ekstrakcji fenyloalaniny za pomocą przenośnika D2EHPA. Wyniki te zostały opublikowane w czasopiśmie *Nature*².

ABSTRACT - STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

In recent years, computer-aided organic chemistry is experiencing its renaissance and the challenges it is facing are greater than ever before. The rapidly changing climate, exhaustion of natural resources, as well as delays in the supply chains caused by the SARS-CoV-2 pandemic create increased demand for new, more effective methods of synthesis and separation of organic compounds. These methods include, *inter alia*, increasing the efficiency of chemical processes via development of new types of chemical reactions, creating optimal synthetic plans for desired compounds as well as the construction of integrated experimental systems for automated synthesis and separation.

The beginnings of computer-assisted organic chemistry date back to the 1960s, when E. J. Corey started his work on the first program for retrosynthetic analysis – LHASA. Despite initial enthusiasm, both this and subsequent programs failed to generate useful analyzes and did not gain popularity among chemists. The reason for the limited planning prowess of these early solutions was, among others, insufficient computing power and the lack of advanced algorithmic tools. The situation has changed dramatically during the last few years, when Prof. Grzybowski and his team developed the most extensive program for retrosynthetic analysis – *Chematica/Synthia*TM.

Retrosynthetic plans generated by Chematica have been validated by experiment, in multiple syntheses of medically-important targets. Taking an important and in many ways a crucial step forward, the subject of my research was to investigate the possibility of using the program for the retrosynthesis and laboratory validation of natural products with a high degree of structural complexity – which I demonstrated by performing the key part of the total synthesis of (*R,R,S*)-tacamonidine. This work was published in *Nature*¹.

In the second part of my research, I focused on the problem of automatic synthesis and separation of organic compounds. Using a new type of rotating reactor based on out-of-equilibrium solvent systems held in a multilayer configuration by centripetal forces, I developed a method of automated, selective extraction of organic compounds, which I demonstrated on the example of phenylalanine extraction using the D2EHPA carrier. This work was published in *Nature*².

SPIS TREŚCI

1. Lista publikacji.....	1
2. Konferencje oraz wykłady.....	2
3. Założenia i cel pracy.....	3
4. Wykaz skrótów i pojęć.....	4
5. Wstęp teoretyczny.....	7
5.1. Historyczne programy do analizy retrosyntetycznej.....	7
5.2. Współczesne narzędzia komputerowo-wspomaganej chemii organicznej.....	12
6. Szczegółowy kontekst projektu i badania własne.....	19
6.1. Chematica/Synthia™.....	19
6.1.1. Badania własne – synteza totalna (<i>R,R,S</i>)-takamonidyny.....	28
6.2. Rotacyjny reaktor do automatycznej syntezy i separacji.....	37
6.2.1. Badania własne – automatyczna, selektywna separacja związków organicznych z wykorzystaniem rotacyjnego reaktora.....	43
7. Podsumowanie.....	49
8. Bibliografia.....	51
9. Publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej.....	57
10. Oświadczenia współautorów.....	311

1. Lista publikacji

Publikacje wchodzące w zakres rozprawy doktorskiej:

- [P1] **Mikulak-Klucznik, B.**, Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, **2020**, 588, 83-88.
- [P2] Cybulski, O., Dygas, M., **Mikulak-Klucznik, B.**, Siek, M., Klucznik, T., Choi, S. Y., Mitchell, R. J., Sobolev, Y. I., Grzybowski, B. A. Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation. *Nature*, **2020**, 586, 57-63.
- [P3] Grzybowski, B. A., Sobolev, Y. I., Cybulski, O., **Mikulak-Klucznik, B.** Materials, assemblies and reaction systems under rotation. *Nature Reviews Materials*, **2022**, 7, 1-17.

Pozostałe publikacje:

1. Klucznik, T., **Mikulak-Klucznik, B.**, McCormack, M. P., Lima, H., Szymkuć, S., Bhowmick, M., Molga, K., Zhou, Y., Rickerhauser, L., Gajewska, E. P., Touchkine, A., Dittwald, P., Startek, M. P., Kirkovits, G. J., Roszak, R., Adamski A., Sieredzińska, B., Mrksich, M., Trice, S. L. J., Grzybowski, B. A. Efficient syntheses of diverse, medically relevant targets planned by computer and executed in the laboratory. *Chem*, **2018**, 4, 522-532.
2. Jaworski, W., Szymkuć, S., **Mikulak-Klucznik, B.**, Piecuch, K., Klucznik, T., Kaźmierowski, M., Rydzewski, J., Gambin, A., Grzybowski, B. A. Automatic mapping of atoms across both simple and complex chemical reactions. *Nature Communications*, **2019**, 10, 1-11.
3. Wołos, A., Roszak, R., Żądło-Dobrowolska, A., Beker, W., **Mikulak-Klucznik, B.**, Spólnik, G., Dygas., M., Szymkuć, S., Grzybowski, B. A. Synthetic connectivity, emergence, and self-regeneration in the network of prebiotic chemistry. *Science*, **2020** 369, 1-12.

2. Konferencje i wykłady

Konferencje

1. XLIV OSChem, 30.04-4.05.2016, Koszuty
Referat, autor prezentujący: „*Dronedarone – pierwsza w historii synteza leku zaprojektowana przez komputer*”
Referat został nagrodzony 1. miejscem w kategorii wystąpień doktoranckich.
2. XLVI OSChem, 29.04-3.05.2017, Jachranka
Poster, autor prezentujący: „*Automatic atom-mapping algorithm*”
3. XLVIII OSChem, 28.04-2.05.2018, Karczowiska
Referat, autor prezentujący: „*Krok dalej w komputerowym planowaniu syntezy – synteza totalna takamonidyny*”
4. 7th Intercollegiate Biotechnology Symposium *Symbioza*, 11-13.05.2018, Warszawa
Referat, autor prezentujący: “*Syntheses of medically relevant targets planned by computer and executed in the laboratory*”
5. Balticum Organicum Syntheticum, 1-4.07.2018, Tallin, Estonia
Poster, autor prezentujący: “*A step further in computer-planned organic synthesis - total synthesis of tacamonidine*”
6. JCF Frühjahrssymposium, 20-23.03.2019, Bremen, Niemcy
Referat, autor prezentujący: “*The bright future of computer-planned organic synthesis - total synthesis of tacamonidine*”
7. International Symposium on Synthesis and Catalysis, 3-6.09.2019, Evora, Portugalia
Referat, autor prezentujący: “*The bright future of computer-planned organic synthesis - total synthesis of tacamonidine*”

Wykłady

1. “Jaka jest przyszłość komputerowo-wspomaganej syntezy organicznej?”
Wykład na zaproszenie w ramach cyklu *Nowy Świat Chemii*, Warszawa, 4.06.2019

3. Założenia i cel pracy

Wyzwania stojące przed współczesną chemią organiczną są dziś większe niż kiedykolwiek wcześniej. Będąc świadkami wszechstronnego, intensywnego rozwoju technologicznego i ciągłego wzrostu liczby ludności oraz związanego z tym nieustannego wzrostu produkowanych odpadów, wyczerpywaniem się zasobów naturalnych i nasilającymi się zmianami klimatycznymi, naukowcy – w tym również chemicy organicy – nie mogą pozostawać bierni wobec gwałtownych zmian zachodzących w otaczającym nas świecie. Jedne z najbardziej znanych wytycznych dotyczących kierunku rozwoju współczesnej chemii organicznej (tzw. dwanaście zasad zielonej chemii) zostały opracowane już w 1998 roku przez Paula Anastasa oraz Johna Warnera³. Należą do nich m.in. takie zagadnienia jak minimalizacja produkcji odpadów, redukcja ilości używanych rozpuszczalników (wraz ze stosowaniem ich mniej toksycznych zamienników) czy optymalizacja wieloetapowej syntezy pod kątem uzyskiwania jak największych wydajności reakcji z jednoczesną minimalizacją wykorzystania toksycznych lub trudnych do usunięcia odczynników (np. katalizatorów opartych na metalach) oraz maksymalizacją ekonomii atomowej całego wieloetapowego procesu syntezy⁴. W tak zdefiniowany nurt zoptymalizowanego, ukierunkowanego rozwoju współczesnej chemii doskonale wpisuje się intensywnie rozwijana w ostatnim czasie tematyka komputerowo-wspomaganej chemii organicznej. Zalicza się do niej m.in. komputerowo wspomaganie projektowanie wieloetapowych syntez organicznych oraz automatyzację procesów syntezy i oczyszczania związków organicznych, które to zagadnienia stanowią podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej.

W kontekście powyżej opisanych wyzwań w mojej pracy doktorskiej postawiłam następującą tezę badawczą: **Wykorzystując podejście komputerowo-wspomaganej chemii organicznej możliwe jest opracowanie optymalnego planu syntezy związku organicznego o wysokim stopniu skomplikowania strukturalnego oraz jego realizacja w laboratorium, a także wykorzystanie nowych typów reaktorów opartych o nierównowagowe systemy rozpuszczalnikowe do zautomatyzowanego, selektywnego oczyszczania związków organicznych będącego alternatywą dla tradycyjnych metod separacji.**

Weryfikując pierwszą część tezy wykorzystałam stworzoną w naszym zespole platformę do analizy retrosyntetycznej *Chematica/Synthia*TM. Na podstawie planu syntetycznego w całości wygenerowanego przez program *Chematica/Synthia*TM pracowałam nad syntezą laboratoryjną skomplikowanego i nieotrzymanego wcześniej związku naturalnego – *R,R,S*-takamonidyny. Pracując nad drugą częścią badań korzystałam z rotującego reaktora opartego o nierównowagowe systemy rozpuszczalnikowe, a weryfikację postawionej tezy wykonywałam na przykładzie selektywnego przenoszenia związków organicznych za pomocą przenośnika D2EHPA.

4. Wykaz skrótów i pojęć

ACN	Acetonitryl
ASE	Aromatyczna substytucja elektrofilowa
AD-mix α/β	Komercyjnie dostępna mieszanina reagentów do reakcji m. in. asymetrycznego dihydroksylowania Sharplessa. Składa się z $K_2OsO_2(OH)_4$, $K_3Fe(CN)_6$, węglanu potasu oraz chiralnego ligandu: $(DHQ)_2PHAL$ (AD-mix α) lub $(DHQD)_2PHAL$ (AD-mix β)
BINAP	2,2'-Bis-(difenylfosfino)-1,1'-binaftyl
BHT	2,6-Di- <i>tert</i> -butylohydroksytoluen
BRSM (wydajność)	Wydajność obliczona z uwzględnieniem odzyskania nieprzereagowanego substratu (ang. <i>based on recovery of starting material</i>)
<i>N</i>-Cbz	Karbaminian benzylowy
COD	1,5-cyklooktadien
CSA	Kwas kamforosulfonowy
CSF	Funkcja <i>Chemical Scoring Function</i>
D2EHPA	Kwas di-(2-etyloheksylo)fosforowy
DIAD	Azodikarboksylan diizopropylu
DIBAL-H	Wodorek diizobutyloglinu
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropylometyloamina
DMAP	4-Dimetyloaminopirydyna
DMCyA	<i>N,N</i> -dimetyloaminocykloheksan
DMP	Odczynnik Dessa-Martina
DMSO	Dimetylosulfotlenek
DPPB	Bis(difenylfosfino)butan
DPPD	<i>N,N'</i> -Difenyl- <i>p</i> -fenylenodiamina
EDG	Grupa elektronodonorowa
EWG	Grupa elektronoakceptorowa
FGI	Funkcja <i>Functional Group Interconversion</i>
<i>N</i>-Fmoc	Karbaminian 9-fluorenylometylu
HMPA	Heksametylofosforamid
IBX	Kwas 2-jodoksybenzoesowy
Im	Imidazol
IR	Spektroskopia w podczerwieni
LDA	Diizopropylomidek litu
<i>m</i>-CPBA	Kwas <i>meta</i> -chloronadbenzoesowy
MCTS	Heurystyka <i>Monte Carlo Tree Search</i>
MIDA	Kwas <i>N</i> -metyloiminodioctowy
NMO	<i>N</i> -tlenek <i>N</i> -metylomorfoliny
NMP	<i>N</i> -metylopirolidon
NMR	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
PCE	Perchloroetylen
Py	Pirydyna
RAMP	(<i>R</i>)-1-amino-2-metoksymetylopirolidyna
RAPA	Metoda <i>Ring Average Proton Affinity</i>
RSF	Funkcja <i>Reaction Scoring Function</i>
SAMP	(<i>S</i>)-1-amino-2-metoksymetylopirolidyna
SFC	Chromatografia w płynie nadkrytycznym

SPhos Pd G2	Chlorek (2-dicykloheksylofosfino-2,6-dimetoksy-1,1-bifenylo)[2-(2-amino-1,1-bifenylo)] palladu(II); katalizator palladowy Buchwalda drugiej generacji
TBAF	Fluorek tetra- <i>n</i> -butyloamoniowy
TBS	Grupa <i>tert</i> -butyloдимetylosililowa
TEA	Trietyloamina
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Chromatografia cienkowarstwowa
TMHD	2,2,6,6-Tetrametylo-3,5-heptanodion
XPhos G3	Mesyln (2-Dicykloheksylofosfino-2,4,6-triizopropyl-1,1-bifenylo)[2-(2-amino-1,1-bifenylo)] palladu(II); katalizator palladowy Buchwalda trzeciej generacji

5. Wstęp teoretyczny

W maju 1997 rozegrany został słynny mecz szachowy pomiędzy Garrim Kasparovem a Deep Blue – komputerem stworzonym przez IBM. Był to pierwszy przypadek, w którym komputer pokonał w grze w szachy ówczesnego mistrza w tej dziedzinie⁵. Niemal 25 lat później komputery w wielu innych dziedzinach dorównują lub wręcz przewyższają człowieka – mowa tu nie tylko o popularnych zabawkach i grach, takich jak kostka Rubika (obecny rekord ułożenia kostki wynosi 0,38 s dla komputera vs 4,69 s dla człowieka⁶) czy gra w Go (system AlphaGo⁷ pokonał mistrza tej gry, Lee Sedola, w 2016 roku⁸), ale również o całych systemach robotycznych, do których należą autonomiczne samochody⁹ czy roboty Amazona¹⁰, które zastępują ludzkich pracowników przy pracy w magazynach.

5.1. Historyczne programy do analizy retrosyntetycznej

LHASA (Logic and Heuristics Applied to Synthetic Analysis)

Współczesny trend do powszechnej cyfryzacji i automatyzacji nie mógł ominąć dziedziny chemii organicznej. Początki komputerowo-wspomaganej chemii organicznej sięgają lat 60., kiedy E. J. Corey rozpoczął prace nad programem do analizy retrosyntetycznej – LHASA (znanym wówczas jako OCSS)^{11–14}. Pomimo, że do lat sześćdziesiątych z sukcesem wykonano szereg syntez totalnych skomplikowanych związków naturalnych (m.in. witaminy A¹⁵, kortyzonu¹⁶, morfiny¹⁷ czy chlorofilu¹⁸), większość z nich opierała się na głębokim zrozumieniu chemii specyficznej klasy związków, a planowanie syntezy bazowało na podejściu do przodu, tj. zaczynając od dostępnych substratów. Corey zauważył, że nauczenie komputera planowania syntezy organicznej wymaga formalizacji reguł syntezy¹⁹ – zdefiniował on wówczas podejście do problemu retrosyntezy oparte o logiczną analizę, w którym analiza syntetyczna danej cząsteczki rozpoczyna się od końcowego produktu, krok po kroku, bez stawiania jakichkolwiek założeń co do początkowych substratów – metoda ta stała się podstawą do stworzonego przez niego programu¹¹.

Program LHASA składał się z kilku podmodułów. Za graficzną reprezentację struktur chemicznych odpowiadał moduł graficzny, z którego informacja chemiczna była przekazywana do modułu percepcji, modułu strategii i kontroli, modułu manipulacyjnego oraz modułu ewaluacji¹¹. Moduł percepcji rozpoznawał poszczególne grupy funkcyjne, rozgałęzienia łańcuchów węglowych²⁰, pierścienie oraz elementy symetrii^{11,21}. Późniejsze wersje programu posiadały również percepcję stereochemii punktowej na atomach węgla o hybrydyzacji sp³^{13,22} oraz wiązania podwójnego²³, wprowadzona została też percepcja wyższego rzędu, tj. program dodatkowo analizował narysowaną strukturę pod kątem obecności wysoko reaktywnych grup funkcyjnych i ich kombinacji, wzajemnie niekompatybilnych grup funkcyjnych czy niestabilnych tautomerów¹³. Z kolei moduł strategii i kontroli zawierał zbiór heurystyk, które stanowiły kluczową część programu LHASA – były to ogólnie zapisane reguły chemiczne, które komputer stosował do narysowanej struktury, generując w ten sposób jednoetapowe drzewo retrosyntetyczne¹¹. W module tym znajdowały się również strategie wyższego rzędu, które ułatwiały wybór odpowiednich transformacji chemicznych, jednocześnie ograniczając przestrzeń

poszukiwań, co pozwalało w minimalnym choćby stopniu ograniczyć problem eksplozji kombinatorycznej¹³. Na podstawie heurystyk i strategii dobranych w module strategii i kontroli program przechodził do modułu manipulacyjnego, który wykonywał właściwą transformację chemiczną tworząc odpowiedni retron.

Heurystyki oraz strategie zawarte w programie LHASA zostały stworzone przez twórców programu dzięki wnikliwej analizie znanych reakcji organicznych. Należały do nich m. in. heurystyki eliminujące reaktywne grupy funkcyjne na pierwszym etapie analizy, heurystyki pozwalające na maksymalną redukcję ilości pierścieni, a także heurystyki wyższego rzędu: strategie topologiczne (opierające się na koncepcji strategicznych pierścieni²⁴ i koncepcji strategicznych wiązań²²), strategie grup funkcyjnych (m.in. strategie wymiany grupy funkcyjnej – FGI²⁵, i wprowadzenie grupy funkcyjnej – FGA¹³), a także strategie dalekiego zasięgu. Strategie dalekiego zasięgu były całymi sekwencjami transformacji chemicznych odpowiadającymi konkretnym reakcjom chemicznym, do których należały m.in. reakcja Dielsa-Aldera²⁶, anulacja Robinsona²⁷, redukcja Bircha, halolaktonizacja²⁸ czy stereoselektywna synteza olefin²³ (użytkownik wybierał jedną ze strategii dalekiego zasięgu w przypadku, gdy uznał, że będzie ona pasowała do danej struktury²⁹, a następnie samodzielnie oceniał wygenerowane przez nią wyniki¹¹).

Jednym z najważniejszych etapów rozwoju każdego programu do analizy retrosyntetycznej jest ocena, zarówno teoretyczna jak i laboratoryjna, generowanych przez niego rezultatów. Niestety przez cały okres rozwoju programu LHASA nie opublikowano żadnej syntezy wykonanej w laboratorium zgodnie z planem retrosyntetycznym wygenerowanym przez program¹⁴. Co prawda publikacje Coreya zawierają przykłady analiz retrosyntetycznych (m.in. dla alkoholu paczulowego¹¹, walerianonu^{13,27}, erytronolidu B¹³ czy fragmentu modelu taksolu¹⁴), jednak większość z nich jest opisana w sposób bardzo ogólny (tylko w nielicznych przykładach zaproponowane są konkretne warunki reakcji), co znacznie utrudnia ocenę ich stosowalności w praktyce.

Ostatnia publikacja dotycząca programu LHASA ukazała się w roku 1997³⁰. Przyczyn braku kontynuacji prac nad programem jest co najmniej kilka: LHASA w głównej mierze opierała się na wykorzystaniu strategii dalekiego zasięgu, tj. ściśle zdefiniowanych heurystykach opisujących poszczególne, często wieloetapowe, transformacje chemiczne. Aby podejście takie mogło generować poprawne i użyteczne reakcje chemiczne oraz ich sekwencje program powinien posiadać jak najwięcej tego typu heurystyk, jednak im większa jest ich ilość tym więcej rozwiązań jest proponowanych na każdym etapie analizy, co szybko prowadzi do eksplozji kombinatorycznej³¹. Problem ten stanowił poważne ograniczenie rozwoju programu przede wszystkim ze względu na brak odpowiednich rozwiązań sprzętowych i algorytmicznych w tamtym okresie. Z tego powodu ilość strategii wprowadzanych do programu była ograniczona: w roku 1994 w LHASIE obecnych było 2100 transformacji chemicznych, co stanowi jedynie niewielki ułamek znanych reakcji chemicznych (brakowało m. in. reakcji Baylisa-Hillmana)¹⁴. Co więcej, generowane przez program wyniki charakteryzowały się dosyć niskim stopniem szczegółowości jeśli chodzi o warunki reakcji, w wielu przypadkach pomijany był też problem stereo- i regioselektywności reakcji¹⁴. Nie bez znaczenia pozostaje też fakt, że program

wykonywał analizy retrosyntetyczne jedynie pod ciągłą kontrolą użytkownika, tj. sugerował jedynie pojedyncze etapy syntezy, natomiast nie był w stanie generować kilkuetapowych sekwencji reakcji¹⁴. Konieczność manualnego prowadzenia analizy, ograniczona baza transformacji chemicznych oraz wysokie ryzyko eksplozji kombinatorycznej były głównymi czynnikami, z powodu których LHASA nigdy nie zyskała szerokiej akceptacji w środowisku chemików³². Mimo wszystko, podczas rozwoju LHASA opracowany został szereg koncepcji i heurystyk stanowiących podwaliny współczesnych programów do komputerowo-wspomaganej syntezy organicznej, a E. J. Corey w 1990 roku został uhonorowany nagrodą Nobla za swój wkład w rozwój teorii i metodologii syntezy organicznej.

SECS (Simulation and Evaluation of Chemical Syntheses)

Projekt SECS powstał w 1969 roku jako odgałęzienie programu OCSS-LHASA i w pierwotnym założeniu miał służyć opracowaniu zagadnień komputerowo-wspomaganej analizy retrosyntetycznej z zakresu percepcji stereochemii, reprezentacji cząsteczek w przestrzeni trójwymiarowej oraz aspektów sterycznych i elektronowych, których pierwsze wersje programu OCSS-LHASA nie brały pod uwagę. SECS w niedługim czasie ewoluował do osobnego programu do analizy retrosyntetycznej i był rozwijany przez W. T. Wipkego na Uniwersytecie Kalifornijskim we współpracy z firmą Merck³³.

Korzystanie z programu SECS było podobne do używania LHASA – użytkownik rysował strukturę chemiczną celu syntetycznego, która była analizowana przez program pod kątem cech strukturalnych, m.in. obecności grup funkcyjnych, centrów stereogenicznych³⁴ oraz pierścieni³⁵. SECS sprawdzał również odległości pomiędzy poszczególnymi atomami, naprężenia wiązań i zatłoczenie steryczne³⁶. Podstawą działania SECS były reguły reakcji chemicznych zapisywane w języku ALCHEM^{29,37}, a każda z nich zawierała informacje o rdzeniu reakcji, nazwie transformacji, warunkach, a także o zakresie jej stosowalności³³. Późniejsze wersje SECS posiadały również zbiór 60 grup funkcyjnych, do których przypisana była ich odporność na poszczególne warunki reakcji: zasadowe, kwasowe, utleniające, redukcyjne, wysoko- i niskotemperaturowe, protyczne, aprotyczne, nukleofilowe, elektrofilowe, fotochemiczne oraz warunki stosowane w reakcjach związków organometalicznych, a także halogenowania i uwodornienia. W przypadku gdy w cząsteczce znajdowała się grupa funkcyjna wrażliwa na warunki proponowanej transformacji, program sprawdzał możliwość jej zabezpieczenia, a jeśli grupa nie mogła zostać zabezpieczona proponowana transformacja mogła zostać usunięta z dalszej analizy³³. SECS posiadał również dodatkowe strategie retrosyntetyczne, które były dostępne do wyboru dla użytkownika^{33,37} – były to m.in. strategie dążące do szybkiego uproszczenia struktury analizowanej cząsteczki czy strategie poszukiwania symetrii dążące do takiego rozcięcia cząsteczki, aby można było ją zsyntezować z dwóch takich samych prekursorów^{29,33}. Umożliwiały one szybsze poruszanie się w głąb drzewa retrosyntetycznego, co jednak odbywało się kosztem pominięcia części rozwiązań.

Wipke opublikował zaledwie kilka przykładów rezultatów generowanych przez program SECS, m.in. przeprowadzoną w sposób manualny analizę retrosyntetyczną cząsteczki grandisolu³⁷. Tak jak w przypadku LHASA analizy generowane przez SECS są

przedstawione w sposób ogólny i poszczególnym etapom nie są przypisane warunki reakcji, syntezy te nie zostały również zrealizowane w laboratorium. SECS wykonywał analizę retrosyntetyczną w sposób manualny (każdy kolejny etap analizy był kontrolowany przez użytkownika), w związku z czym generowane przez niego plany nie były innowacyjne. Co więcej brakowało w nim wielu ważnych transformacji chemicznych, zdarzało się też, że program generował chemicznie wątpliwe lub wręcz niepoprawne wyniki³⁸.

SYNCHEM/SYNCHEM 2

Z ograniczeń manualnego podejścia do generowania ścieżek retrosyntetycznych zdawał sobie sprawę H. L. Gelernter, który w 1968 roku zaczął pracę nad programem SYNCHEM. Program ten w założeniu miał generować całe ścieżki retrosyntetyczne w sposób automatyczny, bez interwencji ze strony operatora^{39,40}.

Po wprowadzeniu struktury produktu SYNCHEM analizował ją pod kątem obecności grup funkcyjnych i innych cech strukturalnych, tzw. syntemów. Każdemu syntemowi odpowiadał osobny rozdział w bibliotece reakcji, który zawierał schematy reakcji odpowiadające jego syntezie³⁹. Podczas analizy schematy reakcji były testowane pod kątem ich stosowalności do struktury szukanego związku – sprawdzana była między innymi obecność niekompatybilnych grup funkcyjnych i możliwość ich zabezpieczenia³⁹. Następnie program generował zbiór prekursorów, które były oceniane, a najlepsze z nich zostawały poddawane kolejnej iteracji analizy retrosyntetycznej. Analiza była przerywana, gdy ścieżka retrosyntetyczna skończyła się na związku komercyjnie dostępnym z katalogu firmy Sigma Aldrich Chemical Supply Company³⁹. Pomimo, że SYNCHEM posiadał algorytm umożliwiający automatyczne poruszanie się po drzewie retrosyntetycznym, jego działanie pozostawiało wiele do życzenia. Jego podstawę stanowiła bowiem funkcja CPMERIT, która oceniała jedynie strukturalny stopień złożoności wygenerowanego prekursora: im prostszy był wygenerowany prekursor/prekursory, tym lepszą ocenę dostawała dana transformacja. Algorytm podążał więc daną gałęzią drzewa tak długo, jak długo generowane były prekursory o mniejszym stopniu skomplikowania, natomiast gdy wykrył zwiększenie złożoności cząsteczki porzucał daną gałąź i w sposób losowy przechodził do eksploracji kolejnej gałęzi³⁹.

Analizy retrosyntetyczne generowane przez SYNCHEM były dalekie od ideału. Na przykład, w analizie retrosyntetycznej twistanonu³⁹ pojawia się struktura niezgodna z regułą Bredta, proponowana jest reakcja Dielsa-Aldera pomiędzy dwoma nieaktywowanymi substratami, nie jest również uwzględniona stereochemia cząsteczek, która ma niebagatelny wpływ na zajście cyklizacji domykającej ostatni pierścień twistanonu³⁹. Z pomocą SYNCHEM wygenerowano również analizy retrosyntetyczne witaminy A³⁹, eteru metylowego slafradiolu⁴⁰ i kwasu tirandamycynowego⁴⁰ – ta ostatnia miała zostać zweryfikowana w laboratorium Rineharta⁴⁰. Niestety już przy próbach na związku modelowym okazało się, że do wykonania utleniającego otwarcia pierścienia furanu konieczne jest zastosowanie warunków, które nie są kompatybilne z resztą cząsteczki⁴⁰.

Jednym z powodów generowania przez SYNCHEM błędnych analiz była niewielka ilość schematów reakcji obecnych w bazie oraz niekompletna lista heurystyk im przypisana.

Poza tym, na każdym poziomie drzewa retrosyntetycznego rozważany w danym momencie prekursor był uznawany za nowy cel syntetyczny – program nie posiadał percepcji globalnej historii generowanej ścieżki retrosyntetycznej, w związku z czym proponowane przez niego wyniki mogły być poprawne jedynie w kontekście lokalnym³¹. Dodanie większej ilości schematów reakcji bez rozwiązania problemu poruszania się po drzewie i szczegółowego oceniania całych sekwencji reakcji skutkowałoby jedynie przyspieszeniem eksplozji kombinatorycznej i prawdopodobnie nie poprawiłoby w znacznym stopniu generowanych analiz. Z powodu licznych ograniczeń programu SYNCHEM jego autorzy porzucili ten projekt i napisali program na nowo, nadając mu nazwę SYNCHEM2⁴⁰. Prace nad SYNCHEM2 trwały aż do późnych lat dziewięćdziesiątych⁴¹, jednak od 1977 roku nie ukazała się żadna nowa analiza retrosyntetyczna wygenerowana przez SYNCHEM/SYNCHEM2, co pozwala sugerować, że zmiany wprowadzone do programu nie pozwoliły na uzyskanie lepszych niż wcześniej rezultatów.

SYNSUP

Program SYNSUP został zapoczątkowany przez Malcolma Bersohna 1971 roku⁴², a od roku 1984 rozwijany był we współpracy z japońską firmą Sumitomo Chemical Company⁴³. SYNSUP był programem do analizy retrosyntetycznej, który potrafił generować całe ścieżki syntezy z uwzględnieniem stereochemii w oparciu o ekspercką bazę transformacji chemicznych^{43,44}. Do roku 2009 w bazie znajdowało się 5900 reguł reakcji, a każda z nich zawierała opis rdzenia reakcji oraz dodatkowych informacji opisujących daną reakcję: warunków transformacji, odnośników literaturowych, szacunkowej wydajności⁴⁵. Podczas dopasowywania reguły reakcji do konkretnej cząsteczki program sprawdzał regioselektywność i chemoselektywność, a następnie, jeśli nie napotkał konfliktu (np. niekompatybilnych grup funkcyjnych obecnych w cząsteczce), generował strukturę cząsteczki prekursora. Jeżeli cząsteczka ta nie była dostępna komercyjnie i/lub nie spełniała kryteriów końcowych założonych przez użytkownika (np. kryterium maksymalnej masy cząsteczkowej substratów) program traktował ją jako cząstkowy cel syntetyczny i przeprowadzał kolejną iterację analizy. W momencie, w którym SYNSUP skończył analizować daną gałąź drzewa retrosyntetycznego wracał do poprzednich prekursorów i przeprowadza analizę kolejnej gałęzi drzewa⁴⁵.

Wyczerpujące przeszukiwanie drzewa retrosyntetycznego generowało ogromną ilość związków prekursorowych w każdej iteracji, konieczne więc było wprowadzenie metod ukierunkowujących wyszukiwanie. Jedną z nich była klasyfikacja reguł reakcji: największy priorytet posiadały m.in. reakcje enancjoselektywne i diastereoselektywne, a najniższy – reakcje wymiany grup funkcyjnych oraz reakcje degradacji (np. ozonoliza). Poza tym, dla cząsteczki celu syntetycznego oraz cząsteczek prekursorowych liczona była wartość tzw. stopnia złożoności, szacowanego na podstawie ilości poszczególnych elementów strukturalnych. Dla generowanych ścieżek liczona była wartość sumaryczna wartość stopnia złożoności – jeśli przekroczyła ona wartość graniczną, ścieżka taka była usuwana z drzewa jako nieefektywna. Poza tym, przed rozpoczęciem wyszukiwania użytkownik ustalał też tzw. kryteria limitujące (np. limit etapów syntezy, limit ilości reakcji

niestereoselektywnych lub nieregioselektywnych czy limit reakcji tworzących wiązania na peryferiach cząsteczki), które również pozwalały na ograniczenie ilości generowanych wyników⁴⁵. Niestety, nawet z wykorzystaniem wymienionych sposobów redukcji złożoności drzewa retrosyntetycznego program znajdował zastosowanie jedynie do prostych cząsteczek – dla związków o większej złożoności strukturalnej liczba możliwych do wygenerowania ścieżek szybko prowadziła do eksplozji kombinatorycznej. Dopiero w 2009 roku wprowadzono selektywne wyszukiwanie opierające się na identyfikacji strategicznych wiązań, które częściowo rozwiązało ten problem^{44,45}.

Przykłady analiz retrosyntetycznych wygenerowanych przez program SYNSUP ograniczały się głównie do bardzo prostych związków, takich jak 2-chloro-3-hydroksy-5-nitrotoluen⁴⁶, analog sacharyny⁴⁶ czy chloramfenikol⁴⁷. Dopiero w 2006 roku opublikowano analizę retrosyntetyczną dla bardziej skomplikowanej struktury azaspiranu – jest to jednocześnie jedyna analiza zwalidowana eksperymentalnie⁴⁸. Synteza zrealizowana w laboratorium różni się jednak od wygenerowanego przez SYNSUP planu kolejnością etapów, problematyczna okazała się też zaplanowana redukcja grup karbonylowych. Sumaryczna wydajność całej syntezy wyniosła 3%, co jest znacznie gorszym rezultatem niż 25% wydajności syntezy znanej w literaturze⁴⁸.

W 2009 roku twórcy SYNSUP przyznali, że programowi daleko jeszcze do pełni funkcjonalności⁴⁵ – w generowanych ścieżkach często proponowane były niewłaściwe reakcje, program generował podobne do siebie sekwencje reakcji, a w bazie reguł brakowało wielu transformacji⁴⁵ (do roku 2010 znajdowało się w niej niecałe 6 000 reakcji)⁴⁵.

Inne programy do analizy retrosyntetycznej

Opisane programy stanowią jedynie ułamek opracowywanych przez lata narzędzi do analizy retrosyntetycznej. Do pozostałych projektów należą m.in. japońskie programy AIPHOS/KOSP bazujące na automatycznie wygenerowanej bazie reakcji⁴⁹⁻⁵¹, SYNLMA P.Y. Johnsona⁵², SYNGEN J. Hendricksona⁵³, CHIRON S. Hanessiana⁵⁴, IGOR (w którym do opisu reakcji zastosowany został model Dugundjiego-Ugiego)⁵⁵ czy WODCA rozwijana przez J. Gasteigera⁵⁶. Pomimo początkowego entuzjazmu żaden z wymienionych programów nie zyskał popularności i powszechnej stosowalności w środowisku chemików. Zbyt mała moc obliczeniowa ówczesnych komputerów oraz brak odpowiednich rozwiązań algorytmicznych powodowały, że nie mogły one konkurować z człowiekiem i dla chemika organika po prostu nie były użyteczne w codziennej pracy.

5.2. Współczesne narzędzia komputerowo-wspomaganej chemii organicznej

Współcześnie komputerowo-wspomagana chemia organiczna przeżywa swoje odrodzenie. Do głównych kierunków rozwoju tej dziedziny można zaliczyć komputerowo wspomaganą analizę retrosyntetyczną (m.in. program Chematica/Synthia^{TM1,57-59}, sieci neuronowe Seglera-Wallera⁶⁰, model Coleya-Jensena⁶¹, program ASKCOS^{62,63} oraz ICSYNTH⁶⁴ stworzony przez InfoChem⁶⁵ czy ChemPlanner zintegrowany z platformą SciFinder⁶⁶), komputerowo-wspomagane przewidywanie produktu danej reakcji

chemicznej (m.in. sieci neuronowe Aspuru-Guzika⁶⁷, Coleya-Jensena^{68,69}, Schwallera⁷⁰ i Drehera-Doyle⁷¹, model Lee-Schwallera⁷² oraz program ReactionPredictor Baldi'ego⁷³⁻⁷⁵), a także rozwój zautomatyzowanych systemów do syntezy organicznej. Do tych ostatnich zalicza się m.in. zautomatyzowane systemy do syntezy związków polimerycznych (peptydów⁷⁶, oligosacharydów⁷⁷ i oligonukleotydów⁷⁸), systemy do wysokoprzepustowej syntezy określonej klasy związków na małą skalę (przeprowadzanie reakcji w płytkach 24- i 96-dołkowych⁷⁹⁻⁸¹, a nawet synteza w skali nanomolowej pozwalająca na przeprowadzenie tysięcy reakcji w jednej szarzy w płytce⁸² lub w przepływie⁸³), a także systemy zaprojektowane *de novo* na potrzeby konkretnego laboratorium (ASKCOS^{62,63}, Chemputer^{84,85} czy platforma do iteratywnego sprzęgania pochodnych kwasów boronowych⁸⁶).

Sieci neuronowe Seglera-Wallera

Zespół M. P. Wallera opracował program do planowania syntez organicznych oparty o heurystykę Monte Carlo Tree Search (MCTS) i głębokie sieci neuronowe⁶⁰. Model ten wykorzystuje automatycznie wyekstrahowane reguły reakcji do planowania syntez związków organicznych o znaczeniu medycznym. Pomimo, że maszynowa ekstrakcja reguł reakcji jest rozwiązaniem szybkim, posiada niestety szereg ograniczeń – w analizach retrosyntetycznych wygenerowanych przez model Seglera-Wallera brakuje m.in. pełnej informacji o kontekście chemicznym danej transformacji (m.in. o możliwych konfliktach reaktywności), nie jest uwzględniony problem regioselektywności reakcji oraz ignorowana jest stereochemia. Co prawda w przeprowadzonym przez autorów teście, w którym udział wzięli niezależni doktoranci chemii, wykazano, że plany syntetyczne generowane przez program są porównywalne do tych opublikowanych literaturowo. Test ten był jednak przeprowadzony na stosunkowo prostych celach syntetycznych, nieposiadających centrów stereogenicznych, a sami autorzy wnioskuje, że zastosowane przez nich podejście nie stosuje się do bardziej skomplikowanych strukturalnie związków, zwłaszcza produktów naturalnych⁶⁰.

Model Coleya-Jensena

W 2017 roku zespół K. F. Jensena opublikował pracę, w której do analizy retrosyntetycznej wykorzystane zostało podejście oparte o podobieństwo molekularne⁶¹. Opracowany model proponuje cięcia retrosyntetyczne dla zadanego celu syntetycznego w oparciu o analogię do znanych literaturowo reakcji z bazy 40 000 patentów – wykorzystane do tego celu zostały obliczenia podobieństwa pomiędzy produktami oraz pomiędzy reagentami metodą *Morgan2noFeat* i *Tanimoto*. Tak jak w przypadku sieci neuronowych Seglera-Wallera model Coleya-Jensena nie bierze pod uwagę pełnego kontekstu chemicznego danej transformacji – autorzy przyznają, że pracując nad modelem główną motywacją do zastosowania podejścia opartego o podobieństwo molekularne było pytanie: *czy podobne cząsteczki zostały już zsyntezowane?* Niestety, analiza retrosyntetyczna jest problemem dużo bardziej złożonym i miara podobieństw reagentów i produktów danych transformacji chemicznych jest po prostu niewystarczająca do wygenerowania wiarygodnych chemicznie wyników – często wystarczy bowiem zmiana jednego atomu, lub jednej grupy funkcyjnej na drugim końcu cząsteczki aby p

reakcja nie mogła zajść ze względu na np. konflikt reaktywności (bardziej szczegółowa dyskusja tego problemu w suplemencie do ⁵⁹). W istocie, model proponuje i wstępnie ocenia transformacje „jeden krok w tył” od zadanego celu syntetycznego, jednak zaaplikowanie tej metody do pełnego, wieloetapowego procesu analizy retrosyntetycznej wymagałoby ciągłego nadzoru chemika mogącego na każdym etapie wytypować wiarygodne chemicznie transformacje. Jednak nawet w takim wariacie kwestią dyskusyjną pozostawać będzie jakość bazy danych, na podstawie której działa model Coleya-Jensena. 40 000 przykładów reakcji stanowi niewielki ułamek opublikowanych literaturowo transformacji, poza tym bazy patentowe charakteryzują się obecnością większej ilości prostych reakcji – stosowność tego modelu do analizy retrosyntetycznej skomplikowanych produktów naturalnych jest więc wątpliwa.

ASKCOS

Innym programem posiadającym możliwość przeprowadzenia jednoetapowej analizy retrosyntetycznej jest ASKCOS, który w ostatnim czasie został zintegrowany z platformą do zautomatyzowanej syntezy organicznej^{62,63}. ASKCOS bazuje na ponad 160 tysiącach reguł reakcji wyekstrahowanych maszynowo z bazy patentów US Patent Database oraz bazy Reaxys. Algorytm do analizy retrosyntetycznej porównuje strukturę celu syntetycznego z regułami transformacji dostępnymi w bazie i proponuje odpowiednie cięcia retrosyntetyczne jeden krok w tył. Następnie informacja ta przekazywana jest do modułu predykcji produktów reakcji, który sprawdza czy istnieją warunki, które umożliwiają uzyskanie celu syntetycznego z użyciem zaproponowanych substratów. W kolejnym kroku, jeszcze inny moduł sprawdza prawdopodobieństwo zajścia reakcji ubocznych prowadzących do produktów innych niż założony cel syntetyczny. Propozycje analiz generowanych przez program ASKCOS zostały poddane walidacji na przykładzie piętnastu prostych związków chemicznych o znaczeniu medycznym: program wygenerował propozycje planów syntetycznych, na podstawie których opracowano skrypty zawierające procedury eksperymentalne – oprócz informacji o rodzaju proponowanych reagentów skrypty te zostały też manualnie uzupełnione o informacje dotyczące stężeń, ekwiwalentów oraz czasów reakcji, a także o informacje na temat dokładnej konfiguracji modułu robotycznego. Tak przygotowane skrypty zostały wykorzystane do przeprowadzenia właściwej syntezy przy użyciu zautomatyzowanego, przepływowego systemu do syntezy organicznej^{62,63}. Zautomatyzowany system do syntezy ASKCOS składa się z różnego rodzaju modułów (reaktorów i separatorów), które mogą być połączone w różnych konfiguracjach w zależności od celu syntetycznego i wygenerowanego dla niego planu syntezy^{62,63}. Do eksperymentalnego wykonania syntezy wymagana jest jednak ingerencja chemika, który manualnie wprowadza informacje odnośnie planowanych czasów reakcji, a także ekwiwalentów oraz stężeń poszczególnych reagentów^{62,63}.

ASKCOS stanowi przykład systemu, który łączy w sobie etap element komputerowej analizy retrosyntetycznej ze zautomatyzowanym, eksperymentalnym wykonaniem planu syntetycznego. Niemniej jednak, tak jak w przypadku wielu współczesnych programów do analizy retrosyntetycznej, podstawą predykcji ASKCOS są automatycznie

wyeksplorowane reguły reakcji, które często charakteryzują się niewystarczającą szczegółowością (wspomniany już brak kontekstu chemicznego dalekiego zasięgu), a ich stosowalność do analizy skomplikowanych strukturalnie celów syntetycznych jest znacznie ograniczona. W istocie, struktury związków, na przykładach których sprawdzony został program ASKCOS (m.in. aspiryna, seknidazol, lidokaina, diazepam, (*S*)-warfaryna czy safinamid) nie są skomplikowane, a wykonane przez system ASKCOS syntezy opierają się w głównej mierze na prostych reakcjach (m.in. reakcje S_N2, synteza amidów oraz imin). Co prawda program posiada percepcję stereochemii, jednak jedyna reakcja stereoselektywna zrealizowana została w syntezie (*S*)-warfaryny – w przypadku pozostałych związków zawierających centra stereogeniczne, centra te znajdowały się już w początkowych substratach. Ograniczenia stosowalności programu ASKCOS widać wyraźnie przy porównaniu generowanych przez niego analiz retrosyntetycznych do analiz proponowanych przez program Chematica/Synthia™. Porównanie takie opublikowali autorzy programu do analizy retrosyntetycznej ReTReK⁸⁷ – do testów swojego programu jako punkt odniesienia wykorzystali oni zbiór 15 związków, których analizy retrosyntetyczne opublikowane zostały w pracach naszego zespołu^{1,59,88}. Na ten zbiór odniesienia składało się 15 planów syntetycznych wygenerowanych automatycznie przez program Chematica/Synthia™, z których 11 dodatkowo zwalidowaliśmy eksperymentalnie z sukcesem przeprowadzając syntezy w laboratorium – szczegóły znajdują się w publikacjach naszego zespołu^{1,59,88} oraz na **Rys.4** oraz **Rys.5** niniejszej rozprawy. Twórcy programu ReTReK uzyskane przez siebie wyniki porównali z analizami proponowanymi przez ASKCOS dla tych samych związków. Co ciekawe, ani programowi ReTReK ani ASKCOS nie udało się wygenerować analiz retrosyntetycznych dla wszystkich związków – ReTReK wygenerował analizy dla 11 z 15 produktów, natomiast ASKCOS jedynie dla 4. Co więcej, jakość wygenerowanych przez oba programy analiz jest nieporównywalna do tej oferowanej przez program Chematica/Synthia™ – w wielu przypadkach ReTReK i ASKCOS proponują jedynie ostatni etap syntezy, a jeśli już programy te wygenerowały dłuższą niż jednoetapową analizę retrosyntetyczną często zawierała ona znaczące błędy, takie jak choćby konflikty reaktywności grup funkcyjnych, niewykorzystywanie grup ochronnych pomimo konieczności ich użycia czy wręcz używanie nieistniejących transformacji chemicznych. Tak znaczące błędy dyskwalifikują te programy jako użyteczne narzędzia wspomagające syntezę laboratoryjną.

Chemputer

Chemputer jest modułową platformą do syntezy organicznej opracowaną przez zespół L. Cronina, której celem jest realizacja syntezy w sposób zautomatyzowany, ale zbliżony do sposobu przeprowadzenia reakcji przez chemika w standardowym laboratorium syntezy organicznej^{63,84,85}. Platforma ta składa się z podmodułów służących do przeprowadzenia reakcji (szklanych, dwuszyjnych kolb okrągłodennych), ekstrakcji (rozdzielacze z wbudowanym mieszadłem i czujnikiem wykrywającym granicę faz między rozpuszczalnikami), filtracji (lejki Büchnera) oraz odparowania rozpuszczalnika (wyparka próżniowa)⁸⁵. Zintegrowane z podmodułami reakcyjnymi wężyki, pompy strzykawkowe oraz zawory 6-drożne pozwalają na dowolną konfigurację połączeń podmodułów i transfer reagentów między nimi. Platforma pracuje w oparciu o dedykowane oprogramowanie

Chempiler, które generuje instrukcje dla poszczególnych modułów. Z wykorzystaniem platformy Chemputer zrealizowane zostały kilkietapowe syntezy chlorowodoru difenylohydraminy, rufinamidu i sildenafilu⁶³ – w dużej części zostały one wykonane bez interwencji człowieka. Po stronie chemika pozostało przygotowanie procedur eksperymentalnych (ekwiwalenty, czas reakcji itp.) oraz naważanie niektórych stałych substratów⁸⁵. Inna wersja Chemputera została również wykorzystana do poszukiwania nowych reakcji za pomocą uczenia maszynowego^{63,84}. W tej konfiguracji Chemputer wykonywał reakcje chemiczne jednocześnie analizując ich przebieg za pomocą zintegrowanych detektorów: aparatu NMR, spektrometru mas oraz aparatu IR. Mając zbiór początkowych substratów system przeprowadzał eksperymenty, polegające na losowym „zmieszaniu” dwóch lub trzech substratów i sprawdzeniu czy zaszła pomiędzy nimi reakcja chemiczna. Następnie algorytm uczenia maszynowego analizował wyniki i na ich podstawie przewidywał reaktywność pozostałych kombinacji substratów. Kombinacje te zostawały oceniane przez algorytm, następnie najbardziej rokujące były następnie wykonywane przez robota (takie podejście pozwalało na uniknięcie niepotrzebnego sprawdzania niereaktywnych kombinacji), a ich wyniki analizowane i dodawane do bazy danych. Na podstawie zaktualizowanej bazy danych algorytm przechodził do kolejnej iteracji predykcji i typował nowych kandydatów do eksperymentów. Wytypowane przez system reaktywne kombinacje substratów stanowiły podstawę do manualnego przeprowadzenia eksperymentów i odkrycia czterech nowych reakcji⁸⁴.

Platforma do iteratywnego sprzęgania kwasów boronowych

Zespół M. D. Burke’a opracował zautomatyzowany system do iteratywnego, katalizowanego palladem sprzęgania kwasów boronowych zabezpieczonych za pomocą kwasu *N*-metyloiminodioctowego (MIDA)^{86,89,90}. Tak zabezpieczone kwasy boronowe silnie wiążą się z żelazem krzemionkowym gdy eluentem jest mieszanina metanolu i eteru dietylowego, natomiast łatwo jest je usunąć ze złoża zmieniając eluent na THF. Opracowana przez Burke’a platforma do sprzęgania kwasów boronowych składa się z trzech typów modułów, które w każdym cyklu kolejno przeprowadzają reakcję deprotekcji kwasu boronowego, reakcję sprzęgania oraz oczyszczanie produktu. W zautomatyzowanym procesie oczyszczania wykorzystana jest wspomniana już właściwość boranów MIDA do selektywnego wiązania się z żelazem krzemionkowym: surowa mieszanina poreakcyjna jest przenoszona na warstwę żelazem krzemionkowym, a nadmiary reagentów i produkty uboczne reakcji są wymywane za pomocą mieszaniny MeOH/Et₂O. W kolejnym kroku następuje zmiana eluentu na THF, który pozwala na szybką elucję czystego produktu reakcji. Tak oczyszczony związek poddany zostaje kolejnemu cyklowi reakcji (tj. deprotekcji drugiego kwasu boronowego, reakcji sprzęgania i oczyszczaniu na żelazie), a procedura ta jest powtarzana aż do uzyskania finalnego produktu⁸⁶. Metoda z wykorzystaniem boranów MIDA jest odpowiednia do sprzęgania wysoce niestabilnych kwasów boronowych, gdyż zabezpieczenie ich za pomocą MIDA znacznie zwiększa ich trwałość. Co więcej, deprotekcja tak zabezpieczonych kwasów boronowych może odbywać się już podczas reakcji sprzęgania, kiedy to aktywna forma kwasu boronowego uwalniania jest *in situ* w ściśle kontrolowanych warunkach⁹⁰.

Platforma do sprzęgania kwasów boronowych jest systemem, który w dużej mierze został zautomatyzowany. Po stronie chemika pozostaje natomiast naważenie substratów, przeniesienie ich do reaktora (wyglądem zbliżonego do pojemników na żel stosowanych w chromatografii typu *flash*) i umieszczenie reaktora we wnętrzu robota, przy czym procedura ta musi być wykonana manualnie przed każdym następnym cyklem reakcyjnym⁸⁶. Niemniej jednak system ten oferuje duże możliwości syntetyczne – z jego wykorzystaniem, za pomocą iteratywnie przeprowadzanych reakcji sprzęgania, możliwe było zsyntezowanie szeregu związków naturalnych i związków o znaczeniu medycznym w skali miligramowej (m.in. ratanhiny, kwasu β -paranyrowego czy retinalu)⁸⁶. Co więcej, wiele kwasów boronowych jest dostępnych komercyjnie już w postaci estrów z MIDA, co tym bardziej zwiększa atrakcyjność opracowanej platformy do syntezy.

6. Szczegółowy kontekst projektu i badania własne

6.1. Chematica/Synthia™

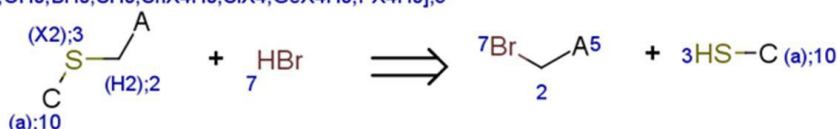
Chematica jest programem do analizy retrosyntetycznej opracowanym przez zespół Prof. Bartosza Grzybowskiego począwszy od roku 2001 i będącego w chwili obecnej jedynym programem retrosyntetycznym stosowanym na szeroką skalę w światowym przemyśle chemicznym (pod auspicjami firmy Sigma-Aldrich/Merck jako Synthia™). W tym rozdziale przedstawię ogólną zasadę działania programu, a następnie przejdę do mojego wkładu w rozwój tego projektu opisując badania własne wchodzące w zakres niniejszej rozprawy doktorskiej. Przy tak złożonym projekcie niemożliwe jest szczegółowe opisanie wszystkich aspektów programu w jednym rozdziale – zainteresowanych szerszym poznaniem tematu zapraszam więc do zapoznania się z publikacjami naszego Zespołu: pracami przeglądowymi na temat programu Chematica^{57,58,91}, publikacjami opisującymi algorytmy wchodzące w skład programu (przewidywanie produktu reakcji Dielsa-Aldera⁹², selekcja opłacalnych i chemicznie zróżnicowanych sekwencji reakcji spośród całego drzewa retrosyntetycznego⁹³, planowanie analiz retrosyntetycznych z ominięciem opatentowanych sekwencji reakcji⁹⁴, kombinacje taktyczne⁸⁸), a także walidacjami eksperymentalnymi programu^{1,59}.

Podstawy działania programu

Chematica jest programem opartym o ekspercką bazę danych, tj. bazę danych złożoną z reguł reakcji zakodowanych przez specjalistów z dziedziny chemii organicznej. Jest to kluczowy aspekt projektu, ponieważ w przeciwieństwie do programów retrosyntetycznych opartych o automatycznie wyekstrahowane reguły reakcji^{60,68} dzięki wiedzy ekspertów reguły zawarte w bazie programu Chematica są wiarygodne, uwzględniają szeroki kontekst chemiczny i umożliwiają generowanie pełnych analiz retrosyntetycznych nie tylko dla prostych związków, ale również dla strukturalnie skomplikowanych produktów naturalnych.

Przykład reguły reakcji programu Chematica przedstawiony jest na **Rys. 1** – reguły zakodowane są w notacji SMILES/SMARTS, która umożliwia przedstawienie struktur chemicznych i całych reakcji w formie alfanumerycznego ciągu znaków, co pozwala na znaczne przyspieszenie obliczeń w stosunku do reguł opartych np. na macierzach. Reguły reakcji zawierają pełną informację na temat stereochemii i regiochemii danej transformacji – na potrzeby zakodowania tak zaawansowanej chemii organicznej opracowane zostały dedykowane moduły STEREOFIX i REGIOFIX, które umożliwiają poprawne przeniesienie informacji stereochemicznej i regiochemicznej pomiędzy produktami a substratami nawet dla związków posiadających wiele centrów stereogenicznych⁵⁹.

[#6,#7H0,F,Cl,OH0,BH0,SH0,SnX4H0,SiX4,GeX4H0,PX4H0];5



name: "Alkylation of Thiols with Primary Bromides"

reaction SMARTS: "[#6,#5&H0,F,Cl,OH0,BH0,SH0,SnX4H0,SiX4,GeX4H0,PX4H0:5][CH2:2][SX2:3][c:10].[Br:7]>>[C:2][[Br:7]][*:5].[S:3][c:10]"

protection_conditions_code : ["WL62", "BW11"]

protections: ["[CX4,c][SX2H]"]

incompatibilities: ["[CX4][Br,I]", "[#6][N+]#[C-]", "[#6]N=C=[O,S]", "[CX4!H0][N+][O-]=O", "[#6]C(=O)[Cl,Br,I]", "[#6][CH]=[SX1]", "[#6]C(=[SX1])[#6]", "[#6][S](=O)(=O)[OH]", "[#6][SX3](=O)[OH]", "[#6]S(=O)[Cl,Br,I]", "[CX4]1[SX2][CX4]1", "[#6][SX2][SX2][#6]", "N=N", "[#6]C(=O)OC(=O)[#6]", "[#6]C(=O)[N]=[N+]=[N-]", "[#6]O[OH]", "[#6]OO[#6]", "Cl=N", "[CX4,c][NX3][NH2]", "[#6]=[N+]=[N-]", "c[N+]#[N]", "[#6][Li]", "[#6][Mg][*]", "[#6][Zn][*]", "[#6][SX2,O]C#N", "[#6][NX2]=O", "[CX3]=[CX2]=O", "[CX3]=[CX3][OH]", "[CX4][O][S](=O)(=O)[#6]", "[CX3]([#6,#1])([#6,#1])=[NX2H]", "[OH][CX4]![O]", "[CX3]=[NX3+][O-]"]

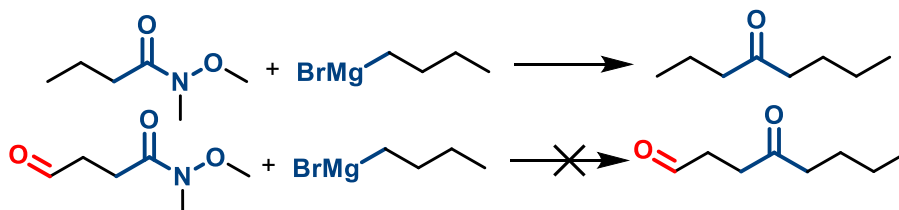
typical reaction conditions: "DIPEA or other base.DCM"

references: "DOI: 10.1021/jm051010j and 10.1039/C4CC08829H (SI, page S3) and 10.1002/cmdc.201100144 and 10.1016/j.bmc.2014.11.002 and 10.1021/jm500827t"

diastereoselective: False

Rys.1. Przykładowa reguła reakcji programu Chematica/Synthia™. Schemat reakcji alkilowania aromatycznych tioli (górny panel) wraz z zapisem tej reguły zawartym w bazie danych programu (dolny panel). Na podstawie ⁵⁹.

W najprostszym ujęciu, reguły reakcji zawierają informację, które wiązania zmieniają się (są tworzone, rozcinane oraz zmieniają krotność) w danej reakcji wraz z informacją na temat ich minimalnego otoczenia chemicznego wymaganego do zajścia reakcji. Tak zdefiniowany *rdzeń reakcji* jest podstawą działania danej reguły, nie jest natomiast wystarczający do poprawnego jej działania. Oprócz określenia rdzenia reakcji zakodowane w programie Chematica reguły zawierają informację o tzw. *szerokim kontekście chemicznym* danej transformacji, tj. warunkach zajścia reakcji (temperaturze, typie rozpuszczalnika itd.) oraz o grupach funkcyjnych niekompatybilnych z daną transformacją i konfliktach reaktywności (np. z reakcją Grignarda niekompatybilne będzie nie tylko większość protycznych grup funkcyjnych takich jak kwasy karboksylowe, alkohole, tiole, ale również inne grupy funkcyjne reagujące z odczynnikami Grignarda, takie jak aldehydy czy ketony). Program rozróżnia również czy dana niekompatybilna grupa funkcyjna może zostać zabezpieczona za pomocą grupy ochronnej. Zakodowanie szerokiego kontekstu chemicznego jest kluczowe dla poprawnego działania danej reguły reakcji, ponieważ pozwala to na precyzyjne określenie czy możliwe będzie eksperymentalne przeprowadzenie danej reakcji dla konkretnego związku (**Rys. 2**).

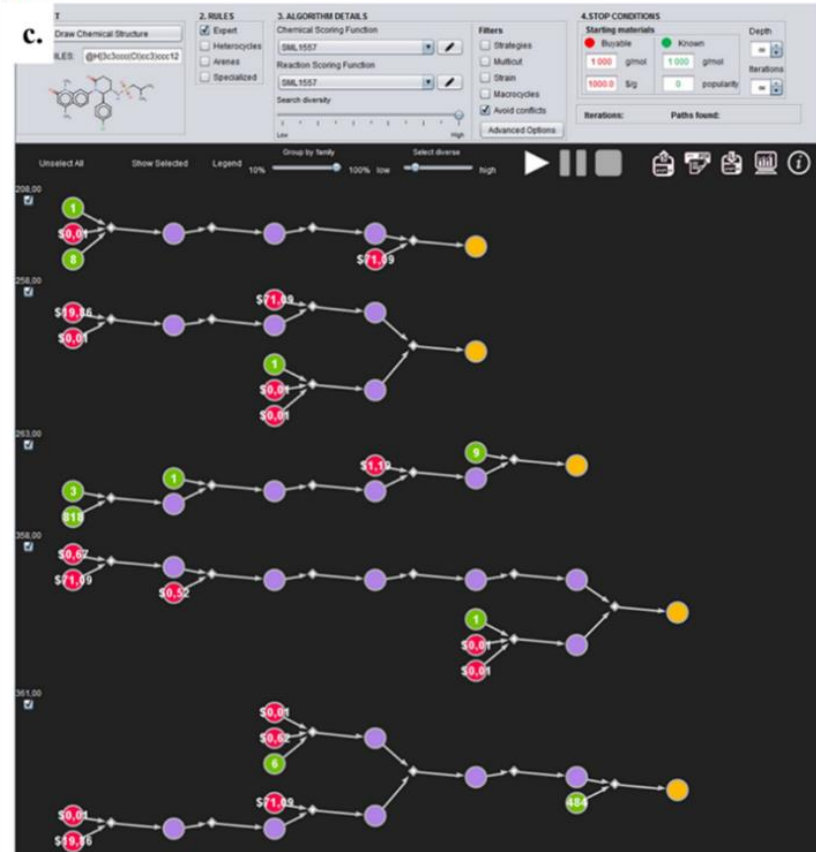
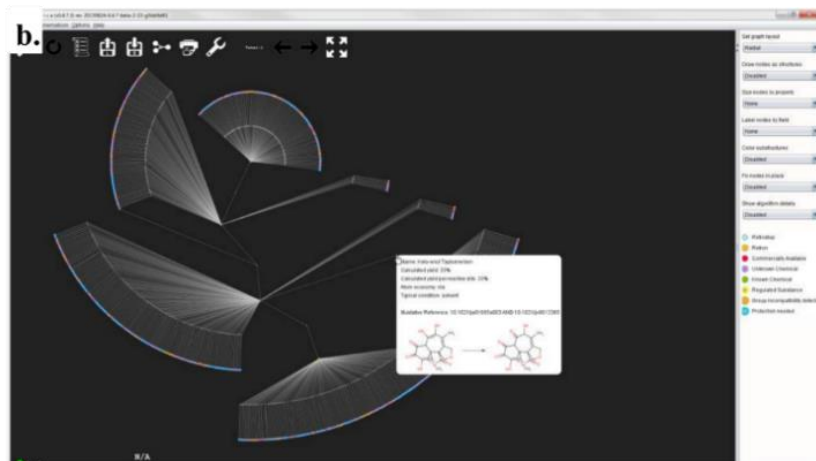
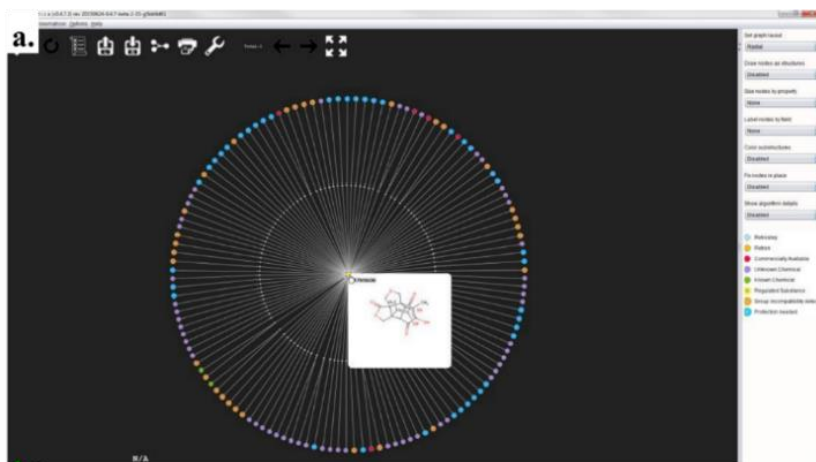


Rys.2. Problem kontekstowości reakcji. Do zajścia reakcji Grignarda z amidami Weinreba niezbędne jest nie tylko określenie ścisłego rdzenia reakcji (zaznaczonego kolorem niebieskim), ale również informacja o kontekście chemicznym transformacji – w dolnym przypadku reakcja nie zajdzie ze względu na obecność grupy aldehydowej w innym miejscu cząsteczki niezdefiniowanym w rdzeniu. Szerszy opis problemu kontekstu chemicznego wraz z przykładami dostępny jest w suplemencie do ⁵⁷ i ⁵⁹. Na podstawie ⁵⁷.

W przypadku niektórych reakcji, nawet najbardziej precyzyjne zakodowanie kontekstu molekularnego nie jest wystarczające do poprawnego działania danej reguły. Do takich reakcji należy m. in. aromatyczna substytucja elektrofilowa (ASE), w przypadku której reakcji ilość możliwych kombinacji grup EWG i EDG w pozycjach *orto*-, *meta*-, *para*- jest tak duża, że nawet dla prostego pierścienia benzenu manualne zakodowanie ich wszystkich jest praktycznie niemożliwe⁵⁹. Z tego powodu dla reakcji ASE typowanie najbardziej reaktywnej pozycji w danym pierścieniu wykonywane jest przy użyciu stałych Hammeta, metody RAPA (*Ring Average Proton Affinity*), modelu Hückela oraz innych reguł empirycznych, przy czym różne metody (lub ich kombinacje) stosowane są dla różnych typów pierścieni⁵⁹. Inną reakcją wymagającą dodatkowych algorytmów jest reakcja Dielsa-Aldera, w której o konformacji powstającego produktu decyduje kombinacja efektów sterycznych i elektronowych podstawników obu substratów. W tym przypadku, oprócz standardowego zapisu rdzenia reakcji i kontekstu molekularnego transformacji, zastosowano uczenie maszynowe metodą lasów losowych, którego podstawą był zbiór kilku tysięcy reakcji Dielsa-Aldera pochodzący z bazy Reaxys^{59,92}.

Automatyczna analiza retrosyntetyczna

Po wprowadzeniu przez użytkownika celu syntetycznego program Chematica sprawdza, które reguły reakcji zawarte w bazie są stosowalne do zadanej struktury, tworząc w ten sposób pierwszą generację prekursorów (pierwszy poziom drzewa retrosyntetycznego, **Rys.3a**). Następnie, dla każdego z tych prekursorów możliwe jest przeprowadzenie kolejnego etapu analizy i wygenerowanie drugiej generacji prekursorów (**Rys.3b**) – proces ten jest kontynuowany aż do uzyskania prostych substratów początkowych. W pierwszej wersji programu wybieranie związków prekursorowych do kolejnych etapów analizy wykonywane było manualnie przez użytkownika, natomiast ze względu na niską efektywność takich poszukiwań (na jeden związek w drzewie retrosyntetycznym przypada około 100 prekursorów⁵⁷, które chemik musi obejrzeć i ocenić) obecnie metoda ta ma znaczenie jedynie historyczne.



Rys.3. Przykłady analizy retrosyntetycznej wykonanych przy pomocy programu Chematica.

a) Pierwsza generacja drzewa retrosyntetycznego dla epikolaktonu wykonana w trybie manualnym. Żółte kółko na środku oznacza cel syntetyczny (epikolakton), a odchodzące od niego kolorowe kółka to poszczególne prekursory, z których możliwe jest zsyntezowanie celu w jednym etapie. Na linii pomiędzy celem syntetycznym a prekursorami znajduje się symbol rombu, którego kliknięcie pokazuje jaka transformacja prowadzi do danego prekursora/prekursorów wraz z informacją o typowych warunkach reakcji i przykładowymi odnośnikami literaturowymi⁵⁷. **b)** Manualna analiza retrosyntetyczna dla epilaktonu⁵⁷. **c)** Automatyczna analiza retrosyntetyczna dla engelheptanoksydu C. Wygenerowane pełne analizy retrosyntetyczne posegregowane są od najlepiej ocenionej (według kryteriów zadanych na początku przez użytkownika)⁵⁹ – program pokazuje tylko kilkanaście najlepszych ścieżek, w rzeczywistości znalezionych ścieżek jest od kilku do kilkunastu tysięcy, w zależności od celu syntetycznego i warunków wyszukiwania. **Oznaczenia kolorów:** czerwony – związek komercyjnie dostępny, zielony – związek znany literaturowo, fioletowy – związek nieznan literaturowo, niebieska obwódka – konieczność zastosowania grupy ochronnej.

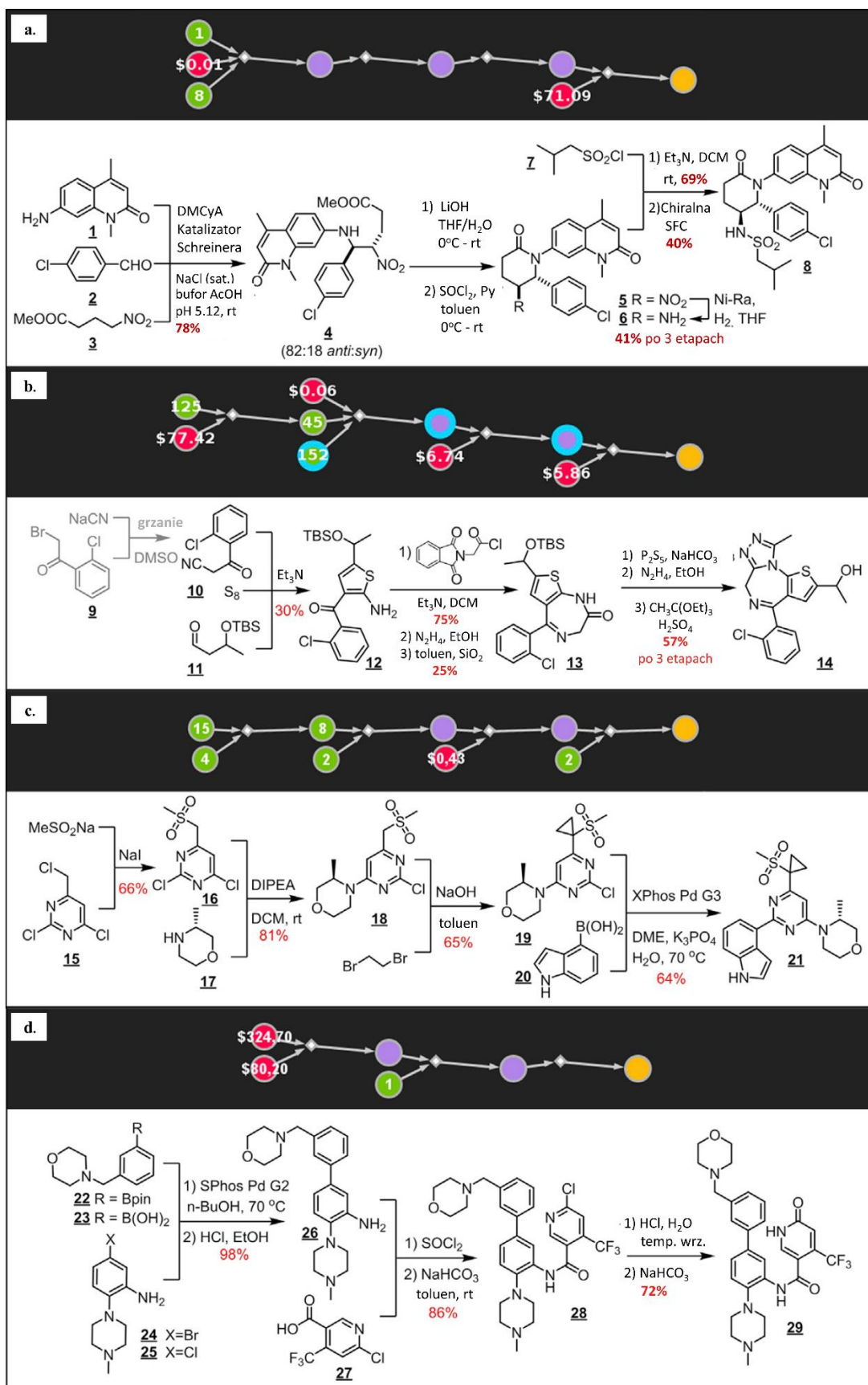
Ze względu na znaczącą ilość reguł reakcji w bazie programu Chematica (obecnie jest ich ponad 100 000), oraz wynikające z niej ogromne drzewa retrosyntetyczne opracowano specjalne algorytmy pozwalające w sposób automatyczny eksplorować najbardziej rokujące gałęzie drzewa i generować pełne analizy retrosyntetyczne bez powodowania eksplozji kombinatorycznej. Do algorytmów tych należą m. in. funkcje oceniające prekursory na każdym etapie, CSF (*Chemical Scoring Function*) oraz funkcje oceniające reakcje prowadzące do tych prekursorów, RSF (*Reaction Scoring Function*)^{57,59}. Do najważniejszych zmiennych funkcji CSF zaliczają się funkcje sprawdzające ilość pierścieni w cząsteczce prekursora (RINGS), ilość centrów stereogenicznych (STEREO), masy (MASS) i złożoność strukturalną celu syntetycznego i jego prekursorów (SMILES_LEN), a także funkcje sprawdzające czy dany prekursor jest znany literaturowo (KNOWN) i czy jest dostępny komercyjnie (BUY). Z kolei do zmiennych funkcji RSF zaliczają się m.in. funkcje rozpoznające konflikty reaktywności (CONFLICT) i transformacje wymagające użycia grup zabezpieczających (PROTECT), a także funkcja promująca reakcje o prawdopodobnie wysokiej wydajności (YIELD)^{57,59}. Podczas automatycznej analizy retrosyntetycznej, w każdej generacji składowe funkcje CSF i RSF są sumowane pozwalając na ocenienie danego prekursora oraz określenie jego *pozycji syntetycznej*. Dzięki temu algorytm ma możliwość eksploracji jedynie rokujących gałęzi drzewa retrosyntetycznego, unikając wyczerpującego przeszukiwania drzewa i związanej z tym eksplozji kombinatorycznej. Co więcej wagi dla poszczególnych zmiennych funkcji CSF i RSF mogą być przypisane manualnie dla każdej analizy retrosyntetycznej, co umożliwia generowanie pełnych ścieżek retrosyntetycznych zgodnie z wymaganiami stawianymi przez użytkownika. Po ocenieniu najbardziej rokujących gałęzi drzewa, program generuje pełne ścieżki retrosyntetyczne prowadzące do zadanego celu syntetycznego, segregując je od najlepszej, tj. najlepiej spełniającej kryteria początkowe (**Rys. 3b**).

Do innych algorytmów programu Chematica ułatwiających efektywną, automatyczną analizę retrosyntetyczną należy m.in. algorytm umożliwiający generowanie sekwencji najbardziej opłacalnych, chemicznie różnorodnych oraz promujący sekwencje konwergentne lub liniowe⁹³, a także algorytm identyfikujący popularne cięcia retrosyntetyczne i unikający ich wykorzystania, co pozwala na generowanie planów syntetycznych omijających opatentowane sekwencje reakcji⁹⁴. Poza tym, program

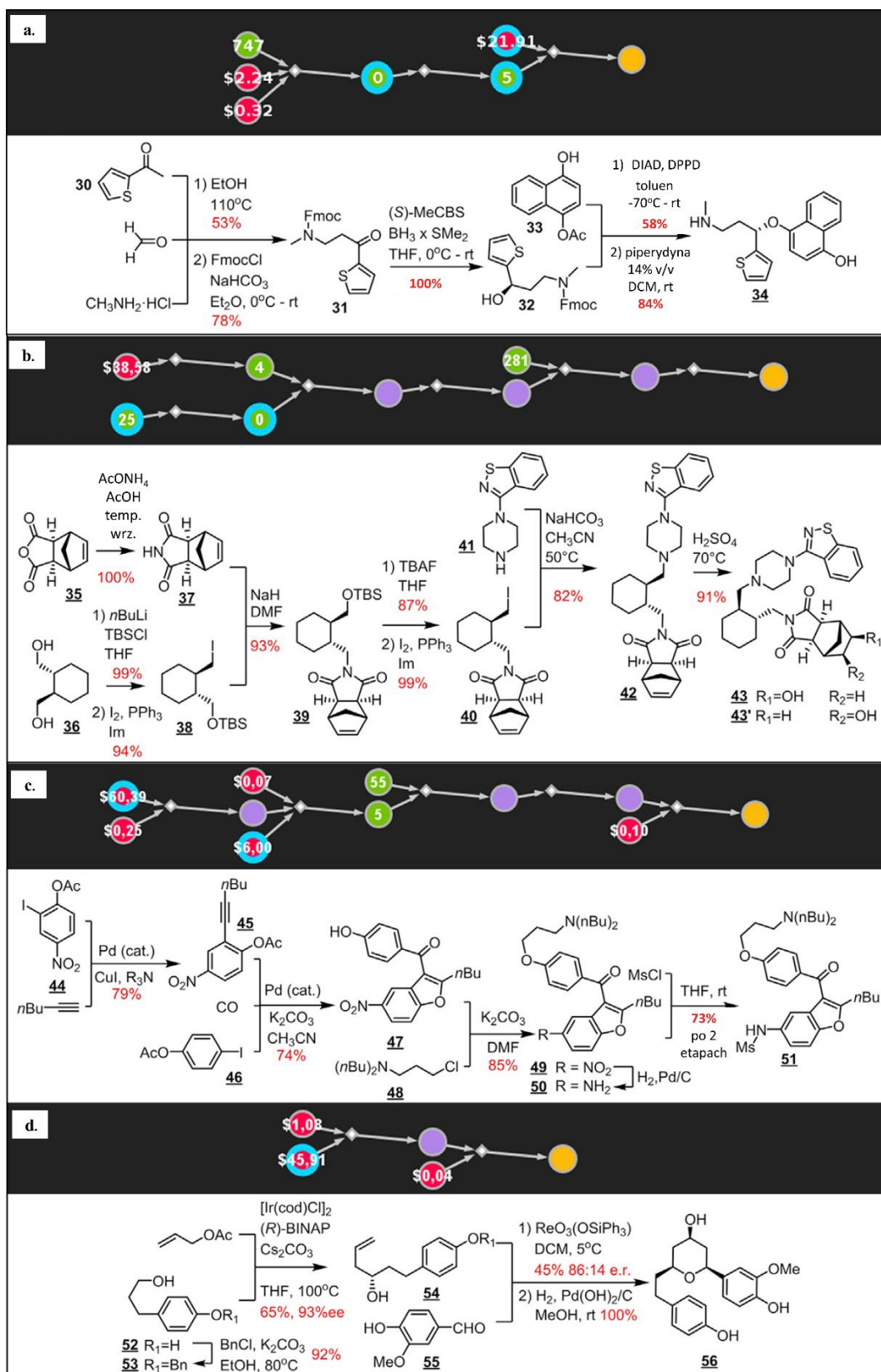
Chematica posiada heurystyki konformacyjne⁵⁷ (eliminujące niemogące istnieć motywy strukturalne, np. zbyt naprężone pierścienie), heurystyki dyskryminujące reaktywne grupy funkcyjne⁵⁷ (pozwalające na uniknięcie „przeciągania” przez kilka etapów syntezy grup takich jak związki magnezoorganiczne, izocyjaniiny czy keteny) czy oraz tzw. kombinacje taktyczne, które pozwalają na znajdowanie rozwiązań pomijanych przy samym użyciu kombinacji funkcji CSF i RSF (są to przede wszystkim sekwencje retrosyntetyczne, w których wymagane jest zwiększenie skomplikowania substratu w celu przeprowadzenia bardziej efektywnej transformacji na następnym etapie, np. wprowadzenie dodatkowego wiązania podwójnego umożliwiającego wykonanie reakcji Dielsa-Aldera)⁸⁸.

Eksperymentalna walidacja programu

Jednym z najważniejszych etapów rozwoju każdego programu do analizy retrosyntetycznej jest sprawdzenie poprawności chemicznej generowanych przez niego rezultatów. Z tego powodu w 2016 roku rozpoczęto współpracę z firmą Merck KGaA/Sigma Aldrich, której celem była ekperymentalna walidacja przewidywań programu Chematica na przykładzie związków o dużym znaczeniu medycznym: inhibitora białek BRD7 i BRD9 (**Rys. 5a**), α -hydroksyetizolamu (**Rys. 5b**), inhibitora kinazy ATR (**Rys. 5c**), prototypowego leku na białaczkę (**Rys. 5d**), (*S*)- α -hydroksyduloksetyny (**Rys. 6a**) oraz 5 β /6 β -hydroksylurazydonu (**Rys. 6b**). Związki te zostały wybrane przez firmę Merck ze względu na ich wysoką wartość rynkową i/lub trudności w syntezie. Pierwsze cztery syntezy zostały wykonane przez chemików Sigmy-Aldrich, natomiast synteza (*S*)- α -hydroksyduloksetyny oraz 5 β /6 β -hydroksylurazydonu zostały wykonane w IChO PAN odpowiednio przez autorkę rozprawy oraz przez dr. inż. Tomasza Kluczniaka. Walidacja ta okazała się ogromnym sukcesem, ponieważ wszystkie syntezy udało się przeprowadzić zgodnie z planami zaproponowanymi przez program Chematica – co więcej okazały się one lepsze i wydajniejsze niż syntezy znane literaturowo^{59,95}. Dodatkowo, równolegle przeprowadzono dwie dodatkowe syntezy: dronedaronu (**Rys. 6c**, wykonana przez dr. inż. Tomasza Kluczniaka⁹⁵ w IChO PAN) oraz engelheptanoksydu C (**Rys. 6d** wykonana przez laboratorium prof. Mrksich’a na Uniwersytecie Northwestern). Również i te syntezy wykonano zgodnie z planami wygenerowanymi przez program Chematica. Sumarycznie, na podstawie przewidywań programu wykonano więc syntezy 8 związków o znaczeniu medycznym – był to pierwszy przypadek w historii, gdy przewidywania programu do analizy retrosyntetycznej nie tylko były możliwe do wykonania w laboratorium, ale syntezy te okazały się również znacząco lepsze od dotychczas znanych^{59,95}. Wyniki tego projektu, oprócz publikacji w czasopiśmie *Chem*⁵⁹, zostały opisane w serii artykułów⁹⁶⁻¹⁰⁰, a sam program został wykupiony przez firmę Merck KGaA/Sigma Aldrich i od tamtej pory znany jest pod komercyjną nazwą *Synthia*TM¹⁰¹.

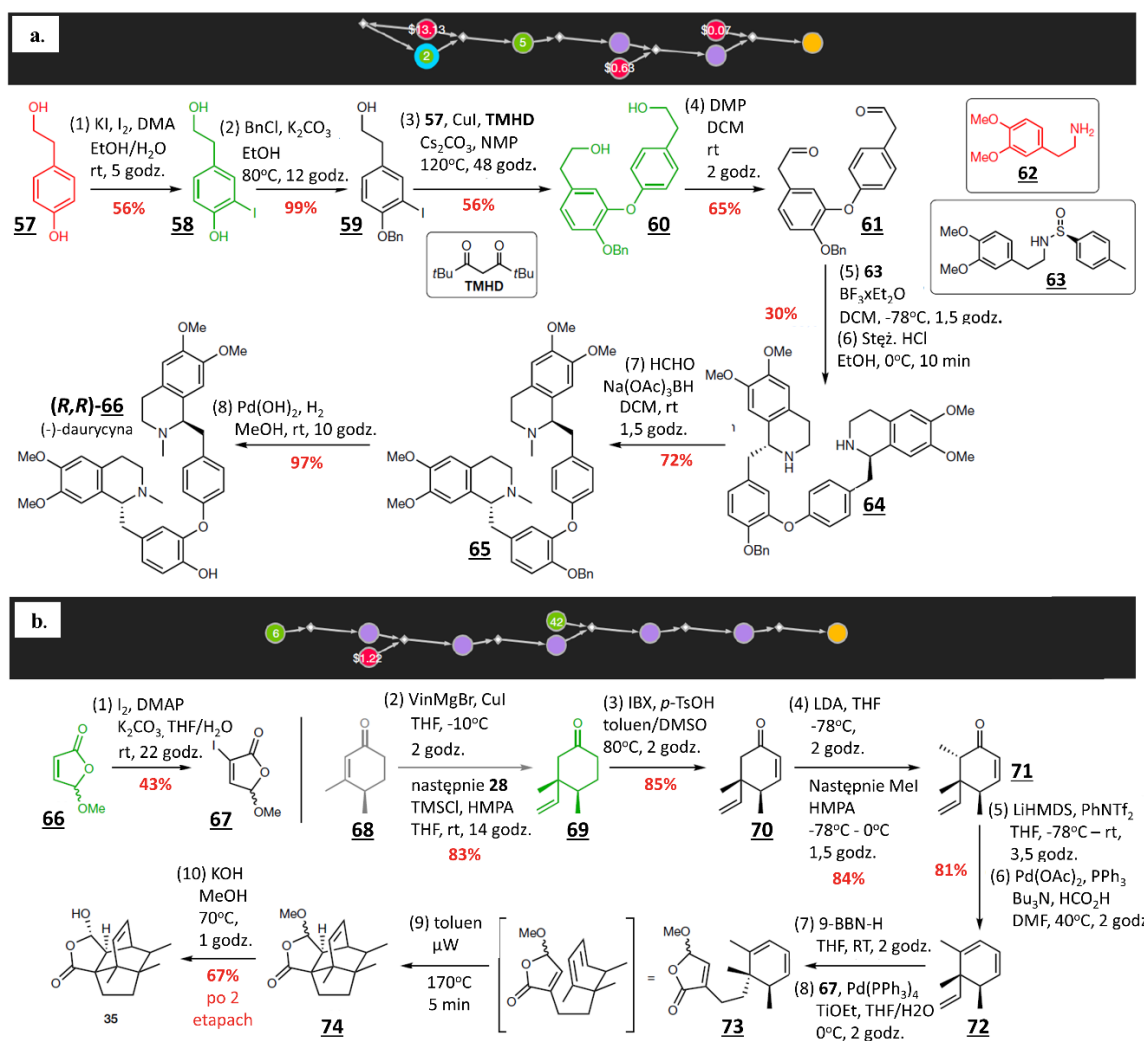


Rys.4. Syntezy związków o znaczeniu medycznym jako eksperymentalna walidacja programu Chematica wykonane przez chemików Milipore-Sigma. a) Synteza inhibitora białek BRD7 i BRD9; b) Synteza α -hydroksyetizolamu c) Synteza inhibitora kinazy ATR; d) Synteza prototypowego leku na białaczkę. Oznaczenia kolorów opisane są w podpisie do Rys. 3. Źródło: ref.⁵⁹.



Rys.5. Syntezy związków o znaczeniu medycznym jako eksperymentalna walidacja programu Chematica wykonane przez doktorantów IChO PAN oraz Uniwersytetu Northwestern. a) Wykonana przez autorkę rozprawy synteza (S)- α -hydroksyduloksetyny; **b)** Synteza 5 β /6 β -hydroksylurazydonu wykonana przez dr. inż. Tomasza Klucznika⁹⁵; **c)** Synteza dronedaronu wykonana przez dr. inż. Tomasza Klucznika⁹⁵; **d)** Synteza engelheptanoksydu C wykonana przez laboratorium prof. Mrksich'a. Źródło: ref.⁵⁹.

Opisane powyżej syntezy związków o znaczeniu medycznym nie były jedyną walidacją eksperymentalną programu Chematica. Od 2018 roku baza programu wciąż była rozwijana (ilość reguł reakcji wzrosła od 50 000 do ponad 100 000), dodano też wiele heurystyk usprawniających jej działanie i umożliwiających jeszcze efektywniejsze generowanie analiz retrosyntetycznych¹. Były to m. in. wspomniane już heurystyki przewidujące produkt reakcji Dielsa-Aldera⁹², heurystyki szacujące wydajność reakcji¹⁰², a także kombinacje taktyczne zawierające całe sekwencje popularnych reakcji⁸⁸. Wprowadzono również funkcje *functional group interconversion* (FGI, zmieniające labilne grupy funkcyjne w grupy bardziej stabilne), oraz *bypasses* (umożliwiające obejście problemu grup niekompatybilnych w przypadku obiecujących transformacji), a także reakcje tandemowe, wykonujące dwie transformacje jednocześnie, co pozwala na generowanie skomplikowanych sekwencji retrosyntetycznych, które nie mogły zostać znalezione za pomocą zwykłej kombinacji funkcji CSF i RSF ze względu na lokalne maksima (tj. lokalny wzrost skomplikowania syntonu w stosunku do retronu)¹. Dopiero po wprowadzeniu tych zmian program był gotowy do jego ostatecznej walidacji eksperymentalnej polegającej na zaplanowaniu analiz retrosyntetycznych skomplikowanych produktów naturalnych, które następnie miały zostać wykonane w laboratorium. Walidacja ta odbyła się na przykładzie trzech produktów naturalnych: (-)-daurycyny (**Rys.6a**), lamellozydyny A (**Rys.6b**) i (*R,R,S*)-takamonidyny (**Rys.7**), z których trzeci w większości wykonany został przez autorkę i wchodzi w zakres niniejszej rozprawy doktorskiej – wszystkie te syntezy zostały wykonane zgodnie z przewidywaniami programu Chematica¹.



Rys.6. Syntezy związków naturalnych jako eksperymentalna walidacja programu Chematica.

a) Synteza totalna (-)-daurycyny wykonana przez zespół prof. Mrksich'a na Uniwersytecie Northwestern; **b)** Synteza totalna lamellozidyne wykonana w IChO PAN przez dr Patrycję Gołębiowską i dr. Oskara Popika. Oznaczenia kolorów opisane są w podpisie do Rys. 3. Na podstawie: ref.¹.

6.1.1. Badania własne – synteza totalna (*R,R,S*)-takamonidyny

(*R,R,S*)-takamonidyna **90** jest związkiem należącym do grupy alkaloidów takmanowych wyizolowanym z rośliny *T. corymbosa*¹⁰³. Na wybór tego związku do walidacji programu Chematica wpływ miały głównie dwa czynniki: po pierwsze, takamonidyna nie została dotychczas zsyntezowana (wyizolowana została dopiero w 2015 roku¹⁰³). Po drugie, pomimo że od najbardziej podobnej cząsteczki z jej rodziny – takamoniny – różni ją tylko obecność dodatkowej trzeciorzędowej grupy hydroksylowej, zmiana ta powoduje, że znane dotychczas strategie syntezy stosowane dla takamoniny nie są aplikowalne dla takamonidyny. Istniejące strategie nie zapewniają bowiem niezbędnej kontroli stereochemicznej, a struktury wykorzystywanych związków przejściowych uniemożliwiają kontrolowane wprowadzenie centrum stereogenicznego, z którym związana jest grupa hydroksylowa – dokładny opis tych strategii znajduje się w suplemencie do [P1] w sekcji S3.2.

Plan syntezy (*R,R,S*)-takamonidyny wygenerowany automatycznie przez program Chematica został przedstawiony na **Rys.7a-b** i składa się z dziesięciu etapów (nie licząc etapów wprowadzania i usuwania grup ochronnych): hydrolizy γ -heksalaktonu, utlenienia grupy hydroksylowej do ketonowej, estryfikacji kwasu karboksylowego, reakcji Wittiga, redukcji estru do aldehydu, asymetrycznego alkirowania Endersa, asymetrycznej reakcji Picteta-Spenglera, wewnątrzcząsteczkowego *N*-acylowania pierścienia indolowego zamykającego czwarty pierścień takamonidyny, asymetrycznego dihydroksylowania Sharplessa oraz wewnątrzcząsteczkowej reakcji alkirowania zamykającej ostatni pierścień. Początkowo wyszukiwanie zakończyło się na 4-metyloheksanal (piąty etap od końca, zielone kółko oznaczone gwiazdką), którego synteza jest znana literaturowo¹⁰⁴, niestety rozpoczyna się od lotnego i drażniącego 2,3-dibromopropenu i charakteryzuje się niską wydajnością. Z tego powodu w programie Chematica wyszukano alternatywną syntezę 4-metylenoheksanal (**Rys. 7c**, od związku **76** do związku **79**) rozpoczynającą się od nietoksycznego, łatwo dostępnego γ -heksalaktonu. Synteza ta została z sukcesem przeprowadzona przez dr. inż. Tomasza Kluczniaka i wraz z asymetrycznym alkirowaniem Endersa wchodzi w skład jego pracy doktorskiej⁹⁵. Kolejne etapy, tj. od usunięcia pomocnika chiralnego RAMP aż do uzyskania cząsteczki (*R,R,S*)-takamonidyny zostały wykonane przez autorkę rozprawy. Szczegółowy opis wykonanych eksperymentów znajduje się w suplemencie do pracy [**P1**], w sekcji **S3**.

a.

Name: Ester hydrolysis
Calculated yield: moderate

Typical conditions: NaOH, MeOH, Reflux

Illustrative Reference: null

👍 👎 Navigate

Name: Parikh-Doering Oxidation
Calculated yield: good

Typical conditions: pyridinium sulfonate, NP3, DMSO

Illustrative Reference: null

👍 👎 Navigate

Name: Synthesis of esters from diazomethanes
Calculated yield: moderate

Typical conditions: THF, rt

Illustrative Reference: 10.1021(ja01377a AND 10.1016/j.tetlet.2013.04.079 AND 10.1016/j.bmcj.2003.12.037 AND 10.1016/j.bmc.2009.10.036

👍 👎 Navigate

Name: Wittig reaction
Calculated yield: moderate

Typical conditions: THF

Illustrative Reference: null

👍 👎 Navigate

Name: Aldehyde Formation
Calculated yield: good

Typical conditions: DIBAL, solvent e.g. DCM

Illustrative Reference: 10.1039/C39940000483 and 10.1039/C3CC478677 and 10.1021(jp0022a054 and 10.1021(jp9934906 and 10.1021(jp902426z

👍 👎 Navigate

Name: Enders SAMPRAMP alkylation
Calculated yield: moderate

Typical conditions: 1) SAMP or RAMP cat, acid, reflux, 2) LDA, 0°C, 3) halide, -100°C to rt, 4) O3, DCM

Illustrative Reference: DOI: 10.1016/S0040-4020(02)00080-7 and 10.1055-2002-34549

👍 👎 Navigate

Name: Stereoselective Pictet-Spengler Reaction
Calculated yield: good

Typical conditions: acid, Chiral catalyst

Illustrative Reference: DOI: 10.1021/ja04259p or DOI: 10.1016/j.tet.2007.05.110 or DOI: 10.1002/anie.201008071

👍 👎 Navigate

Name: N-acylation of aromatic nitrogen
Calculated yield: good

Typical conditions: 1) (COCl)2, 2) Et3N, DMAP

Illustrative Reference: 10.1016/j.tetlet.2013.04.010

👍 👎 Navigate

Name: Sharpless Asymmetric Dihydroxylation
Calculated yield: moderate

Typical conditions: AD-mix alpha, OsO4, solvent

Illustrative Reference: DOI: 10.1021/ja00214a053 and 10.1021(jp00036a003

👍 👎 Navigate

Name: Alkylation Secondary Amines
Calculated yield: moderate

Typical conditions: O(PPh3)2, Ru(p-cymene)CQ2, MW, heat

Illustrative Reference: 10.1021/jp102521a

👍 👎 Navigate

Enders SAMPRAMP alkylation

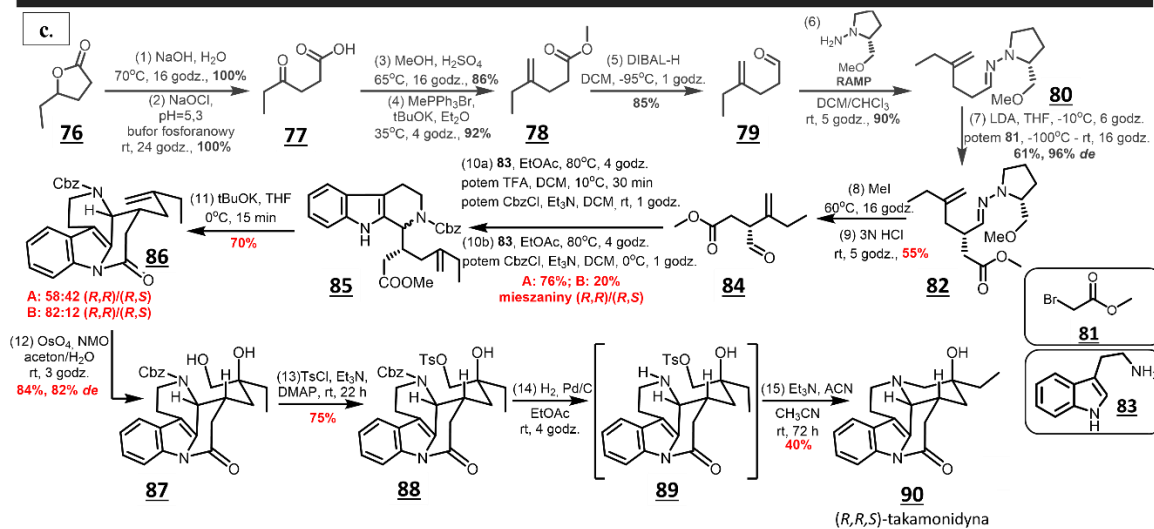
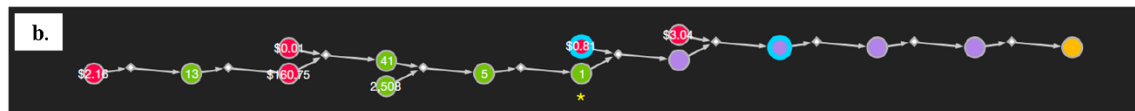
Typical conditions for this reaction suggest the following warnings:

Image	Classification	Protecting Groups
	carboxyls	1. Methyl Ester
		2. Benzyl Ester

N-acylation of aromatic nitrogen

Typical conditions for this reaction suggest the following warnings:

Image	Classification	Protecting Groups
	amines	1. t-Butyl Carbamate
		2. N-Benzoyl
		3. N-Dimethylthiophosphinyl

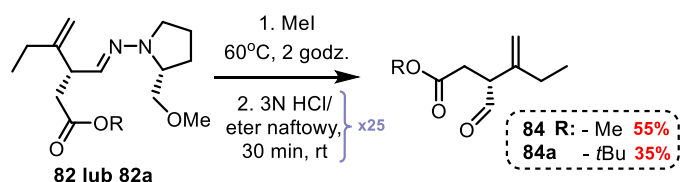


Rys.7. Automatyczna analiza retrosyntezy związku naturalnego – (*R,R,S*)-takamonidyny – wygenerowana przez program Chematica oraz jego walidacja eksperymentalna. a,b) Plan syntetyczny dla (*R,R,S*)-takamonidyny wygenerowany przez program wraz z podglądem poszczególnych reakcji proponowanych na każdym z etapów; c) Eksperymentalna walidacja planu wykonana w laboratorium. Synteza począwszy od związku **82 wykonana została przez autorkę rozprawy. Oznaczenia kolorów opisane są w podpisie do **Rys. 3**. Na podstawie: [P1].**

Synteza aldehydu **84** – usunięcie pomocnika chiralnego RAMP

Pierwszym etapem syntezy totalnej (*R,R,S*)-takamonidyny, który wchodzi w zakres niniejszej pracy doktorskiej jest przeprowadzona przeze mnie reakcja usunięcia pomocnika chiralnego RAMP z produktów **82/82a** (związki oznaczone literą „a” oznaczają wariant z estrem *t*-butylowym zamiast metylowym, gdyż na tym etapie syntezy nie było jeszcze wiadome, który z nich okaże się lepszy na etapie reakcji Pictera-Spenglera i późniejszej cyklizacji czwartego pierścienia (*R,R,S*)-takamonidyny).

Podczas prac nad tym etapem przetestowałam różne metody usunięcia pomocnika chiralnego RAMP ze związków **82/82a**, w tym standardową procedurę usunięcia pomocnika SAMP/RAMP Endersa (przeprowadzenie związku w czwartorzędową sól amoniową poprzez ogrzewanie w jodku metylu oraz hydroliza powstałej soli w mieszaninie eteru naftowego i HCl)¹⁰⁵ oraz ozonolizę. Ze względu na uzyskiwanie niskich wydajności reakcji oraz powstawanie trudnych do usunięcia produktów ubocznych, żadna z testowanych przeze mnie metod literaturowych nie nadawała się jednak do wykorzystania w syntezie totalnej syntezy (*R,R,S*)-takamonidyny. Z tego powodu opracowałam zmodyfikowaną procedurę usunięcia pomocnika RAMP bazującą na metodologii Endersa – największym wyzwaniem okazała się nie sama reakcja usuwania pomocnika chiralnego, ale wydajna izolacja powstającego aldehydu **84/84a**. Przetestowałam różne metody izolacji **84/84a**, m. in. ekstrakcję z użyciem bardziej polarnych rozpuszczalników (np. DCM) czy destylację pod zmniejszonym ciśnieniem, jednak największą wydajność uzyskałam przeprowadzając wieloetapową ekstrakcję z wykorzystaniem eteru naftowego. W opracowanej przeze mnie metodzie podczas etapu hydrolizy czwartorzędowej soli amoniowej, co 30 minut wymieniałam warstwę eteru naftowego używanego do ekstrakcji – procedurę tę kontynuowałam do momentu, do którego aldehyd **84/84a** ulegał ekstrakcji lub ekstrakcji zaczynały ulegać produkty uboczne reakcji (kontrola TLC). Po zatężeniu wszystkich frakcji eterowych i dodatkowym oczyszczeniu produktów na kolumnie chromatograficznej uzyskiwałam aldehydy **84/84a** z wydajnością 35%-55% (w zależności m.in. od rodzaju estru w substracie). Sumarycznie podczas każdego eksperymentu wykonywałam od kilku do kilkunastu (maksymalnie 25) cykli ekstrakcyjnych – liczba cykli ekstrakcyjnych zależała przede wszystkim od użytego estru oraz skali reakcji (**Rys. 8**).

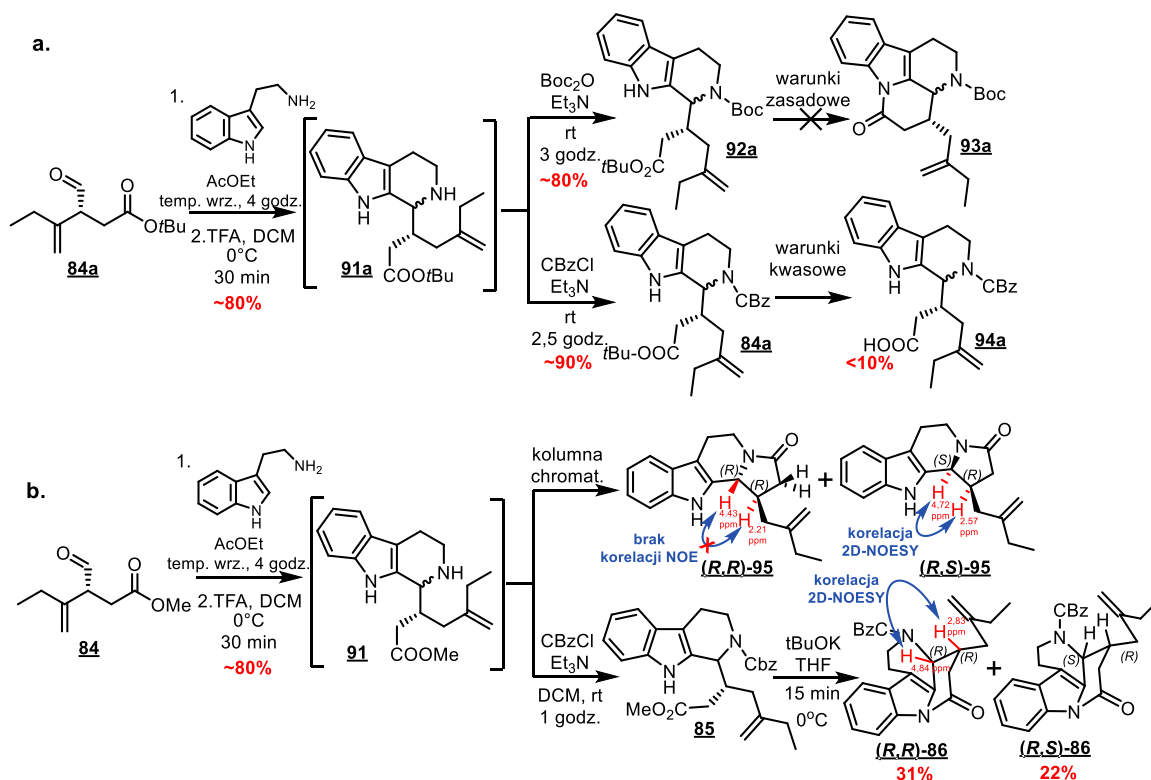


Rys. 8. Zmodyfikowana przez autorkę rozprawy procedura Endersa – umożliwiła ona uzyskanie aldehydu **84/84a z wydajnością izolacyjną 55% dla estru metylowego i 35% dla estru *t*-butylowego.**

Reakcja Picteta-Spenglera

Jednym z najważniejszych etapów syntezy totalnej (*R,R,S*)-takamonidyny jest reakcja Picteta-Spenglera. Początkowo przeprowadzając eksperymenty z wykorzystaniem tryptaminy **83** i aldehydów **84/84a** opierałam się na warunkach literaturowych (TFA, temperatura pokojowa lub niższa)^{106,107}, niestety pomimo przetestowania szeregu rozpuszczalników, oraz dodatku sit molekularnych za każdym razem obserwowałam brak konwersji. Z tego powodu zdecydowałam się na przeprowadzenie tej reakcji w dwóch etapach: (i) synteza iminy (tryptamina, aldehyd **84** lub **84a**, AcOEt 77°C, sita molekularne 3Å) oraz (ii) reakcja cyklizacji (TFA, DCM, 0°C). W ten sposób uzyskiwałam mieszaninę diastereoizomerów **91** lub **91a** z wydajnością ok. 80% (**Rys. 9**).

Początkowo reakcja Picteta-Spenglera prowadzona była dla estru *tert*-butylowego **84a** ze względu na wyższą wydajność jego wprowadzenia w reakcji asymetrycznego alkilowania jak i przewidywaną większą diastereoselektywność reakcji Picteta-Spenglera w obecności sterycznej grupy *tert*-butylowej w cząsteczce. Przeprowadziwszy reakcję Picteta-Spenglera w wariacie racemicznym z użyciem aldehydu **84a** uzyskałam mieszaninę diastereoizomerów **91a** (**Rys 9a.**), które poddałam reakcji z bezwodnikiem Boc₂O w obecności Et₃N uzyskując mieszaninę diastereoizomerów **92a**. Mieszaninę tę poddałam próbom wewnątrzcząsteczkowego *N*-acylowania pierścienia indolowego w warunkach zasadowych – za każdym razem obserwowałam jednak brak konwersji (**Rys 9a**, górny schemat). Udało mi się natomiast przeprowadzić reakcję hydrolizy estru *tert*-butylowego w związku **84a** do kwasu karboksylowego przy użyciu TFA (**Rys 9a**, dolny schemat), jednak niska wydajność tej reakcji (<10%) uniemożliwiła jej efektywne wykorzystanie w syntezie (*R,R,S*)-takamonidyny.



Rys. 9. Reakcja Picteta-Spenglera: **a.** Reakcja Picteta-Spenglera ze związkiem **84a**; **b.** Reakcja Picteta-Spenglera ze związkiem **84** – zmiana estru *t*-butylowego na metylowy powodowała spontaniczną cyklizację do pierścienia pięcioczłonowego. Aby temu zapobiec opracowałam nową procedurę reakcji Picteta-Spenglera, w której *in situ* przeprowadziłam kolejny etap syntezy.

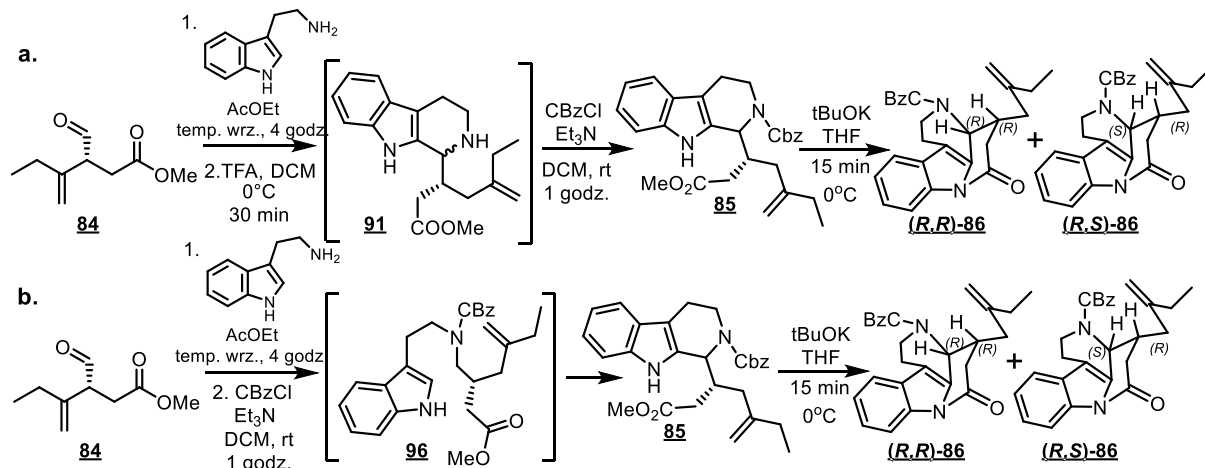
Z powodu trudności w przeprowadzeniu reakcji wewnątrzcząsteczkowego *N*-acylowania pierścienia indolowego w obecności grupy *tert*-butylowej zdecydowałam się na zmianę substratu z **84a** na substrat **84** posiadający ester metylowy (był on proponowany przez program Chematica, **Rys.7a**, najniższy panel). Substrat ten poddałam reakcji Picteta-Spenglera w sposób analogiczny do reakcji z pochodną *tert*-butylową (**Rys. 9b**). Pomimo, że otrzymana mieszanina diastereoizomerów **91** na płytce TLC rozdzieliła się na dwie osobne frakcje, po tym etapie nie było możliwe rozdzielenie izomerów za pomocą chromatografii kolumnowej, gdyż związki te ulegały spontanicznej cyklizacji do 5-członowego pierścienia laktamu **95**. Wykorzystując tę niespodziewaną reakcję udało mi się natomiast określić, któremu z diastereoizomerów (***R,R***-**95**/***R,S***-**95**) odpowiadają sygnały z TLC mieszaniny związków **91** (**Rys. 9b**, górny schemat oraz Supplement do [P1], sekcja S3).

W celu przeprowadzenia kolejnych etapów syntezy totalnej, opracowałam nową procedurę reakcji polegającą na wprowadzeniu grupy zabezpieczającej CBz bez izolacji produktu **91** (**Rys.9b**, dolny schemat). Otrzymany związek **85** jest mieszaniną diastereoizomerów, której nie da się rozdzielić za pomocą chromatografii kolumnowej. Z tego powodu mieszaninę **85** poddałam *in situ* reakcji wewnątrzcząsteczkowego *N*-acylowania pierścienia indolowego. W odróżnieniu od pochodnych *tert*-butylowych **92a** i **84a**, reakcję z pochodną metylową **85** udało mi się przeprowadzić szybko, w łagodnych warunkach i z dobrą wydajnością (warunki po optymalizacji: *t*BuOK, THF, 0°C, 15 min; (***R,R***-**86**: 31%, (***R,S***-**86**: 22%, wydajności liczone po czterech etapach syntezy, tj. od

substratu **84**), tym samym zamykając czwarty pierścień (*R,R,S*)-takamonidyny (**Rys. 9b**, górny schemat). Struktury obydwu izomerów potwierdziłam za pomocą dwuwymiarowych eksperymentów NMR (COSY, HSQCAD, HMBCAD). Dodatkowo, dla izomeru (*R,R*)-**86** wykonano analizę 2D-NOESY. Wszystkie szczegóły dotyczące analiz związków w syntezie totalnej (*R,R,S*)-takamonidyny znajdują się w Suplemencie do [P1], sekcja P3.

Diastereo selektywny wariant reakcji Picteta-Spenglera

Pracując nad reakcją Picteta-Spenglera w wariacie racemicznym zauważyłam, że diastereoizomery (*R,R*)-**86** oraz (*R,S*)-**86** otrzymywałam w stosunkach różnych od 1:1 pomimo braku dodatku zewnętrznego czynnika chiralnego. Wzajemny stosunek tych diastereoizomerów zależał od ilości dodawanego TFA oraz temperatury reakcji (najważniejsze wyniki przedstawione są w Suplemencie do [P1] (Tabela na stronie S-73, procedura cyklizacji-rotekcji). Najkorzystniejszy stosunek izomerów ((*R,R*)-**86**: (*R,S*)-**86** = **62:38**) uzyskałam przy użyciu 2,5 ekwiwalentów TFA oraz 5°C. Ponieważ w tym wariacie reakcji Picteta-Spenglera w środowisku reakcji nie występowało zewnętrzne źródło chiralności zaobserwowana przeze mnie diastereo selektywność reakcji zależy najprawdopodobniej od centrum stereogenicznego znajdującego się w substracie **84** – w istocie, w literaturze znane są przypadki, w których w reakcji Picteta-Spenglera centrum stereogeniczne obecne w cząsteczce aldehydowego substratu promuje selektywne powstawanie drugiego centrum^{107,108}.



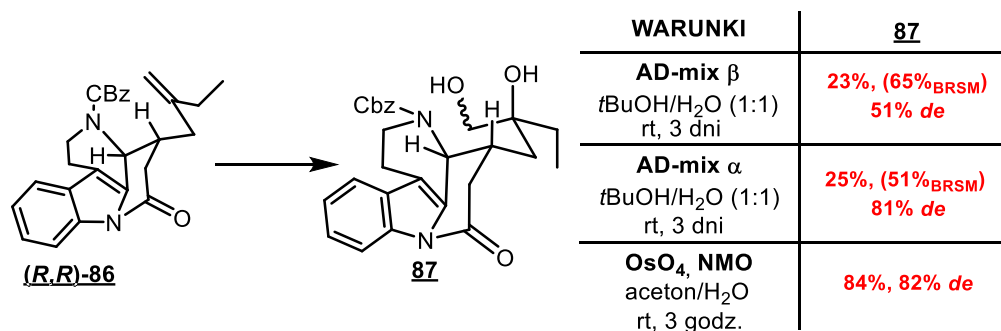
Rys. 10. Opracowane przez autorkę rozprawy procedury reakcji Picteta-Spenglera: a. Procedura cyklizacji-rotekcji; **b.** Procedura protekcji-cyklizacji.

Sprawdzając różne warianty reakcji Picteta-Spenglera zmieniałam również kolejność etapów w przeprowadzanej sekwencji reakcji (**Rys.10b**). W trakcie eksperymentów zaobserwowałam, że powstająca w reakcji imina cyklizuje do związku **91** jedynie po dodaniu kwasu trifluorooctowego. Okazało się również możliwe przeprowadzenie reakcji w wariacie *N*-acyloiminiowym poprzez dodanie CBzCl do mieszaniny poreakcyjnej – powstający w warunkach zasadowych związek **96** spontanicznie ulega cyklizacji dając mieszaninę diastereoizomerów **85** bez użycia kwasu. Po przeprowadzeniu kolejnego etapu syntezy okazało się, że stosunek ilościowy diastereoizomerów (*R,R*)-**86** i (*R,S*)-**86** zależy od temperatury, w której zachodzi drugi i trzeci etap sekwencji (t.j. reakcja z CBzCl i spontaniczna cyklizacja do związku **85**). Największy nadmiar diastereomeryczny ((*R,R*)-**86** : (*R,S*)-**86** = **82 : 18**) uzyskałam po obniżeniu temperatury tej reakcji do 0°C – niestety

zmiana ta skutkowała też spadkiem wydajności do 11% (suplement do [P1], tabela na stronie S-73, procedura protekcji-cyklizacji).

Asymetryczne dihydroksylowanie Sharplessa

Kolejnym wykonanym przeze mnie etapem syntezy totalnej takamidoniny było asymetryczne dihydroksylowanie wiązania egzometylenowego produktu (**R,R**)-**86** metodą Sharplessa – reakcję tę przeprowadziłam w kilku wariantach: z użyciem komercyjnego odczynnika AD-mix (wariant z wykorzystaniem AD-mix α i AD-mix β) oraz bez dodatku chiralnego ligandu (**Rys. 11**).

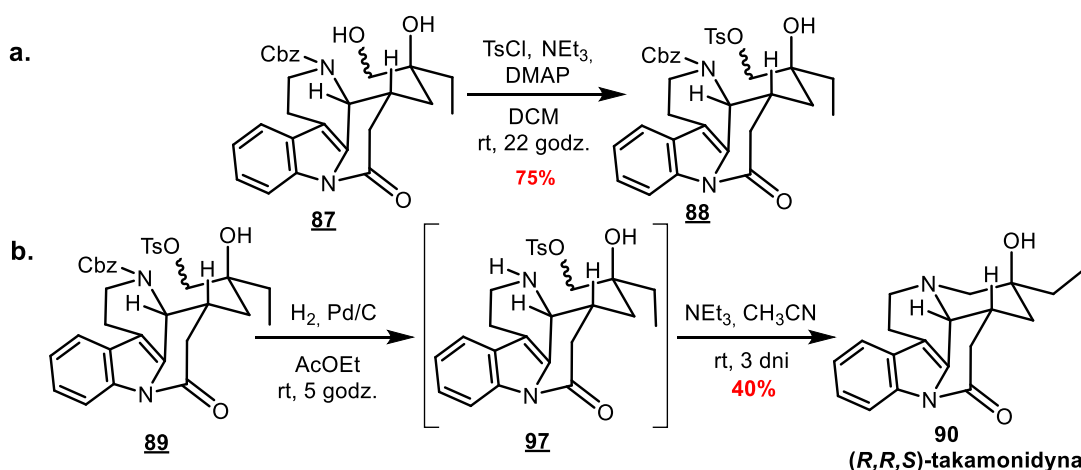


Rys. 11. Asymetryczne dihydroksylowanie metodą Sharplessa z wykorzystaniem: a. AD-mix α , b. AD-mix β oraz (c) bez dodatku chiralnego ligandu.

W przypadku użycia komercyjnych odczynników AD-mix α/β , niezależnie od użytego rozpuszczalnika oraz czasu reakcji wydajność dihydroksylowania była stosunkowo niska – najlepsze rezultaty uzyskałam dla mieszaniny rozpuszczalników *t*BuOH/H₂O (1:1) – po trzech dniach wydajność wyizolowanej mieszaniny diastereoizomerów **87** wynosiła 23% (65%_{BRSM}) dla AD-mix β oraz 25% (51%_{BRSM}) dla AD-mix α . Nadmiar diastereomeryczny produktu (**R,R,S**)-**87** wynosił 51%*de* w przypadku użycia AD-mix β oraz 81%*de* w przypadku AD-mix α . W celu otrzymania mieszaniny racemicznej diastereoizomerów **87** i określenia nadmiaru diastereomerycznego reakcji dihydroksylowania przy użyciu AD-mix α i β , przeprowadziłam również eksperyment bez dodatku chiralnego ligandu, tj. z użyciem OsO₄ i NMO. Co ciekawe, w tych warunkach uzyskałam dużo wyższą wydajność reakcji (84%) przy dużo krótszym czasie (3 godziny zamiast 3 dni) – wynika to prawdopodobnie z lepszej rozpuszczalności reagentów w mieszaninie rozpuszczalników aceton/H₂O niż w *t*BuOH/H₂O. Okazało się wówczas również, że w wariacie bez dodatku zewnętrznego czynnika chiralnego zaobserwowałam wysoki nadmiar diastereomeryczny produktu (**R,R,S**)-**86**, który wynosił 82%*de*. Wyniki te wyraźnie wskazują na fakt, że w przypadku dihydroksylowania substratu (**R,R**)-**86** większy wpływ na stereochemię powstającego centrum ma nie użyty chiralny ligand, a dwa centra stereogeniczne (**R,R**), które obecne są w substracie. Obserwacje te potwierdzają obliczenia kwantowo-mechaniczne wykonane przez dr. Rafała Roszaka – wynika z nich, że koordynacja OsO₄ do wiązania podwójnego od strony *si* jest energetycznie faworyzowana w stosunku do strony *re* o 1,6 kcal/mol (szczegóły obliczeń znajdują się w Suplemencie do [P1] w sekcji S3).

Końcowe etapy syntezy (*R,R,S*)-takamonidyny

Po uzyskaniu związku (*R,R,S*)-**87** mogłam przejść do przeprowadzenia końcowych etapów syntezy (*R,R,S*)-takamonidyny. Następny etap syntezy polegał na wprowadzeniu grupy tosyłowej na pierwszorzędową grupę hydroksylową – reakcję tę przeprowadziłam z użyciem TsCl, trietyloaminy oraz DMAP uzyskując produkt **88** z wydajnością 75% (**Rys. 12a**). W ostatnich dwóch etapach przeprowadziłam usunięcie grupy zabezpieczającej aminę – karbaminian benzyłowy usunęłam z cząsteczki przy użyciu wodoru w obecności Pd/C z wydajnością 44% (**Rys. 12b**) i bez oczyszczania produktu **97** przeprowadziłam reakcję wewnątrzcząsteczkowego alkilowania zamykając ostatni pierścień (*R,R,S*)-takamonidyny. Reakcję tę wykonałam z użyciem trietyloaminy uzyskując produkt – (*R,R,S*)-takamonidynę – z wydajnością 40% po dwóch etapach. Wykonane widma 1D NMR, 2D NMR, IR, UV-VIS, HRMS oraz pomiar skręcalności optycznej końcowego produktu były całkowicie zgodne z danymi literaturowymi¹⁰³ dla (*R,R,S*)-takamonidyny wyizolowanej z *T. corymbosa*.



Rys. 12. Końcowe etapy syntezy (*R,R,S*)-takamonidyny, a. Reakcja tosyłowania pierwszorzędowej grupy hydroksylowej; **b.** Deprotekcja aminy przy użyciu wodoru w obecności Pd/C oraz reakcja wewnątrzcząsteczkowego alkilowania zamykająca ostatni pierścień (*R,R,S*)-takamonidyny.

Podsumowując, w ramach niniejszej pracy doktorskiej skutecznie przeprowadziłam syntezę totalną (*R,R,S*)-takamonidyny począwszy od reakcji usunięcia pomocnika chiralnego typu RAMP uzyskując związek **83**, aż do uzyskania końcowego produktu **90**, a wszystkie przeprowadzone przeze mnie etapy były w pełni zgodne z przewidywaniami wygenerowanymi przez program Chematica/Synthia™. Całość syntezy totalnej (*R,R,S*)-takamonidyny (**Rys.7**) z uwzględnieniem etapów wprowadzania oraz usuwania grup ochronnych składa się z 15 etapów: (1) hydrolizy γ -heksalaktonu, (2) utlenienia grupy hydroksylowej do ketonowej, (3) estryfikacji kwasu karboksylowego z uzyskaniem estru metylowego, (4) reakcji egzometylenowania Wittiga, (5) redukcji estru do aldehydu, (6) wprowadzenia pomocnika chiralnego RAMP, (7) asymetrycznego alkilowania Endersa, (8) utworzenia czwartorzędowej soli amoniowej, (9) usunięcia pomocnika chiralnego RAMP, (10) reakcji Picteta-Spenglera, (11) wewnątrzcząsteczkowego *N*-acylowania pierścienia indolowego, (12) asymetrycznego dihydroksylowania Sharplessa (13) wprowadzenia grupy tosyłowej na pierwszorzędową grupę hydroksylową, (14) usunięcia grupy ochronnej CBz z grupy aminowej oraz (15) wewnątrzcząsteczkowej reakcji alkilowania zamykającej ostatni pierścień (*R,R,S*)-takamonidyny. Tym samym jest to najbardziej skomplikowana synteza totalna związku naturalnego, która została w całości zaplanowana przez komputer i skutecznie wykonana w laboratorium. Potwierdzeniem tego faktu jest opublikowanie tej syntezy, wraz z syntezami daurycyny oraz lamellozydyny, w czasopiśmie *Nature* – publikacja ta, oznaczona jako [P1], wchodzi w skład niniejszej rozprawy doktorskiej i znajduje się w rozdziale 9 niniejszej pracy. Publikacja ta odbiła się szerokim echem w środowisku chemicznym i już w pierwszym roku po jej opublikowaniu została zacytowana ponad 30 razy, w tym pracy przeglądowej⁶³ w *Nature Reviews Methods Primers* autorstwa Richmonda Sarponga.

Wyniki przedstawione w niniejszym rozdziale rozprawy doktorskiej jasno pokazują, że komputer jest w stanie przewidywać syntezy nie tylko prostych związków organicznych, ale również skomplikowanych produktów naturalnych. Oczywiście predykcje programu Chematica (aktualnie rozwijanego już komercyjnie pod nazwą Synthia™) będą tym lepsze im więcej będzie w nim reguł z zakresu zaawansowanej chemii organicznej, w szczególności reakcji stereoselektywnych mających zastosowanie w syntezach skomplikowanych produktów naturalnych. To z kolei zależy bezpośrednio od stanu wiedzy z zakresu danej reakcji chemicznej. Często jednak publikowane metodologie stereoselektywnej syntezy są opracowane i zbadane jedynie dla stosunkowo prostych substratów¹⁰⁹, a przewidzenie możliwości ich adaptacji do bardziej skomplikowanych struktur często jest trudne lub wręcz niemożliwe. Poza tym, nierzadko liczba przykładów stosowania danej metodologii dla specyficznego rdzenia (często posiadającego jedno lub więcej centrów stereogenicznych w bliskiej odległości od centrum reakcyjnego) jest zbyt mała, żeby możliwe było zdefiniowanie precyzyjnej reguły chemicznej i jej implementacja do bazy programu Chematica. Oczywiście możliwe są rozwiązania alternatywne, np. stosowanie obliczeń kwantowo-mechanicznych dla poszczególnych reakcji w syntezie – umożliwiałyby one precyzyjną analizę stanu przejściowego danej reakcji dla konkretnych substratów i dokładniejsze przewidywanie stereochemii powstającego produktu. Niestety obliczenia takie są niezwykle czasochłonne (trwają od kilkadziesiąt minut do kilku

godzin, w zależności od struktury substratów i typu obliczeń), w związku z czym mogą być stosowane jedynie jako filtry do już wygenerowanych przez program syntez. Nie mogą być one jednak przeprowadzane podczas wyszukiwania ścieżek syntetycznych, podczas których oceniana jest ogromna liczba reakcji, z których ocena każdej trwa od kilkudziesięciu do kilkuset milisekund. Problem ten tak naprawdę dotyczy każdego programu do retrosyntezy (niezależnie od stosowanych w nich baz danych i algorytmów wyszukiwania) i stanowi jedno większych wyzwań dla współczesnej komputerowo-wspomaganej syntezy organicznej. Nie zmienia to jednak faktu, że program Chematica/Synthia™ w sposób jednoznaczny wykazuje niespotykaną dotychczas skuteczność i bezprecedensową kreatywność w tworzeniu użytecznych analiz retrosyntetycznych dla skomplikowanych związków organicznych, której nie posiada żaden inny program do analizy retrosyntetycznej. Osiągnięcie to, wraz z wynikami opisanymi w niniejszej rozprawie, stanowi zwieńczenie problemu badawczego postawionego przez E. J. Coreya ponad 60 lat temu dotyczącego komputerowo-wspomaganej analizy retrosyntetycznej, a będącego jednym z największych wyzwań chemii organicznej przełomu XX i XXI wieku.

6.2. Rotacyjny reaktor do automatycznej syntezy i separacji

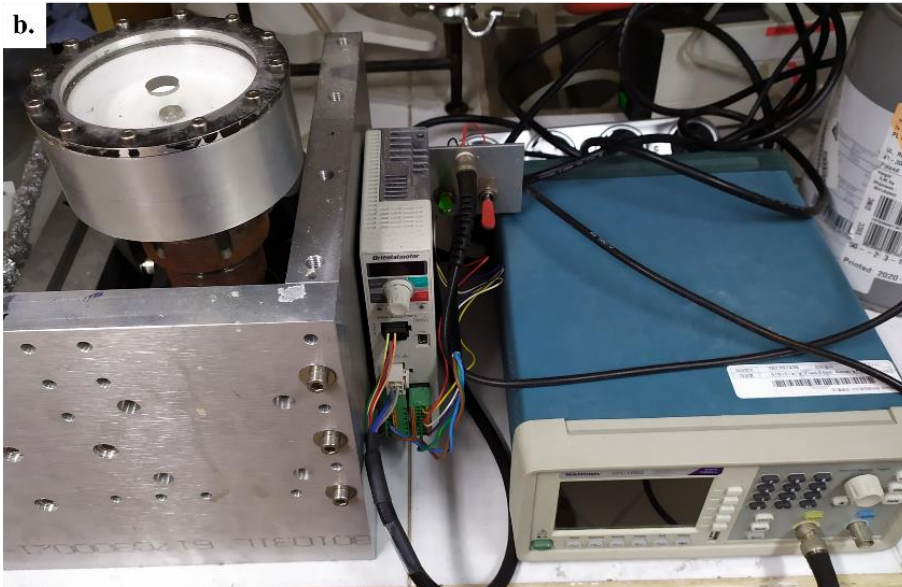
W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania nie tylko programami komputerowymi „automatyzującymi” planowanie syntez, ale i zautomatyzowanymi systemami robotycznymi umożliwiającymi eksperymentalne przeprowadzenie kilkietapowych procesów chemicznych bez konieczności manualnej izolacji związków pośrednich⁶³. Systemy te opierają się najczęściej na sekwencji połączonych reaktorów wsadowych¹¹³ lub reaktorach przepływowych^{62,114,115}. Jako że obydwa rozwiązania najczęściej wymagają zaprojektowania i zbudowania instalacji dostosowanej do konkretnego procesu chemicznego, a przeprowadzenie samej syntezy musi być ściśle kontrolowane na każdym etapie, wciąż poszukuje się nowych rozwiązań umożliwiających jeszcze większą automatyzację reakcji chemicznych. Z tego powodu w grupie prof. Grzybowskiego w Institute for Basic Science w Korei Południowej, w którym odbywałam staż w ramach doktoratu, powstał projekt rotacyjnego reaktora do automatycznej syntezy i separacji. Opracowany rotacyjny reaktor (**Rys. 13**) opiera się o nierównowagowe, samoorganizujące się strefy reakcyjne, w których zachodzić mogą wieloetapowe procesy chemiczne, w tym sekwencje reakcji chemicznych oraz procesy separacji związków organicznych. W niniejszym rozdziale krótko opiszę kontekst projektu, a następnie przejdę do badań własnych. Wszelkie szczegóły dotyczące działania reaktora, a także wykonanych przeze mnie eksperymentów znajdują się w pracach **[P2]** oraz **[P3]** wchodzących w zakres niniejszej rozprawy doktorskiej.

Pierwotną inspiracją do projektu były tzw. kolumny gęstości, czyli wzajemnie niemieszające się ciecze ułożone warstwowo w cylindrze miarowym. Teoretycznie, jeśli w warstwach kolumny gęstości znajdowały by się różne odczynniki chemiczne możliwe byłoby przeprowadzenie różnych reakcji w poszczególnych warstwach, a – zakładając migrację związków organicznych z jednej warstwy do drugiej – nawet przeprowadzenie całej sekwencji reakcji. Niestety, ze względu na siły kapilarne w tradycyjnych kolumnach gęstości warstwy są zazwyczaj mało stabilne, a ich duża grubość znacznie wydłuża czasy dyfuzji reagentów pomiędzy warstwami. Z tego powodu w laboratorium prof. Grzybowskiego opracowaliśmy rotacyjny reaktor, w którym wzajemnie niemieszające się warstwy cieczy ułożone są nie poziomo w statycznym naczyniu, a pionowo w obracającym się zbiorniku reaktora. Budowa rotacyjnego reaktora przedstawiona jest na **Rys. 13** (dokładny opis znajduje się w suplemencie do **[P2]**, **Figure S1**) – w standardowej konfiguracji cylindryczny zbiornik reaktora jest podłączony do elektrycznego silnika, którego obracający się wał ustawiony jest w pozycji pionowej (**Ryc. 13b**). Obudowa reaktora jest metalowa, wewnątrz zbiornika reakcyjnego wykonane jest z teflonu, natomiast pokrywa zbiornika wykonana jest z przezroczystego tworzywa sztucznego (co umożliwia wizualną kontrolę eksperymentu) – na jej środku znajduje się otwór umożliwiający dodawanie cieczy. Rozpuszczalniki i reagenty można podawać bezpośrednio do zbiornika reaktora właśnie przez górny otwór (na takiej samej zasadzie jak w zwykłych reaktorach wsadowych) lub można je podać na wewnętrzną, boczną krawędź reaktora poprzez kanał zaczynający się na środku reaktora i biegnący pod jego główną komorą aż do krawędzi cylindrycznego zbiornika. Ten drugi sposób podawania (widoczny na **Ryc. 13a**) jest niezwykle przydatny podczas podawania reagentów w trakcie eksperymentu.

a.



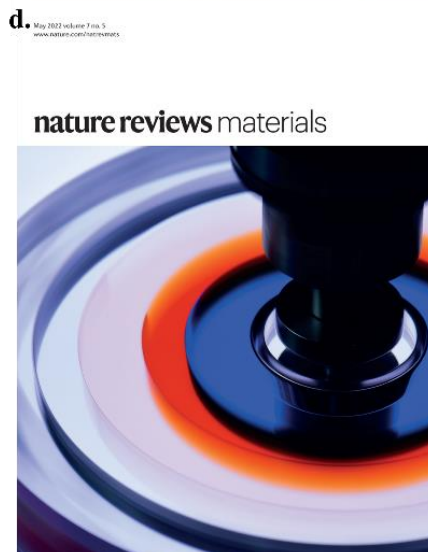
b.



c.

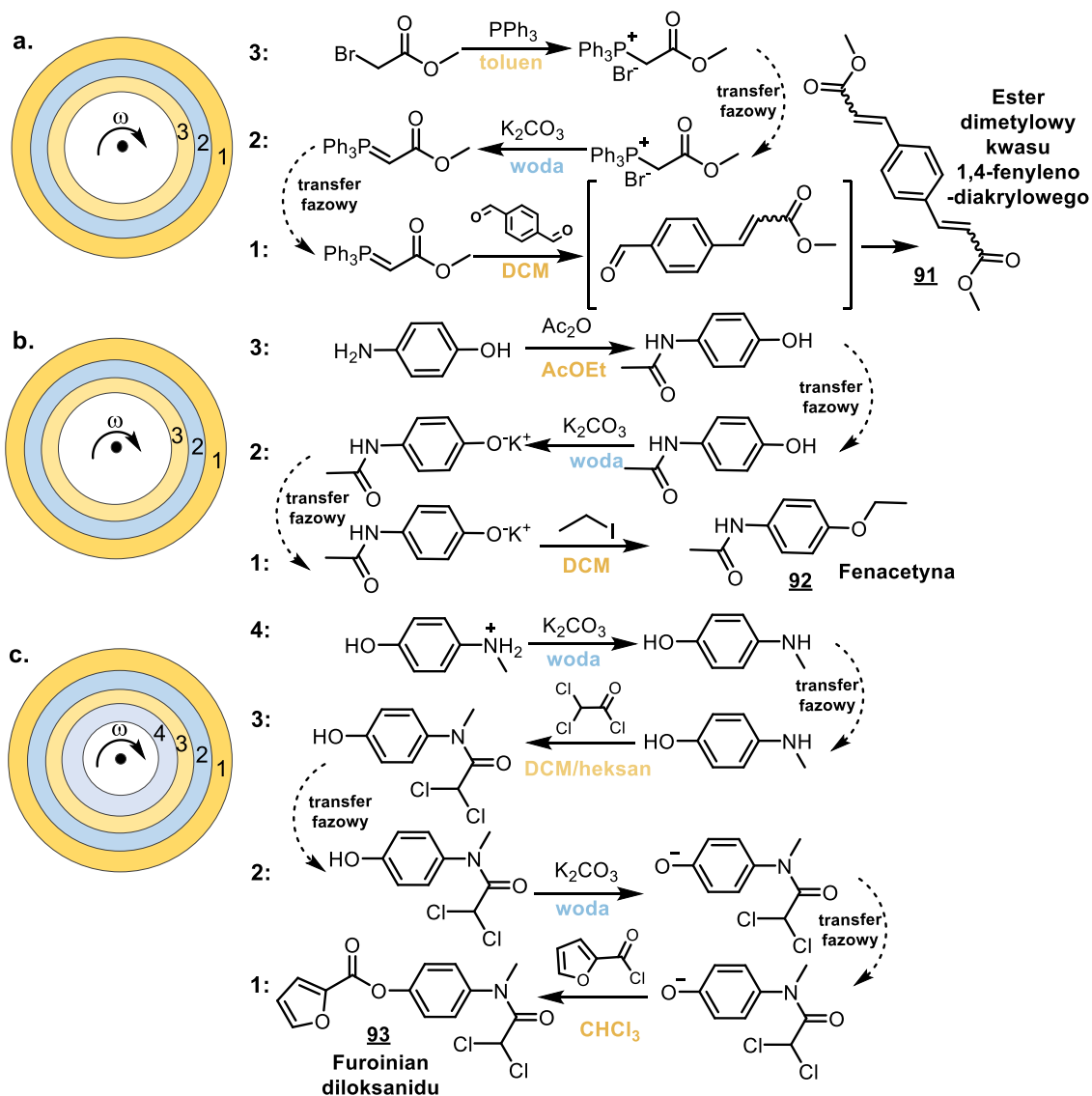


d.



Rys.13. Rotacyjny reaktor do automatycznej syntezy i separacji. **a)** Zdjęcie komory reaktora (od góry) na początku eksperymentu – wprowadzenie kolejnych stref reakcyjnych poprzez otwór na środku komory rotacyjnej (w momencie wykonania zdjęcia reaktor był włączony i obracał się z prędkością ok. 3 000 obr./min.; dla lepszego efektu wizualnego warstwy są zabarwione barwnikami); **b)** Zdjęcie reaktora – rotująca komora reaktora znajduje się w lewym, górnym rogu i jest podłączona do silnika (lewy, dolny róg) oraz kontrolera (po prawej); **c)** Okładka czasopisma Nature, w którym opublikowana została praca [P2] wchodząca w zakres niniejszej pracy doktorskiej; zdjęcie okładkowe przedstawia rotacyjny reaktor obracający się z prędkością 5 400 obr./min i zawierający 22-warstwowy układ wzajemnie niemieszających się cieczy; **d)** Okładka czasopisma Nature Review Materials, w którym opublikowana została praca [P3] wchodząca w zakres niniejszej pracy doktorskiej; Panele **a** i **c** zostały zapożyczone z publikacji źródłowej [P2]. Panel **b** to fotografia własna jednego z reaktorów znajdującego się w IChO PAN. Panel **d** został zapożyczony z publikacji źródłowej [P3].

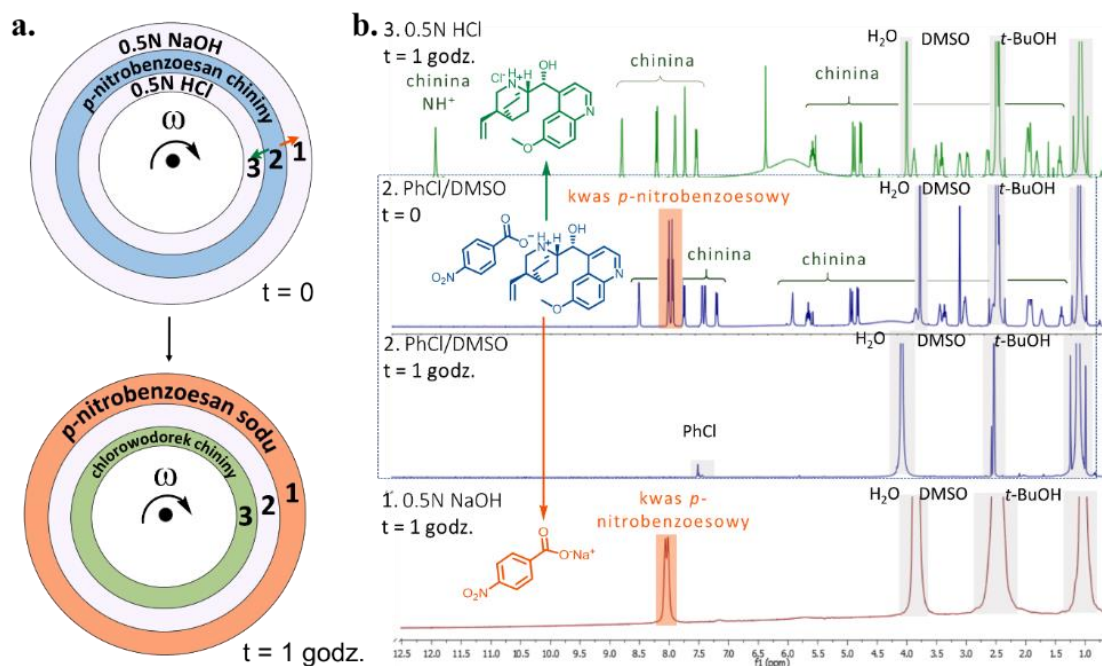
Ciecze można podawać do reaktora zarówno w trybie statycznym (komora reaktora nie obraca się) jak i dynamicznym (obracająca się komora reaktora). W pierwszym przypadku po podaniu do reaktora niemieszających się cieczy utworzą one poziome warstwy ułożone zgodnie z ich gęstością, tj. najgęstsza na dole, najlżejsza na górze, a następnie – po włączeniu obrotów ok. 2 600 obr./min. – ciecze automatycznie ułożą się w koncentryczne warstwy, z których warstwa najbardziej zewnętrzna będzie zawierała najgęstszą ciecz. Dużo większe możliwości daje jednak podawanie cieczy w trybie dynamicznym – jeśli ciecze dodawane są sekwencyjnie do obracającego się reaktora możliwe jest uzyskanie sytuacji, w której niemieszające się parami ciecze ułożone są naprzemiennie (np. warstwa wodna/organiczna/wodna/organiczna itd.) – w ten sposób możliwe jest uzyskanie jednocześnie ponad 20 stabilnych warstw (**Rys. 13c**). Dzięki sile odśrodkowej działającej na ciecze znajdujące się we wnętrzu reaktora, utworzone przez ciecze warstwy mogą być bardzo cienkie (standardowo mają one około kilkuset mikrometrów grubości), jednak nawet przy tak cienkich warstwach dyfuzja reagentów pomiędzy nimi jest stosunkowo wolna. Z tego powodu opracowano system „mieszania” – naprzemiennie kilkusekundowe przyspieszanie i zwalnianie obrotów rotującego cylindra powoduje perturbacje na granicach faz między poszczególnymi warstwami w efekcie znacznie zwiększając powierzchnię kontaktu między nimi i przyspieszając migrację reagentów z jednej warstwy do drugiej. Jednocześnie, w ten sam sposób zwiększa się mieszanie w obrębie każdej z warstw, przyspieszając reakcje w nich zachodzące (szczegóły zjawiska opisane są w suplemencie do [P2], **Figure S5**).



Rys.14. Syntezy wykonane w rotacyjnym reaktorze do automatycznej syntezy i separacji. **a)** Trzyetapowa, trójfazowa synteza estru dimetylowego kwasu 1,4-fenylenodiakrylowego; **b)** Trzyetapowa, trójfazowa synteza fenacetyny; **c)** Czteroetapowa, czterofazowa synteza furoinianu diloksanidu. Szczegóły syntez znajdują się w suplemencie do [P2], sekcja S5.

Posiadając możliwość utworzenia warstw stabilnych, niemieszających się ze sobą cieczy w rotującym reaktorze, a także możliwość mieszania w obrębie warstw i zwiększania dyfuzji reagentów między nimi, kolejnym etapem projektu było wykonanie syntez związków organicznych w opracowanym reaktorze. Trzy z syntez (syntaza estru dimetylowego kwasu 1,4-fenylenodiakrylowego, fenacetyny i furoinianu diloksanidu), wykonane przez dr. Mirosława Dygasa przedstawione są na **Rys. 14**. We wszystkich przypadkach roztwory reagentów zostały podane do reaktora w sposób sekwencyjny na samym początku eksperymentów, następnie znajdujący się w pierwszej warstwie (najbardziej wewnętrznej) pierwszy substrat ulegał reakcji, której produkt migrował do warstwy drugiej, gdzie ulegał kolejnej reakcji. Proces ten kończył się, gdy związek ulegał reakcji chemicznej w ostatniej, najbardziej zewnętrznej warstwie. Dopiero wówczas następowała ingerencja człowieka, tj. zebranie końcowej warstwy i analiza otrzymanego produktu.

Dodawanie warstw do reaktora w trybie dynamicznym (tj. w trakcie gdy zbiornik reaktora obraca się) umożliwia również uzyskanie trójwarstwowego układu cieczy (warstwa wodna/organiczna/wodna), w którym warstwy wodne posiadają skrajnie różne wartości pH, np. 1 i 14. Układ taki umożliwia przeprowadzenie automatycznej separacji soli związku organicznego znajdującego się w środkowej warstwie organicznej na komponent kwasowy – ulegający ekstrakcji do warstwy zasadowej – oraz zasadowy – ulegający ekstrakcji do warstwy kwasowej. Proces ten, opracowany przez mnie i dr. inż. Tomasza Kluczniaka, przedstawiony jest na przykładzie *p*-nitrobenzoesu chininy na **Rys. 15**.



Rys.15. Ekstrakcja soli organicznych wykonana w rotacyjnym reaktorze do automatycznej syntezy i separacji. a) schemat warstw w reaktorze: *p*-nitrobenzoesku chininy, pierwotnie rozpuszczony w warstwie organicznej 2 (chlorobenzen/DMSO) ulega automatycznej separacji na chlorowodorek chininy w warstwie wodnej 3 oraz *p*-nitrobenzoesku sodu w warstwie wodnej 1. b) Widma ^1H NMR wykonane na początku oraz na końcu eksperymentu – w warstwie organicznej nie ma śladu *p*-nitrobenzoesu chininy. Szczegóły eksperymentu znajdują się w suplemencie do [P2], w sekcji S5.6. Całość schematu wykonana została na podstawie [P2].

6.2.1. Badania własne – automatyczna, selektywna separacja związków organicznych z wykorzystaniem rotacyjnego reaktora

Syntezy wykonane w rotacyjnym reaktorze (**Ryc. 14**) zainspirowały mnie do przeanalizowania możliwości separacji związków organicznych ze skomplikowanych mieszanin poreakcyjnych. Podczas studium literaturowego nad różnymi metodami separacji moją uwagę zwróciły tzw. ciekłe membrany emulsyjne (LEM, z ang. *liquid emulsion membranes*)^{116,117}, czyli emulsje typu kropla-w-kropki (najczęściej w układzie woda/rozpuszczalnik organiczny/woda). Ciekłe membrany LEM były z sukcesem wykorzystane m.in. w selektywnej ekstrakcji związków organicznych (np. aminokwasów^{116,118} czy kwasu mlekowego¹¹⁹) a także metali¹²⁰. Niestety, membrany LEM posiadają szereg ograniczeń, związanych głównie z ich niestabilnością („cieknienie” cieczy przez membrany, puchnięcie kropeł oraz ich koalescencja), a także koniecznością

stosowania surfaktantów i skomplikowanych rozwiązań technicznych służących do ciągłego podtrzymywania emulsji¹²⁰.

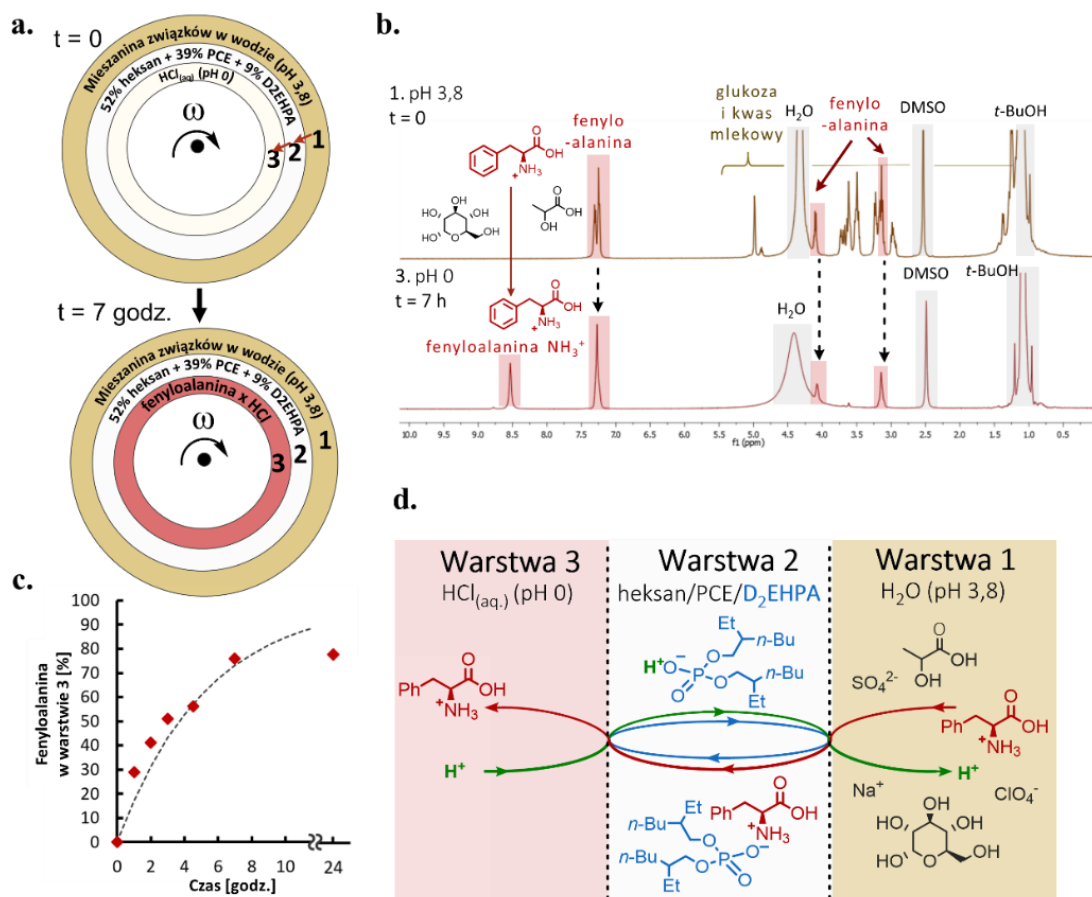
Zainspirowana membranami typu LEM opracowałam metodę zautomatyzowanej, selektywnej separacji z wykorzystaniem trójwarstwowego układu cieczy w rotacyjnym reaktorze (**Rys. 16**). Do selektywnej ekstrakcji zdecydowałam się na użycie przenośnika kationowego D2EHPA (kwas di-(2-etyloheksylo)fosforowy), a jako związek modelowy do ekstrakcji wybrałam aminokwas – fenyloalaninę. Opracowany przeze mnie system składa się z trzech warstw (wodnej/organicznej/wodnej), w których dwie warstwy wodne posiadają różne wartości pH, przykładowo warstwa wewnętrzna posiada pH 0, natomiast zewnętrzna 3,8 (**Rys. 16a**). Pomiędzy nimi znajduje się cienka warstwa organiczna zawierająca przenośnik kationowy D2EHPA, który selektywnie przenosi naładowaną dodatnio cząsteczkę fenyloalaniny z warstwy zewnętrznej (pH 3,8) do warstwy wewnętrznej (pH 1). W przypadku ciekłych emulsji warstwa organiczna, w której rozpuszczona jest D2EHPA, to najczęściej prosty rozpuszczalnik węglowodorowy (np. pentan lub heksan). W przypadku rotacyjnego reaktora konieczne było natomiast znalezienie przeze mnie nowego rozpuszczalnika lub mieszaniny rozpuszczalników, która (i) nie miesza się z wodą, (ii) posiada gęstość większą od ok. 1,1 g/cm³, (iii) stanowi dobry rozpuszczalnik dla przenośnika DE2HPA oraz jego kompleksu z fenyloalaniną. Po przetestowaniu szeregu mieszanin rozpuszczalników wybór padł na mieszaninę heksanu i perchloroetyleny w proporcji ok. 4:3.

W opracowanym przeze mnie modelowym układzie przedstawionym na **Rys.16a** zewnętrzna warstwa wodna imituje brzeczkę pofermentacyjną po mikrobiologicznej syntezie fenyloalaniny. Zawiera ona fenyloalaninę, glukozę, kwas mlekowy oraz sole nieorganiczne, a celem procesu jest selektywna ekstrakcja fenyloalaniny z zewnętrznej warstwy **1** do wewnętrznej warstwy **3**. Cel ten zrealizowałam z użyciem przenośnika kationów D2EHPA, a mechanizm ekstrakcji jest następujący (**Rys.16d**):

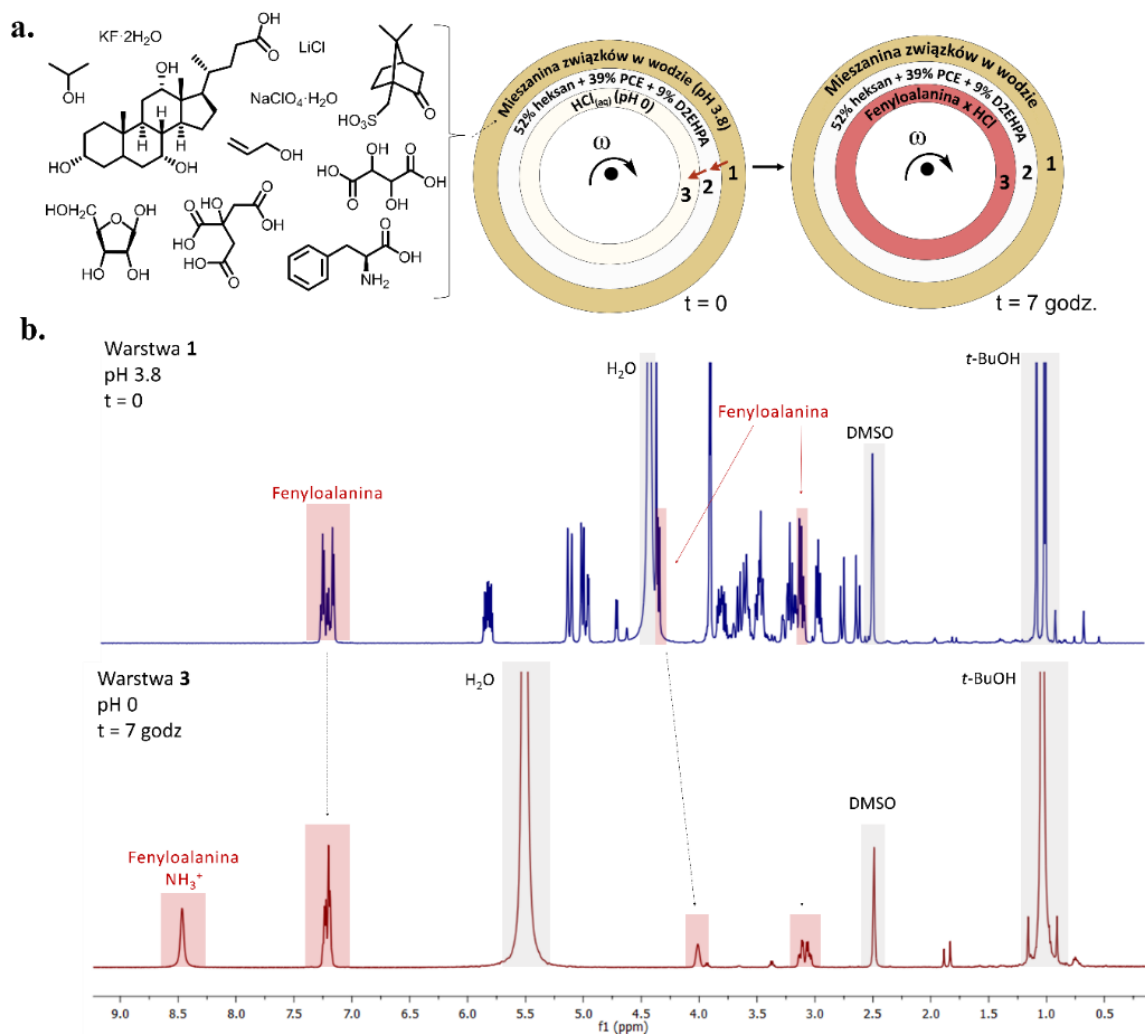
- (i) w zewnętrznej warstwie **1**, przy pH 3,8 fenyloalanina występuje w formie sprotonowanej;
- (ii) na granicy faz **1/2** sprotonowana fenyloalanina (Phe⁺) tworzy parę jonową z przenośnikiem D2EHPA;
- (iii) para jonowa Phe⁺/D2EHPA migruje przez warstwę **2**;
- (iv) w momencie gdy para jonowa Phe⁺/D2EHPA dotrze do wewnętrznej, wodnej warstwy **3**, na granicy faz **2/3** D2EHPA wymienia Phe⁺ na proton, zostawiając cząsteczkę fenyloalaniny w warstwie **3**;
- (v) cząsteczka przenośnika D2EHPA migruje z powrotem na granicę faz **1/2**, gdzie wymienia proton na kolejną cząsteczkę fenyloalaniny.

Siłą napędową opracowanej przeze mnie metody ekstrakcji jest gradient pH pomiędzy warstwami **1** a **3**, który w trakcie trwania eksperymentu ulega zmniejszeniu na skutek ciągłej wymiany protonów z warstwy **1** na cząsteczki fenyloalaniny z warstwy **3**. Po 7 godzinach stopień ekstrakcji fenyloalaniny osiąga plateau (**Ryc.16c**), co wiąże się ze spadkiem początkowego gradientu pH. Niemniej jednak, w tak opracowanym układzie możliwe jest selektywne wyekstrahowanie 80% fenyloalaniny z warstwy **1**, co jest wydajnością porównywalną do wydajności uzyskiwanych w tradycyjnych (dużo bardziej

skomplikowanych technicznie) systemach LEM¹¹⁶. Co więcej, w opracowanej metodzie nie obserwowałam migracji innych związków organicznych z warstwy **1** do **3**, co potwierdzają wykonane w czasie eksperymentu widma ¹H NMR (**Ryc.16b**). W celu potwierdzenia użyteczności opracowanej metody, eksperymenty przeprowadziłam także na bardziej skomplikowanej mieszaninie 12 związków organicznych w wodzie (**Ryc. 17**).



Rys.16. Selektywna ekstrakcja fenyloalaniny z mieszaniny imitującej brzczkę pofermentacyjną wykonana w rotacyjnym reaktorze do automatycznej syntezy i separacji. **a)** schemat warstw w reaktorze: w kwasowej (pH 3,8) warstwie wodnej **1** rozpuszczone są sole i związki organiczne – z tej warstwy fenyloalanina jest selektywnie ekstrahowana za pomocą przenośnika D2EHPA najpierw do warstwy organicznej **2** a następnie do warstwy wodnej **3**; Skład warstw: **warstwa 1** (pH 3,8): fenyloalanina (Phe, 99,1 mg, 0,6 mmol) rozpuszczona w 10 mL wodnego roztworu NaClO₄·H₂O zawierającego glukozę (162,1 mg, 0,9 mmol) i kwas mlekowy (81,1 mg, 0,9 mmol); **warstwa 2**: D2EHPA (0.70 ml) w mieszaninie heksanu (4 ml) oraz perchloroetyleny (3 ml); **warstwa 3** (pH 0): 10 ml 1.0 M wodnego roztworu HCl; **b)** Widma ¹H NMR wykonane z warstwy **1** na początku eksperymentu oraz z warstwy **3** na końcu eksperymentu – widoczne jest, że ekstrakcji ulega jedynie fenyloalanina; **c)** Wykres zależności ilości wyekstrahowanej fenyloalaniny od czasu; Ilość fenyloalaniny w warstwie **3** była określana za pomocą widm ¹H NMR; Wszystkie widma były wykonane w DMSO-*d*₆, a alkohol *tert*-butylowy był dodawany przed wykonaniem pomiaru jako wzorzec wewnętrzny. **d)** Mechanizm przenoszenia fenyloalaniny za pomocą przenośnika D2EHPA. W przeprowadzanych eksperymentach wykorzystywałam również zwiększone „mieszanie” na granicy faz (czyli naprzemienne kilkusekundowe przyspieszanie i zwalnianie obrotów rotującego cylindra). Całość schematu wykonana została na podstawie [P2].



Rys.17. Selektywna ekstrakcja fenylalaniny ze skomplikowanej mieszaniny związków organicznych wykonana w rotacyjnym reaktorze do automatycznej syntezy i separacji. Skład warstw: **warstwa 1** (pH 3,8): fenylalanina (Phe, 99,1 mg, 0,6 mmol), glukoza (216,2 mg, 1,2 mmol), 2-propanol (18,0 mg, 0,3 mmol), alkohol allilowy (69,7 mg, 1,2 mmol), kwas cholowy (2,5 mg, 0,006 mmol), kwas (1*S*)-(+)-10-kamforosulfonowy (1,4 mg, 0,006 mmol), kwas cytrynowy (63,0 mg, 0,3 mmol), D-(-)-kwas szczawiowy (90,0 mg, 0,6 mmol), D-(-)-ryboza (90,0 mg, 0,6 mmol), LiCl (25,4 mg, 0,6 mmol), KF \times H $_2$ O (56,5 mg, 0,6 mmol) rozpuszczone w 10 mL wody zawierającej NaClO $_4$ \times H $_2$ O; **warstwa 2**: D2EHPA (0,70 ml) w mieszaninie heksanu (4 ml) oraz tetrachloroetylenu (3 ml); **warstwa 3** (pH 0): 10 ml 1,0 M wodnego roztworu HCl; **b**) Widma ^1H NMR wykonane z warstwy 1 na początku eksperymentu oraz z warstwy 3 na końcu eksperymentu. Ilość fenylalaniny w warstwie 3 była określana za pomocą widm ^1H NMR; Wszystkie widma były wykonane w DMSO- d_6 , a alkohol *tert*-butylowy był dodawany przed wykonaniem pomiaru jako wzorzec wewnętrzny. W przeprowadzanych eksperymentach wykorzystywałam również zwiększone „mieszanie” na granicy faz (czyli naprzemienne kilkusekundowe przyspieszanie i zwalnianie obrotów rotującego cylindra). Całość schematu wykonana została na podstawie [P2].

Opracowana przeze mnie zautomatyzowana metoda selektywnej ekstrakcji pozwala na efektywną, wysokowydajną separację związku organicznego ze skomplikowanej mieszaniny poreakcyjnej. Metodologię tę opracowałam na przykładzie aminokwasu – fenyloalaniny – jednak jest to jedynie ułamek możliwości opracowanego systemu do syntezy i separacji. Po pierwsze, poprzez analogię do tradycyjnych układów LEM, możliwa będzie adaptacja opisanego powyżej systemu do ekstrakcji innych związków organicznych, które mogą ulec sprotonowaniu w warstwie wodnej i utworzyć kompleks z przenośnikiem kationów D2EHPA. Poza tym, zamiana przenośnika kationów D2EHPA na przenośnik anionów (np. aminy czy czwartorzędowe sole amoniowe stosowane w układach LEM) może umożliwić też ekstrakcję anionów organicznych, np. kwasów karboksylowych, w rotującym reaktorze. Co więcej, D2EHPA czy inne przenośniki kationowe (typu LIX czy CYANEX¹¹⁷) umożliwiają selektywną ekstrakcję jonów metali, co jest również możliwe w rotującym reaktorze (potwierdzają to wykonane w naszej grupie wstępne eksperymenty). Naturalną kontynuacją projektu jest również połączenie opracowanej przeze mnie selektywnej ekstrakcji związków organicznych z ich syntezą w tym samym reaktorze (analogiczną do syntez przedstawionych na **Rys. 14**), co umożliwiłoby jeszcze większy stopień automatyzacji syntezy organicznej – projekt ten wykracza jednak poza ramy niniejszej pracy doktorskiej.

Przedstawiony powyżej system do zautomatyzowanej syntezy i separacji związków organicznych, wraz z opracowaną przeze mnie metodą selektywnej ekstrakcji, został opublikowany w dwóch publikacjach, w *Nature* [**P2**], w którym został uhonorowany okładką oraz w *Nature Review Materials* [**P3**] (o wskaźniku cytowań **66,31**), która to publikacja została napisana na zaproszenie edytora. Opracowany system jest też przedmiotem patentu **WO2020/153739**, którego jestem współautorką.

7. Podsumowanie

W intensywnie zmieniającym się świecie komputerowo- i robotycznie-wspomagana chemia organiczna przeżywa swój renesans – fakt ten nie jest niczym zaskakującym biorąc pod uwagę nie tylko szybkość ogólnego rozwoju technologicznego, ale także ogromnych wyzwań stawianych przed naukowcami w ostatnim czasie. Zmieniający się klimat, wyczerpywanie się zasobów naturalnych, a także pandemia SARS-CoV-2 blokująca całe globalne łańcuchy handlowe powodują, że coraz większą wagę przykładają się do zwiększenia efektywności procesów syntezy (zarówno pod kątem zwiększenia wydajności i szybkości, jak również zmniejszenia ilości odpadów) oraz tworzenia zautomatyzowanych systemów do syntezy i separacji, które nie tylko umożliwią przyspieszenie tych procesów, ale będą także zdolne do błyskawicznej adaptacji do nowych typów reakcji (np. w przypadku odcięcia dostaw kluczowego substratu syntezy). W tym kontekście niezwykle istotne jest poszukiwanie nowych narzędzi z zakresu komputerowo-wspomaganej, zautomatyzowanej chemii organicznej do syntezy związków organicznych oraz ich separacji, co było celem niniejszej rozprawy doktorskiej.

Eksperymentalna realizacja planu syntezy totalnej (*R,R,S*)-takamonidyny, której znaczna część wchodzi w zakres niniejszej rozprawy, w sposób jednoznaczny udowadnia zdolność komputera do generowania poprawnych analiz retrosyntetycznych dla związków o wysokim stopniu skomplikowania strukturalnego. Ponadto, opracowana przeze mnie metoda selektywnej ekstrakcji fenyloalaniny stanowi potwierdzenie możliwości wykorzystania reaktora rotacyjnego do zautomatyzowanej separacji związków organicznych – opisane w niniejszej rozprawie rezultaty moich prac badawczych w pełni potwierdzają więc postawioną na początku tezę. Co więcej, wykonane przeze mnie badania stanowią istotny wkład w rozwój zautomatyzowanej chemii organicznej, zarówno w zakresie komputerowej analizy reakcji chemicznych oraz jej zastosowania w codziennej praktyce laboratoryjnej, jak również w zakresie robotyzacji procesów syntezy i separacji związków organicznych. Rezultaty tych prac stanowią podstawę do dalszego rozwoju zautomatyzowanej syntezy oraz oczyszczania różnych klas związków organicznych (np. aminokwasów, kwasów karboksylowych) i nieorganicznych (jony metali) z wykorzystaniem odpowiednio dobranych przenośników molekularnych.

8. Bibliografia

1. Mikulak-Klucznik, B. *et al.* Computational planning of the synthesis of complex natural products *Nature* **588**, 83–88 (2020).
2. Cybulski, O. *et al.* Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation. *Nature* **586**, 57–63 (2020).
3. Anastas, P. T. & Warner, J. C. *Green chemistry: theory and practice*. (New York: Oxford University Press, 1998).
4. Erythropel, H. C. *et al.* The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles. *Green Chem.* **20**, 1929–1961 (2018).
5. Pandolfini, B. *Kasparov and Deep Blue: The historic chess match between man and machine*. (Simon and Schuster, 1997).
6. Miley, J. 11 Times AI Beat Humans at Games, Art, Law and Everything in Between, (2018): <https://interestingengineering.com/11-times-ai-beat-humans-at-games-art-law-and-everything-in-between>.
7. Silver, D. *et al.* Mastering the game of Go with deep neural networks and tree search. *Nature* **529**, 484–489 (2016).
8. Artificial intelligence: Go master Lee Sedol wins against AlphaGo program, (2016): <https://www.bbc.com/news/technology-35797102>.
9. Waldrop, M. . M. No Drivers Ditch the Driver. *Nature* **518**, 4 (2015).
10. Del Rey, J. How robots are transforming Amazon warehouse jobs — for better and worse, (2019): <https://www.vox.com/recode/2019/12/11/20982652/robots-amazon-warehouse-jobs-automation>.
11. Corey, E. J. & Todd Wipke, W. Computer-assisted design of complex organic syntheses. *Science (80-.)*. **166**, 178–192 (1969).
12. Corey, E. Computer-assisted analysis of complex synthetic problems. *Q. Rev. Chem. Soc.* **25**, 455 (1971).
13. Corey, E. J., Long, A. K. & Rubenstein, S. D. Computer-assisted analysis in organic synthesis. *Science (80-.)*. **228**, 408–418 (1985).
14. van Rozendaal, E. L. M., Ott, M. A. & Scheeren, H. W. A LHASA analysis of taxol. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas* **113**, 297–303 (1994).
15. Isler, O. *et al.* Über die Ester und Äther des synthetischen Vitamins A. *Helv. Chim. Acta* **32**, 489–505 (1949).
16. Woodward, R. B., Sondheimer, F. & Taub, D. The total synthesis of cortisone. *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 4057–4057 (1951).
17. Gates, M. & Tschudi, G. The synthesis of morphine. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1380–1393 (1956).
18. Woodward, R. B. *et al.* The total synthesis of chlorophyll. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 3800–3802 (1960).
19. Corey, E. J. General methods for the construction of complex molecules. *Pure Appl. Chem.* **14** 19–38 (1967).
20. Corey, E. J. & Jorgensen, W. L. Computer-assisted synthetic analysis. Synthetic strategies based on appendages and the use of reconnective transforms. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 189–203 (1976).
21. Corey, E. J., Wipke, W. T., Cramer III, R. D. & Howe, W. J. Techniques for perception by a computer of synthetically significant structural features in complex molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 431–439 (1972).
22. Corey, E. J., Howe, W. J., Orf, H. W., Pensak, D. A. & Petersson, G. General methods of synthetic analysis. Strategic bond disconnections for bridged polycyclic structures. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 6116–6124 (1975).
23. Corey, E. J. & Long, A. K. Computer-assisted synthetic analysis. Performance of long-range strategies for stereoselective olefin synthesis. *J. Org. Chem.* **94**, 431–439 (1978).
24. Corey, E. J. & Petersson, G. A. An algorithm for machine perception of synthetically significant rings in complex cyclic organic structures. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 460–465 (1972).

25. Corey, E. J. & Jorgensen, W. L. Computer-assisted synthetic analysis. Generation of synthetic sequences involving sequential functional group interchanges. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 203–209 (1976).
26. Corey, E. J., Howe, W. J. & Pensak, D. A. Computer-assisted synthetic analysis. Methods for machine generation of synthetic intermediates involving multistep look-ahead. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 7724–7737 (1974).
27. Corey, E. J., Johnson, A. P. & Long, A. K. Computer-assisted synthetic analysis. Techniques for efficient long-range retrosynthetic searches applied to the Robinson annulation process. *J. Org. Chem.* **45**, 2051–2057 (1980).
28. Corey, E. J. *et al.* Computer-assisted synthetic analysis. Long-range search procedures for antithetic simplification of complex targets by application of the halolactonization transform. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **20**, 221–230 (1980).
29. Cook, A. *et al.* Computer-aided synthesis design: 40 years on. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2**, 79–107 (2012).
30. Ott, M. A. & Noordik, J. H. Long-range strategies in the LHASA program: The quinone Diels - Alder transform. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **37**, 98–108 (1997).
31. Todd, M. H. Computer-aided organic synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **34**, 247–266 (2005).
32. Corey, E. J. The logic of chemical synthesis: multistep synthesis of complex carbogenic molecules (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **30**, 455–465 (1991).
33. Wipke, W. T., Braun, H., Smith, G., Choplin, F. & Sieber, W. SECS – Simulation and evaluation of chemical synthesis: strategy and planning. 97–127 (1977).
34. Wipke, W. T. & Dyott, T. M. Simulation and evaluation of chemical synthesis. computer representation and manipulation of stereochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 4825–4834 (1974).
35. Dyott, T. M. & Wipke, W. T. Use of ring assemblies in ring perception algorithm. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **15**, 140–147 (1975).
36. Wipke, W. T. & Gund, P. Simulation and evaluation of chemical synthesis. Congestion: a conformation-dependent function of steric environment at a reaction center. Application with torsional terms to stereoselectivity of nucleophilic additions to ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 8107–8118 (1974).
37. Wipke, W. T., Ouchi, G. I. & Krishnan, S. Simulation and evaluation of chemical synthesis-SECS: An application of artificial intelligence techniques. *Artif. Intell.* **11**, 173–193 (1978).
38. Gund, P. *et al.* Computer-assisted synthetic analysis at Merck. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **20**, 88–93 (1980).
39. Gelernter, H. *et al.* The discovery of organic synthetic routes by computer. *New Concepts I*, 113-150 (1973).
40. Gelernter, H. L. *et al.* Empirical explorations of SYNCHEM. *Science (80-)*. **197**, 1041–1049 (1977).
41. Krebsbach, D., Gelernter, H. & Sieburth, S. M. N. Distributed heuristic synthesis search. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **38**, 595–604 (1998).
42. Bersohn, M. Automatic problem solving applied to synthetic chemistry. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **45**, 1897–1903 (1972).
43. Tanaka, A. & Katouda, W. Development of hybrid web system for supporting process research. *Sumimoto Kagaku* **2004**, 1–9 (2004).
44. Tanaka, A., Kawai, T., Takabatake, T., Okamoto, H. & Bersohn, M. Selective search focusing on retro-synthetically important bonds in a synthesis design system. *J. Comput. Aided Chem.* **10**, 104–117 (2009).
45. Takabatake, T. SYNSUP, Synthetic route design. *Sumitomo Kagaku 2009- Ii* 1–11 (2009).
46. Takahashi, M. *et al.* The performance of a noninteractive synthesis program. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **30**, 436–441 (1990).
47. Dogane, I., Takabatake, T. & Bersohn, M. Computer-executed synthesis planning, a progress report. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas* **111**, 291–296 (1992).
48. Tanaka, A. *et al.* Synthesis of an azaspirane via Birch reduction alkylation prompted by suggestions from a computer program. *Tetrahedron Lett.* **47**, 6733–6737 (2006).

49. Funatsu, K. & Sasaki, S. I. Computer-assisted organic synthesis design and reaction prediction system, 'AIPHOS'. *Tetrahedron Comput. Methodol.* **1**, 27–37 (1988).
50. Funatsu, K., Del Carpio, C. A. & Sasaki, S. I. Automatic perception of reactivity characteristics of molecular structures directed to the planning of organic synthesis. *Tetrahedron Comput. Methodol.* **1**, 39–51 (1988).
51. Feng, F., Lai, L. & Pei, J. Computational chemical synthesis analysis and pathway design. *Front. Chem.* **6**, (2018).
52. Johnson, P. Y., Bernstein, I., Crary, J., Evans, M. & Wang, T. Designing an expert system for organic synthesis in expert systems application in chemistry. in (eds. Holme, B. A. & Pierce, H.) (Am. Chem. Soc. Washington, 1989).
53. Hendrickson, J. B. Approaching the logic of synthesis design. *Acc. Chem. Res.* **19**, 274–281 (1986).
54. Hanessian, S., Franco, J. & Larouche, B. The Psychobiological basis of heuristic synthesis planning – man, machine and the chiron approach. *Pure Appl. Chem.* **62**, 1887 (1990).
55. Ugi, I. *et al.* Computer-assisted solution of chemical problems – the historical development and the present state of the art of a new discipline of chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **32**, 201–227 (1993).
56. Gasteiger, J. & Engel, T. *Cheminformatics – a textbook.* (Wiley-VCH, 2003).
57. Szymkuć, S. *et al.* Computer-assisted synthetic planning: the end of the beginning. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, (2016).
58. Grzybowski, B. A. *et al.* Chematica: A story of computer code that started to think like a chemist. *Chem* **4**, 390–398 (2018).
59. Klucznik, T. *et al.* Efficient syntheses of diverse, medicinally relevant targets planned by computer and executed in the laboratory. *Chem* **4**, 522–532 (2018).
60. Segler, M. H. S., Preuss, M. & Waller, M. P. Planning chemical syntheses with deep neural networks and symbolic AI. *Nature* **555**, 604–610 (2018).
61. Coley, C. W., Rogers, L., Green, W. H. & Jensen, K. F. Computer-assisted retrosynthesis based on molecular similarity. *ACS Cent. Sci.* **3**, 1237–1245 (2017).
62. Coley, C. W. *et al.* A robotic platform for flow synthesis of organic compounds informed by AI planning. *Science (80-.)*. **365**, (2019).
63. Shen, Y. *et al.* Automation and computer-assisted planning for chemical synthesis. *Nat. Rev. Methods Prim.* **1**, (2021).
64. Ravitz, O. Data-driven computer aided synthesis design. *Drug Discov. Today Technol.* **10**, e443–e449 (2013).
65. InfoChem. Available at: www.infochem.de.
66. SciFinder-n. Available at: www.cas.org/products/scifinder-n.
67. Wei, J. N., Duvenaud, D. & Aspuru-Guzik, A. Neural networks for the prediction of organic chemistry reactions. *ACS Cent. Sci.* **2**, 725–732 (2016).
68. Coley, C. W., Barzilay, R., Jaakkola, T. S., Green, W. H. & Jensen, K. F. Prediction of organic reaction outcomes using machine learning. *ACS Cent. Sci.* **3**, 434–443 (2017).
69. Coley, C. W. *et al.* A graph-convolutional neural network model for the prediction of chemical reactivity. *Chem. Sci.* **10**, 370–377 (2019).
70. Schwaller, P., Gaudin, T., Lányi, D., Bekas, C. & Laino, T. 'Found in Translation': predicting outcomes of complex organic chemistry reactions using neural sequence-to-sequence models. *Chem. Sci.* **9**, 6091–6098 (2018).
71. Ahneman, D. T., Estrada, J. G., Lin, S., Dreher, S. D. & Doyle, A. G. Predicting reaction performance in C–N cross-coupling using machine learning. *Science (80-.)*. **360**, 186–190 (2018).
72. Schwaller, P. *et al.* Molecular Transformer: A Model for Uncertainty-Calibrated Chemical Reaction Prediction. *ACS Cent. Sci.* **5**, 1572–1583 (2019).
73. Chang, C.-C. *et al.* Combined photolysis and catalytic ozonation of dimethyl phthalate in a high-gravity rotating packed bed. *J. Hazard. Mater.* **161**, 287–293 (2009).
74. Kayala, M. A. & Baldi, P. ReactionPredictor: Prediction of complex chemical reactions at the mechanistic level using machine learning. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 2526–2540 (2012).

75. Fooshee, D. *et al.* Deep learning for chemical reaction prediction. *Mol. Syst. Des. Eng.* **3**, 442–452 (2018).
76. Chan, W. & White, P. *Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach*, Vol. 222. (Oxford University Press, 1999).
77. Seeberger, P. H. Automated oligosaccharide synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 19–28 (2008).
78. Kaplan, B. E. The automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Trends Biotechnol.* **3**, 253–256 (1985).
79. Bellomo, A. *et al.* Rapid catalyst identification for the synthesis of the pyrimidinone core of HIV integrase inhibitors. *Angew. Chem.* **124**, 7018–7021 (2012).
80. Dreher, S. D., Dormer, P. G., Sandrock, D. L. & Molander, G. A. Efficient cross-coupling of secondary alkyltrifluoroborates with aryl chlorides—reaction discovery using parallel microscale experimentation. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9257–9259 (2008).
81. Cernak, T. *et al.* Microscale high-throughput experimentation as an enabling technology in drug discovery: application in the discovery of (piperidinyl)pyridinyl-1*H*-benzimidazole diacylglycerol acyltransferase 1 inhibitors. *J. Med. Chem.* **60**, 3594–3605 (2017).
82. Santanilla, A. B. *et al.* Nanomole-scale high-throughput chemistry for the synthesis of complex molecules. *Science (80-.)*. **347**, 49–52 (2015).
83. Perera, D. *et al.* A platform for automated nanomole-scale reaction screening and micromole-scale synthesis in flow. *Science (80-.)*. **359**, 429–434 (2018).
84. Granda, J. M., Donina, L., Dragone, V., Long, D. L. & Cronin, L. Controlling an organic synthesis robot with machine learning to search for new reactivity. *Nature* **559**, 377–381 (2018).
85. Steiner, S. *et al.* Organic synthesis in a modular robotic system driven by a chemical programming language. *Science (80-.)*. **363**, (2019).
86. Li, J., Grillo, A. S. & Burke, M. D. From synthesis to function via iterative assembly of *N*-methyliminodiacetic acid boronate building blocks. *Acc. Chem. Res.* **48**, 2297–2307 (2015).
87. Ishida, S., Terayama, K., Kojima, R., Takasu, K. & Okuno, Y. AI-driven synthetic route design incorporated with retrosynthesis knowledge. *J. Chem. Inf. Mod.* **62**, 1357–1367 (2022).
88. Gajewska, E. P. *et al.* Algorithmic discovery of tactical combinations for advanced organic syntheses. *Chem* **6**, 280–293 (2020).
89. Gillis, E. P. & Burke, M. D. Multistep synthesis of complex boronic acids from simple MIDA boronates. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 14084–14085 (2008).
90. Trobe, M. & Burke, M. D. The molecular industrial revolution: automated synthesis of small molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 4192–4214 (2018).
91. Molga, K., Szymkuć, S. & Grzybowski, B. A. Chemist Ex Machina: Advanced Synthesis Planning by Computers. *Acc. Chem. Res.* **54**, 1094–1106 (2021).
92. Beker, W., Gajewska, E. P., Badowski, T. & Grzybowski, B. A. Prediction of major regio-, site-, and diastereoisomers in Diels–Alder reactions by using machine-learning: the importance of physically meaningful descriptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 4515–4519 (2019).
93. Badowski, T., Molga, K. & Grzybowski, B. A. Selection of cost-effective yet chemically diverse pathways from the networks of computer-generated retrosynthetic plans. *Chem. Sci.* **10**, 4640–4651 (2019).
94. Molga, K., Dittwald, P. & Grzybowski, B. A. Navigating around patented routes by preserving specific motifs along computer-planned retrosynthetic pathways. *Chem* **5**, 460–473 (2019).
95. Klucznik, T. Komputerowo wspomagana synteza organiczna związków biologicznie aktywnych. (Instytut Chemii Organicznej PAN, 2019).
96. Lemonick, S. Chemists test computer-planned syntheses for the first time, (2018): <https://cen.acs.org/articles/96/i10/Chemists-test-computer-planned-syntheses.html>.
97. Lemonick, S. Research of the Year 2018, (2018): https://cen.acs.org/analytical-chemistry/CENs-Year-Chemistry-2018/96/i49?utm_source=feedburner&utm_medium=feed&utm_campaign=Feed%3A+cen_latestne.

98. Lowe, D. Retrosynthesis: Here It Comes, (2018): <https://www.science.org/content/blog-post/retrosynthesis-here-comes>.
99. Yirka, B. Chemists test Chematica's ability to generate synthetic routes, (2018): <https://phys.org/news/2018-03-chemists-chematica-ability-synthetic-routes.html>.
100. Caputo, J. Five Chem papers that made an impact, (2018): <https://crosstalk.cell.com/blog/five-chem-papers-that-made-an-impact>.
101. SYNTHIA™ Retrosynthesis Software: <https://www.sigmaaldrich.com/PL/en/services/software-and-digital-platforms/synthia-retrosynthesis-software>.
102. Skoraczynski, G. *et al.* Predicting the outcomes of organic reactions via machine learning: Are current descriptors sufficient? *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
103. Lim, K. H. *et al.* Ibogan, tacaman, and cytotoxic bisindole alkaloids from *Tabernaemontana Cononusine*, an iboga alkaloid with unusual incorporation of a pyrrolidone moiety. *J. Nat. Prod.* **78**, 1129–1138 (2015).
104. Barnhart, R. W. *et al.* Asymmetric catalysis. Asymmetric catalytic intramolecular hydroacylation of 4-Pentenals using chiral rhodium diphosphine catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1821–1830 (1994).
105. Enders, D., Baus, U., Müller, P., Nicolaou, K. C. & Jandeleit, B. Asymmetric synthesis of 3-substituted 4-Oxoesters Using the SAMP-/RAMP-hydrazone method. *Mol. Online* **2**, 15–21 (1998).
106. Koike, K., Yoshino, H., Li, H. Y., Sasaki, T. & Li, W. Determination of the absolute configuration of picrasidine Y, a naturally occurring β -carboline alkaloid. *Tetrahedron Lett.* **56**, 5306–5308 (2015).
107. Pradhan, P. K., Nandi, D., Pradhan, S. Das, Jaisankar, P. & Giri, V. S. An unusual diastereoselective pictet-spengler reaction: Synthesis of novel tetrahydro- β -carboline glycosides. *Synlett* **24**, 85–89 (2013).
108. Ducrot, P., Rabhi, C. & Thal, C. Synthesis of tetrahydro- β -carbolines and studies of the Pictet-Spengler reaction. *Tetrahedron* **56**, 2683–2692 (2000).
109. Wanner, M. J., Van Der Haas, R. N. S., De Cuba, K. R., Van Maarseveen, J. H. & Hiemstra, H. Catalytic asymmetric Pictet-Spengler reactions via sulfenyliminium ions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 7485–7487 (2007).
110. Stöckigt, J., Antonchick, A. P., Wu, F. & Waldmann, H. The Pictet-Spengler reaction in nature and in organic chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 8538–8564 (2011).
111. Dalpozzo, R. The chiral pool in the Pictet-Spengler reaction for the synthesis of β -carbolines. *Molecules* **21**, (2016).
112. Gremmen, C., Willemse, B., Wanner, M. J. & Koomen, G. J. Enantiopure tetrahydro- β -carbolines via Pictet-Spengler reactions with *N*-sulfinyl tryptamines. *Org. Lett.* **2**, 1955–1958 (2000).
113. Kitson, P. J. *et al.* Digitization of multistep organic synthesis in reactionware for on-demand pharmaceuticals. *Science (80-.)*. **359**, 314–319 (2018).
114. Hartman, R. L., McMullen, J. P. & Jensen, K. F. Deciding whether to go with the flow: evaluating the merits of flow reactors for synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 7502–7519 (2011).
115. Pastre, J. C., Browne, D. L. & Ley, S. V. Flow chemistry syntheses of natural products. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 8849–8869 (2013).
116. Itoh, H., Thien, M. P., Hatton, T. A. & Wang, D. I. C. A liquid emulsion membrane process for the separation of amino acids. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 853–860 (1990).
117. Aguilar, M. & Cortina, J. L. *Solvent Extraction and Liquid Membranes: Fundamentals and Applications in New Materials*. (CRC, 2008).
118. Juang, R. & Wang, Y. Amino acid separation with D2EHPA by solvent extraction and liquid surfactant membranes. **207**, 241–252 (2002).
119. Kumar, A. & Thakur, A. *Lactic acid and its separation and purification techniques : A review. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **18**, (Springer Netherlands, 2019).

120. Ahmad, A. L., Kusumastuti, A., Derek, C. J. C. & Ooi, B. S. Emulsion liquid membrane for heavy metal removal: An overview on emulsion stabilization and destabilization. *Chem. Eng. J.* **171**, 870–882 (2011).

9. Publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej

Computational planning of the synthesis of complex natural products

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2855-y>

Received: 25 July 2020

Accepted: 6 October 2020

Published online: 13 October 2020

 Check for updates

Barbara Mikulak-Klucznik¹, Patrycja Gołębiowska¹, Alison A. Bayly², Oskar Popik¹, Tomasz Klucznik¹, Sara Szymkuć¹, Ewa P. Gajewska¹, Piotr Dittwald¹, Olga Staszewska-Krajewska¹, Wiktor Beker¹, Tomasz Badowski¹, Karl A. Scheidt², Karol Molga^{1✉}, Jacek Mlynarski^{1✉}, Milan Mrksich^{2✉} & Bartosz A. Grzybowski^{1,3,4✉}

Training algorithms to computationally plan multistep organic syntheses has been a challenge for more than 50 years^{1–7}. However, the field has progressed greatly since the development of early programs such as LHASA^{1,7}, for which reaction choices at each step were made by human operators. Multiple software platforms^{6,8–14} are now capable of completely autonomous planning. But these programs ‘think’ only one step at a time and have so far been limited to relatively simple targets, the syntheses of which could arguably be designed by human chemists within minutes, without the help of a computer. Furthermore, no algorithm has yet been able to design plausible routes to complex natural products, for which much more far-sighted, multistep planning is necessary^{15,16} and closely related literature precedents cannot be relied on. Here we demonstrate that such computational synthesis planning is possible, provided that the program’s knowledge of organic chemistry and data-based artificial intelligence routines are augmented with causal relationships^{17,18}, allowing it to ‘strategize’ over multiple synthetic steps. Using a Turing-like test administered to synthesis experts, we show that the routes designed by such a program are largely indistinguishable from those designed by humans. We also successfully validated three computer-designed syntheses of natural products in the laboratory. Taken together, these results indicate that expert-level automated synthetic planning is feasible, pending continued improvements to the reaction knowledge base and further code optimization.

Because purely data-oriented artificial intelligence (AI) approaches are not adequate to plan syntheses of complex targets (see Methods for discussion), we have long been developing a hybrid expert–AI system, called Chematica (or Synthia)^{8,9,19–26}. Although Chematica has been effective in the design of syntheses that lead to high-value, medically relevant targets (validated by experiment^{9,20}), its extension to complex natural products—for which the space of synthetic options to explore is orders of magnitude larger (Fig. 1)—has been challenging, and has required numerous improvements. Since the publication of ref. ⁹, the program has been taught an additional roughly 50,000 mechanism-based reaction rules (it now knows more than 100,000), especially stereoselective and scaffold-directed transformations (see Extended Data Fig. 1a and discussion in Methods). The applicability of these high-quality²⁷ rules to specific retrons has been further fine-tuned by the addition of various filters (Extended Data Fig. 1b), which evaluate site- or regio-selectivity, by using either machine-learning²¹ or quantum-chemistry methods⁹, and estimate reaction yields^{28,29}. Sets of heuristic rules gauge whether synthons are prone to (unwanted) side reactions and rearrangements^{8,9} (Extended Data Fig. 1c), whereas molecular-mechanics-derived heuristics help to evaluate the ability

of select classes of synthons to cyclize²⁷. During synthesis planning, decisions about each subsequent reaction move can be made by either heuristic or best-in-class neural-network (Extended Data Fig. 1d) scoring functions²². The exploration of synthetic space is guided by multiple beam-like searches performed simultaneously (Extended Data Fig. 1e), some that search ‘wide’ (to suggest diverse chemistries) and others that search ‘deep’ (to trace pathways to available substrates in the shortest possible time). In our experience, this search strategy worked more effectively for complex targets than did either standard A*^{8,9} or Monte Carlo tree-search^{10,11} algorithms, which we also tested. Finally, if large numbers of viable pathways are found to form a complex graph of solutions, then this graph is searched by another algorithm, which back-propagates from substrates to the product and, in doing so, assigns realistic cost estimates by which the pathways are ranked (see ref. ²³ for details).

With these additions, Chematica began to find routes to some natural products, but produced no results (or only roundabout and unremarkable routes) for others, even when it knew all the individual reactions from which a viable synthesis could have been constructed. These problems were present irrespective of the scoring function used,

¹Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland. ²Department of Chemistry, Northwestern University, Evanston, IL, USA. ³IBS Center for Soft and Living Matter, Ulsan, South Korea. ⁴Department of Chemistry, UNIST, Ulsan, South Korea. ✉e-mail: karolmolga@gmail.com; jacek.mlynarski@gmail.com; milan.mrksich@northwestern.edu; nanogryzbowski@gmail.com

Supplementary information

Computational planning of the synthesis of complex natural products

In the format provided by the authors and unedited

Supplementary Information for

Computational planning of the synthesis of complex natural products.

Barbara Mikulak-Klucznik¹, Patrycja Gołębiowska¹, Alison A. Bayly², Oskar Popik¹, Tomasz Klucznik¹, Sara Szymkuć¹, Ewa P. Gajewska¹, Piotr Dittwald¹, Olga Staszewska-Krajewska¹, Wiktor Beker¹, Tomasz Badowski¹, Karl A. Scheidt², Karol Molga^{1*}, Jacek Mlynarski^{1*}, Milan Mrksich^{2*} & Bartosz A. Grzybowski^{1,3,4*}

¹ Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, ul. Kasprzaka 44/52, Warsaw 01-224, Poland

² Department of Chemistry, Northwestern University, 2145 Sheridan Rd., Evanston, IL 60201, USA

³ IBS Center for Soft and Living Matter and

⁴ Department of Chemistry, UNIST, 50, UNIST-gil, Eonyang-eup, Ulju-gun, Ulsan, 689-798, South Korea

*Correspondence to: karolmolga@gmail.com, jacek.mlynarski@gmail.com, milan.mrksich@northwestern.edu or nanogrzybowski@gmail.com

CONTENTS

S1. Pathways in the Turing Test, answer key, and statistics of results. (pages S3-S28)

S2. Synthesis of Dauricine (pages S29-S51)

S2.1. Details of Chematica's output for the Dauricine pathway.

S2.2. Synthetic details.

S2.3. Raw spectroscopic data.

S3. Synthesis of Tacamonidine (pages S52-S123)

S3.1. Structure of Tacamonidine vs Tacamonine.

S3.2. Existing syntheses of Tacamonine.

S3.3. Literature synthesis of aldehyde **14**.

S3.4. Details of Chematica's output for the Tacamonidine pathway.

S3.5. Synthetic details.

S3.6. Alternative route of obtaining aldehyde **14**.

S3.7. Determination of diastereomeric excess after alkylation reaction.

S3.8. Determination of diastereomeric excess after dihydroxylation reaction.

S3.9. Additional notes on the stereoselective Pictet-Spengler reaction

S3.10. Raw spectroscopic and chromatographic data.

S3.11. Adaptations of the strategy applied to Tacamonidine to others members of the alkaloid families of Eburnamines, Vincamines and Tacamans.

S3.12. Alternative syntheses of Tacamonidine proposed by Chematica.

S4. Synthesis of Lamellodysidine A (pages S124-S140)

S4.1. Details of Chematica's output for the Lamellodysidine A pathway.

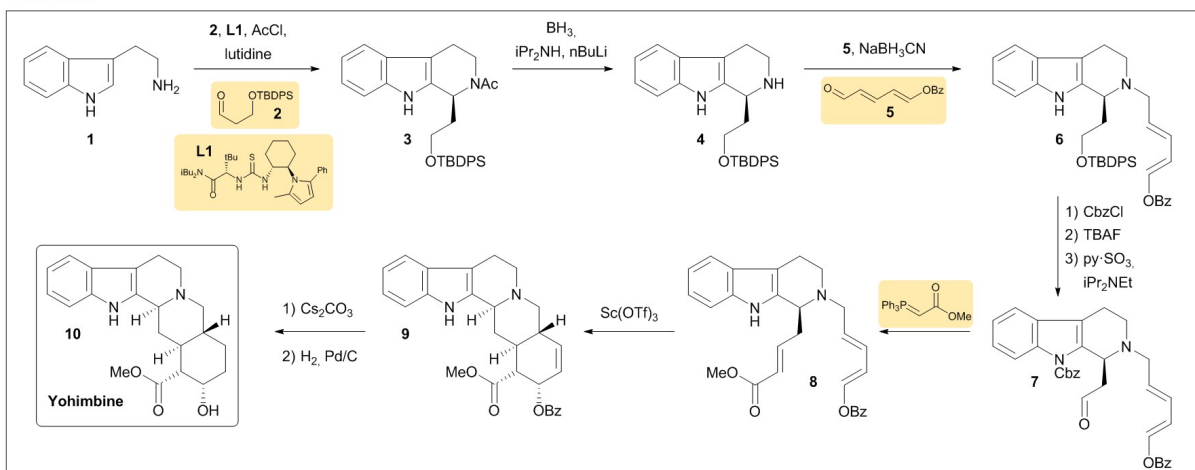
S4.2. Synthetic details.

S4.3. Raw spectroscopic data.

S5. References (pages S141-S144)

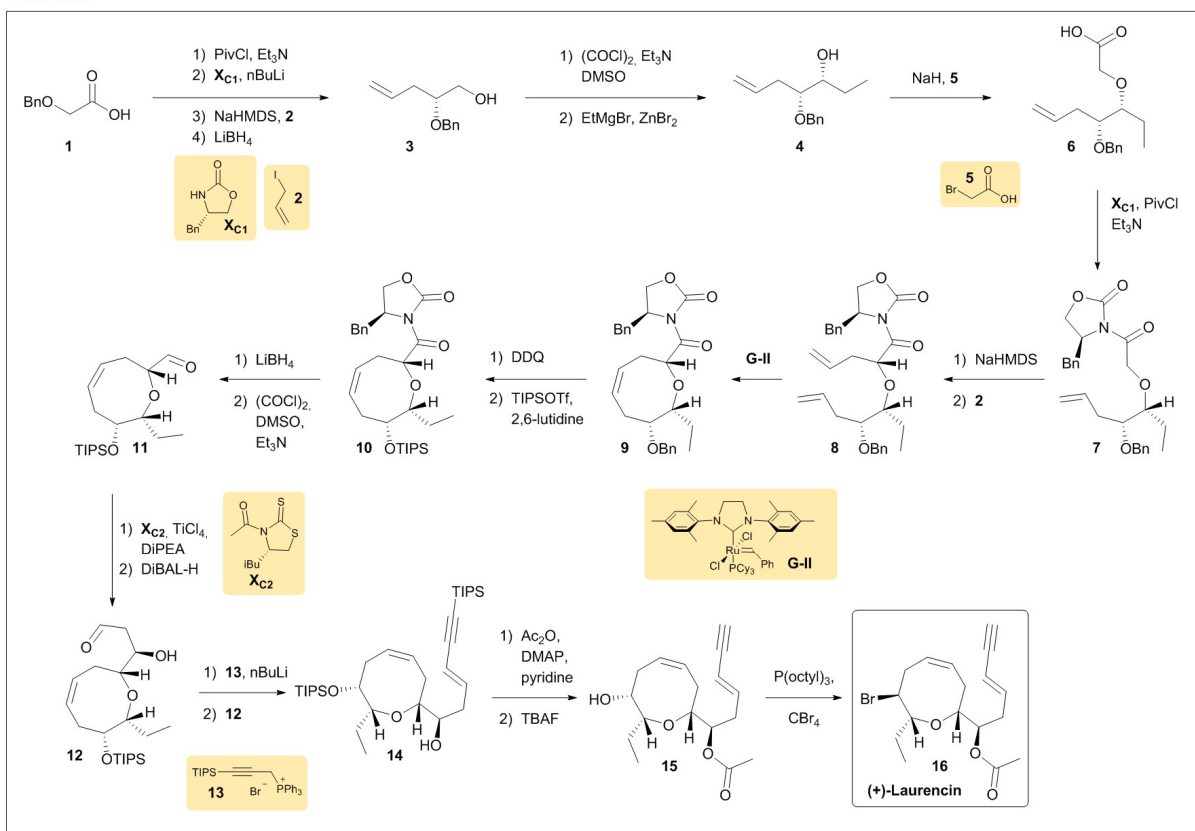
S1. Pathways in the Turing Test, answer key, and statistics of results.

Path 01/40



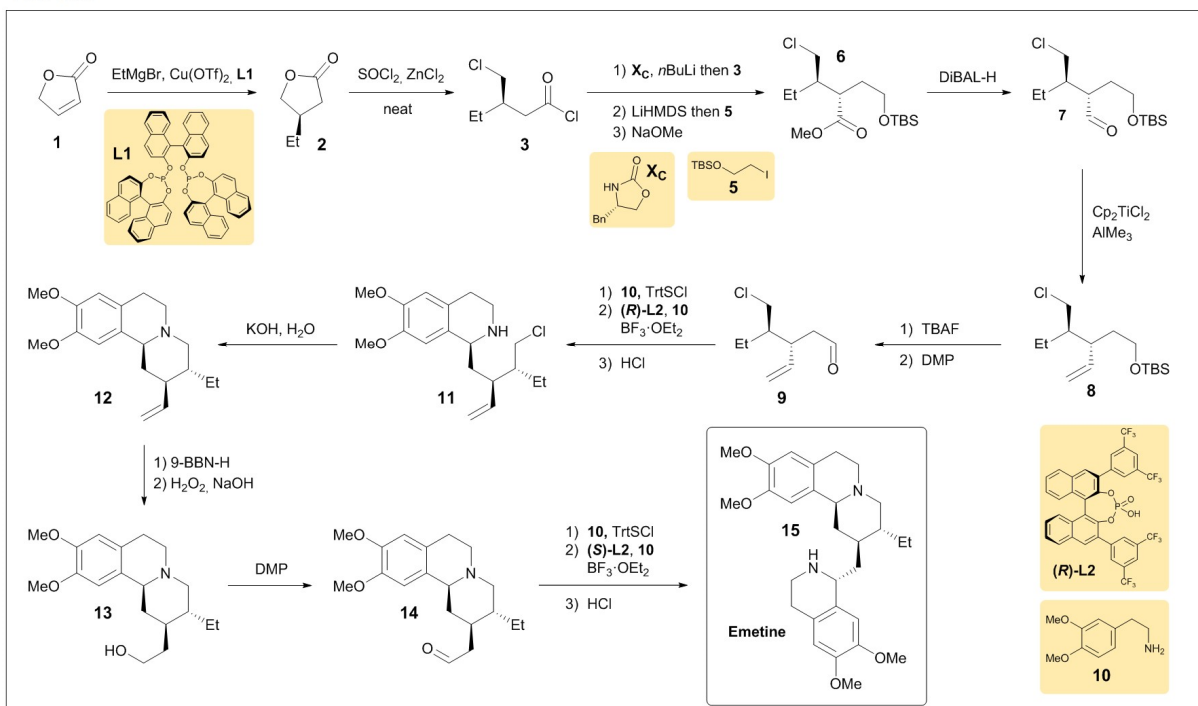
Score: Elegance:

Path 02/40



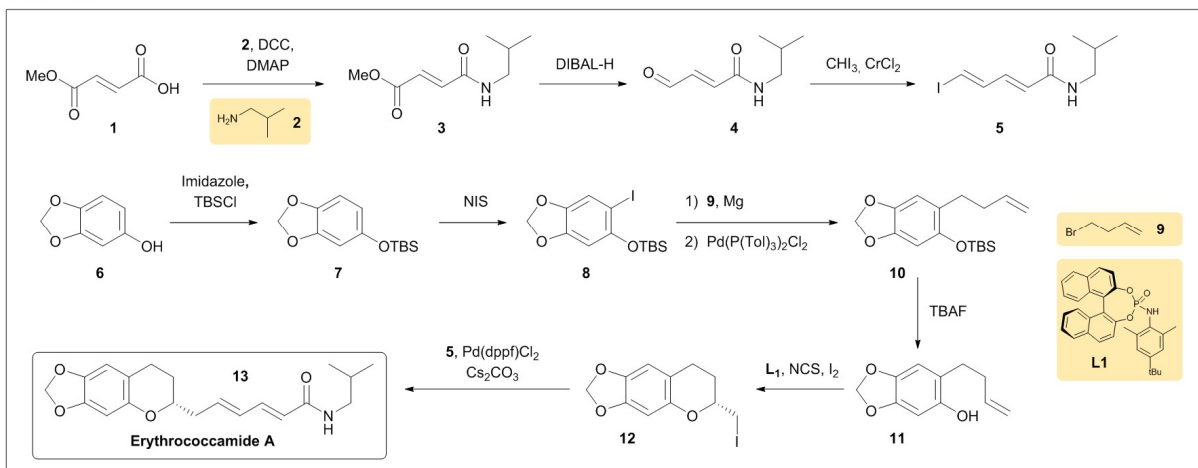
Score: Elegance:

Path 03/40



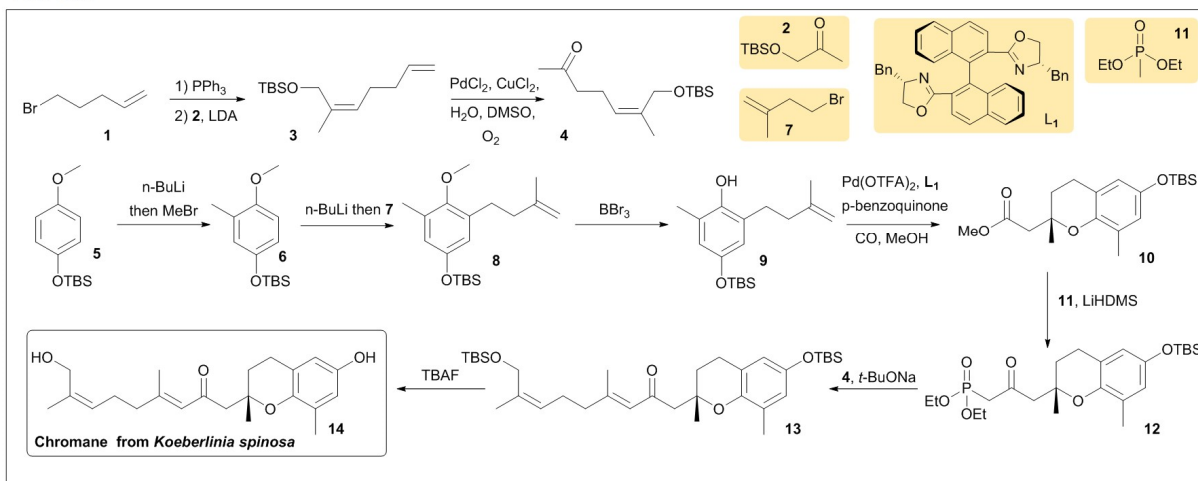
Score: Elegance:

Path 04/40



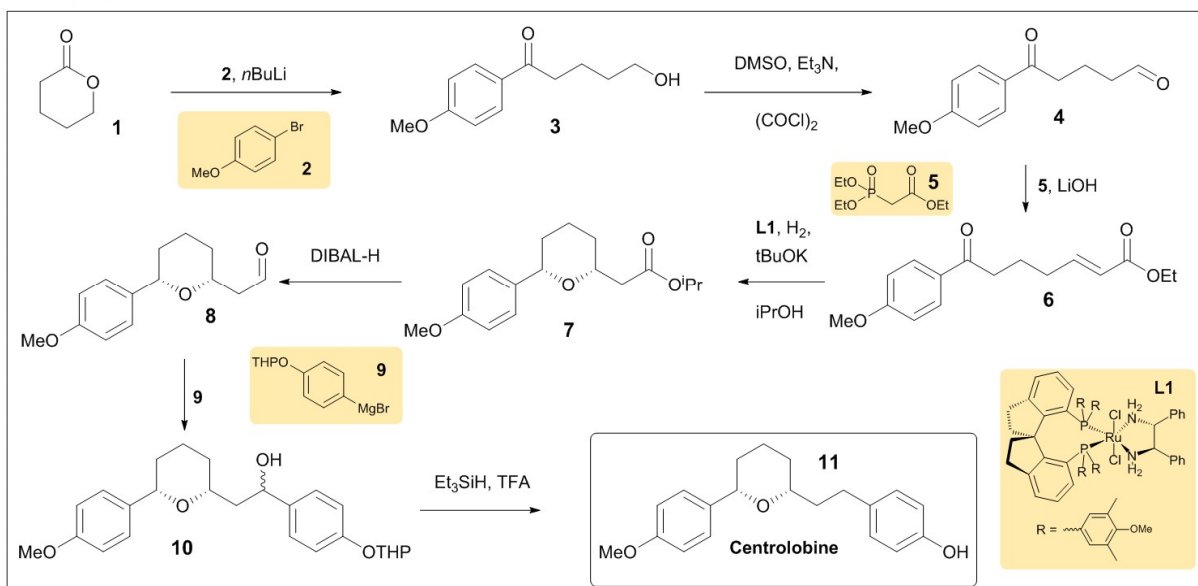
Score: Elegance:

Path 05/40



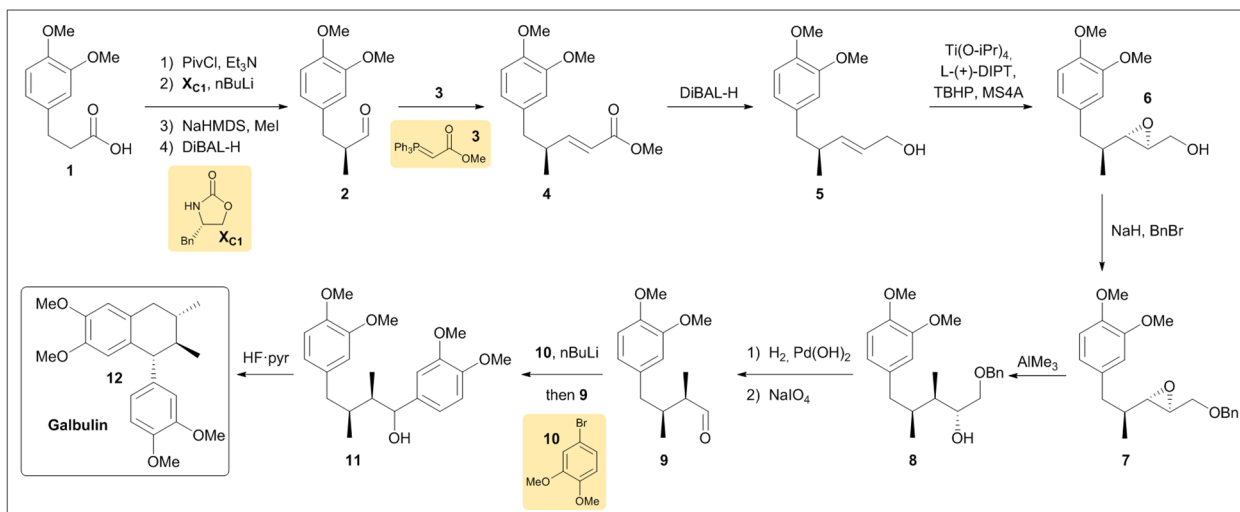
Score: Elegance:

Path 06/40

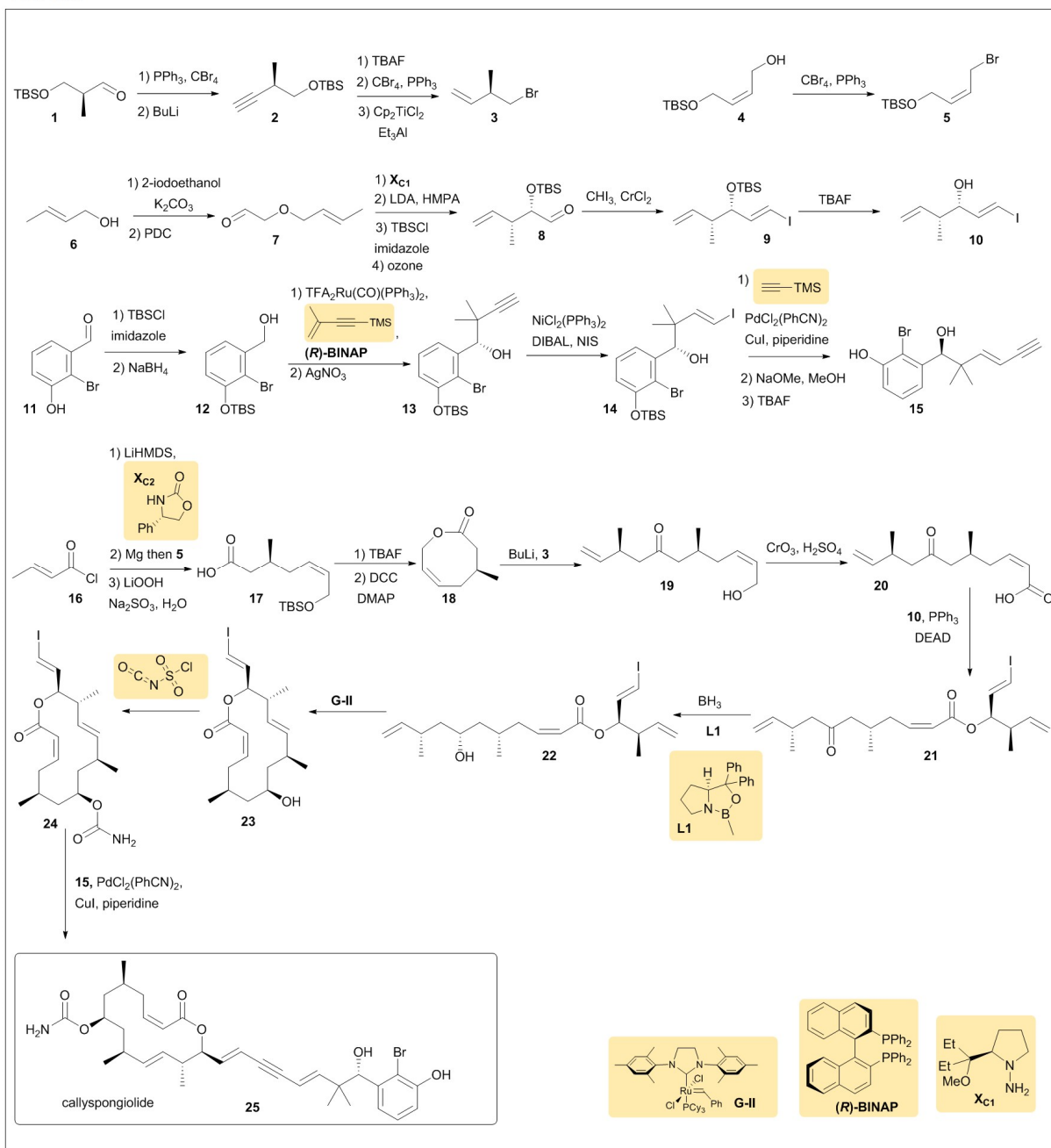


Score: Elegance:

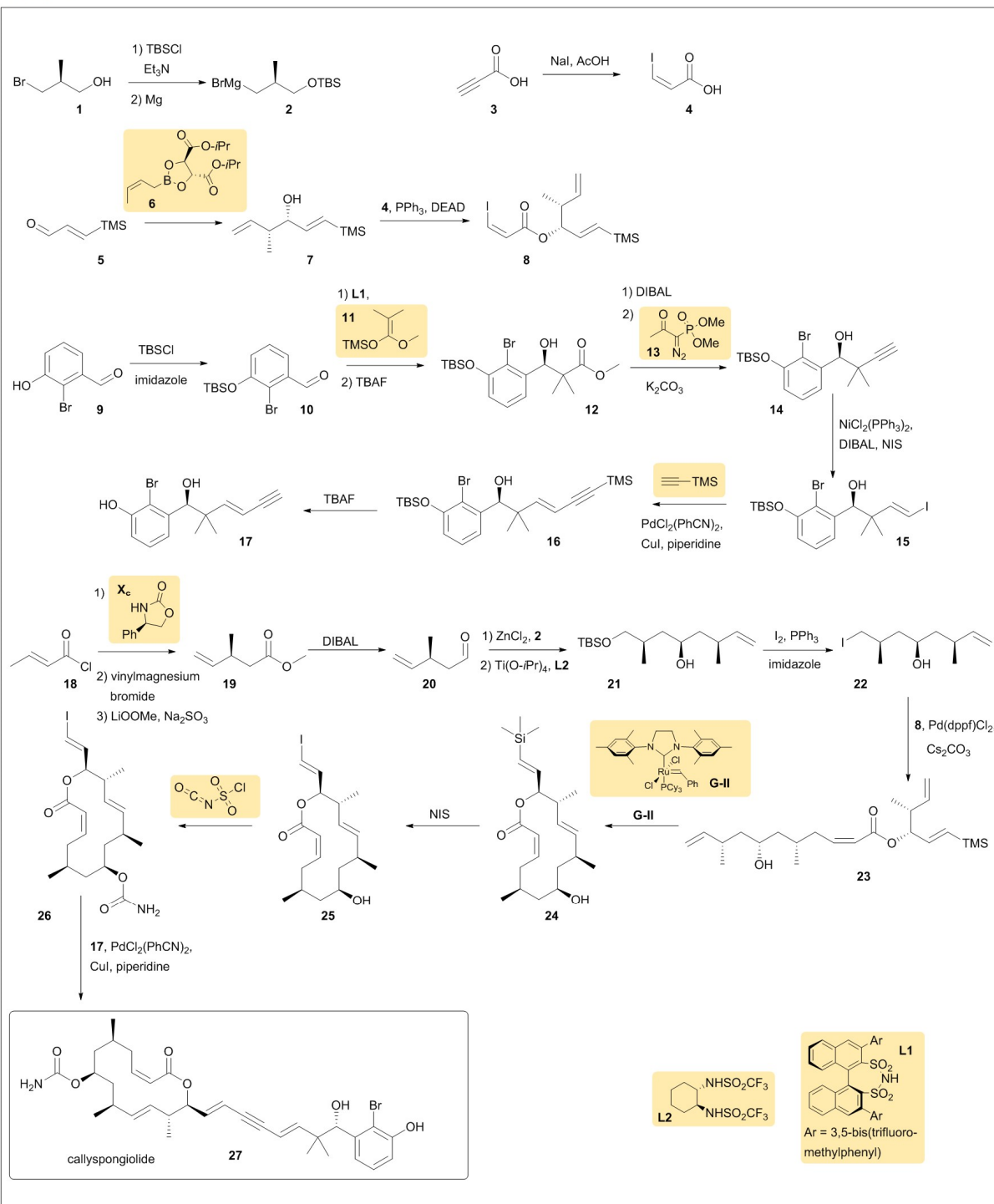
Path 07/40



Score: Elegance:

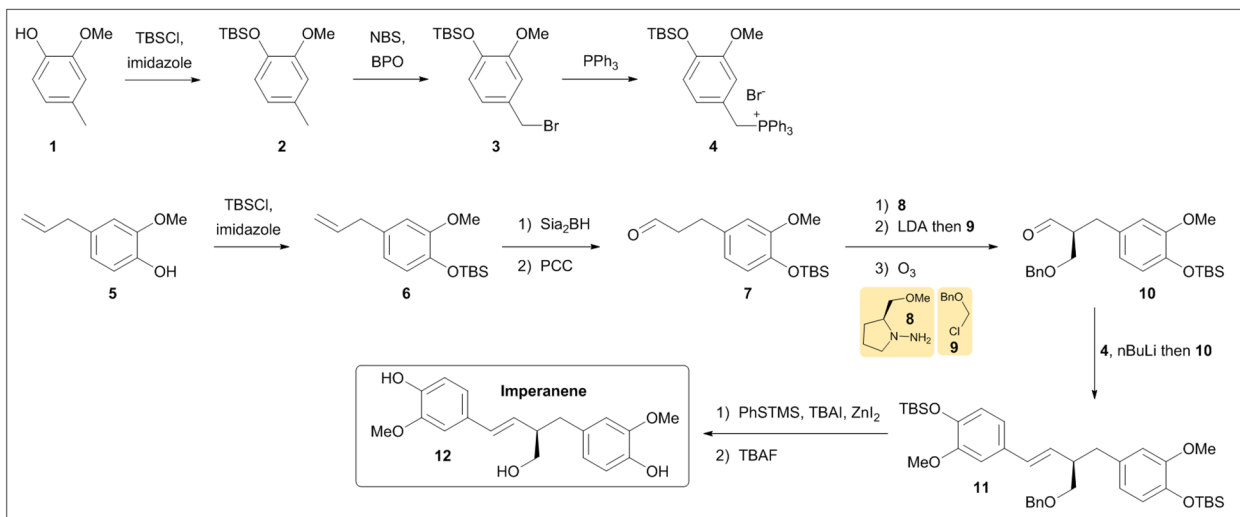


Score: Elegance:



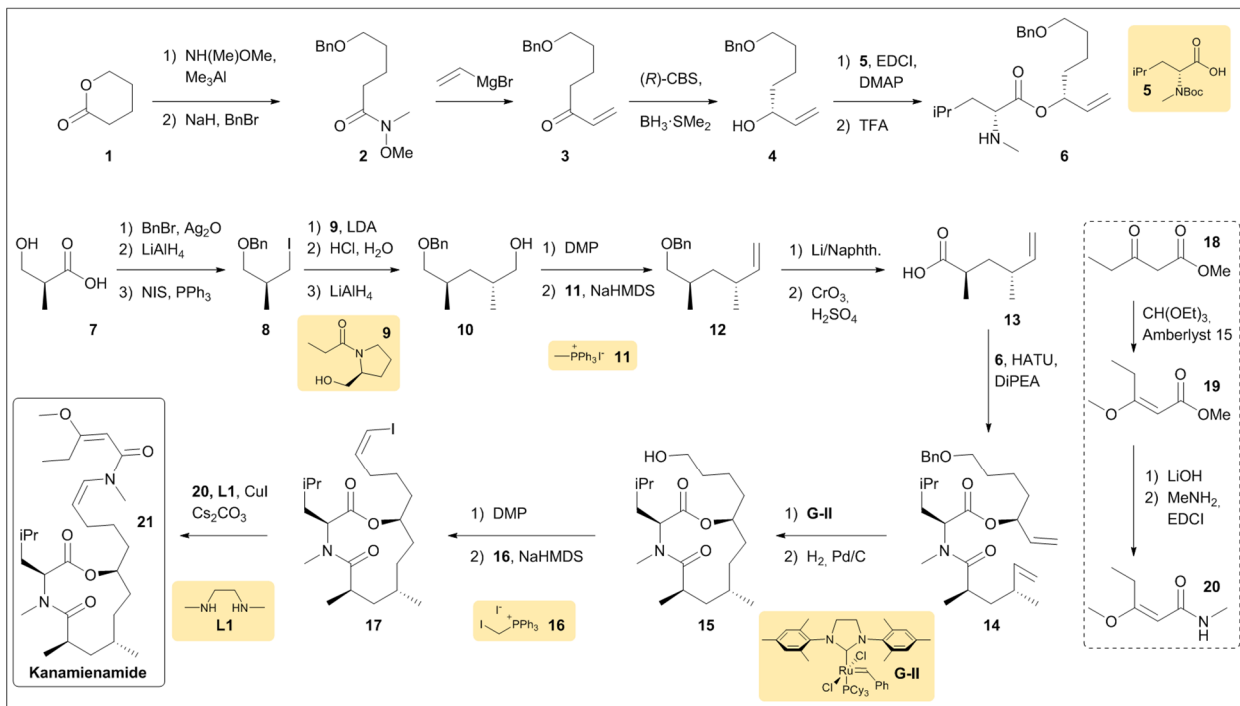
Score: Elegance:

Path 10/40

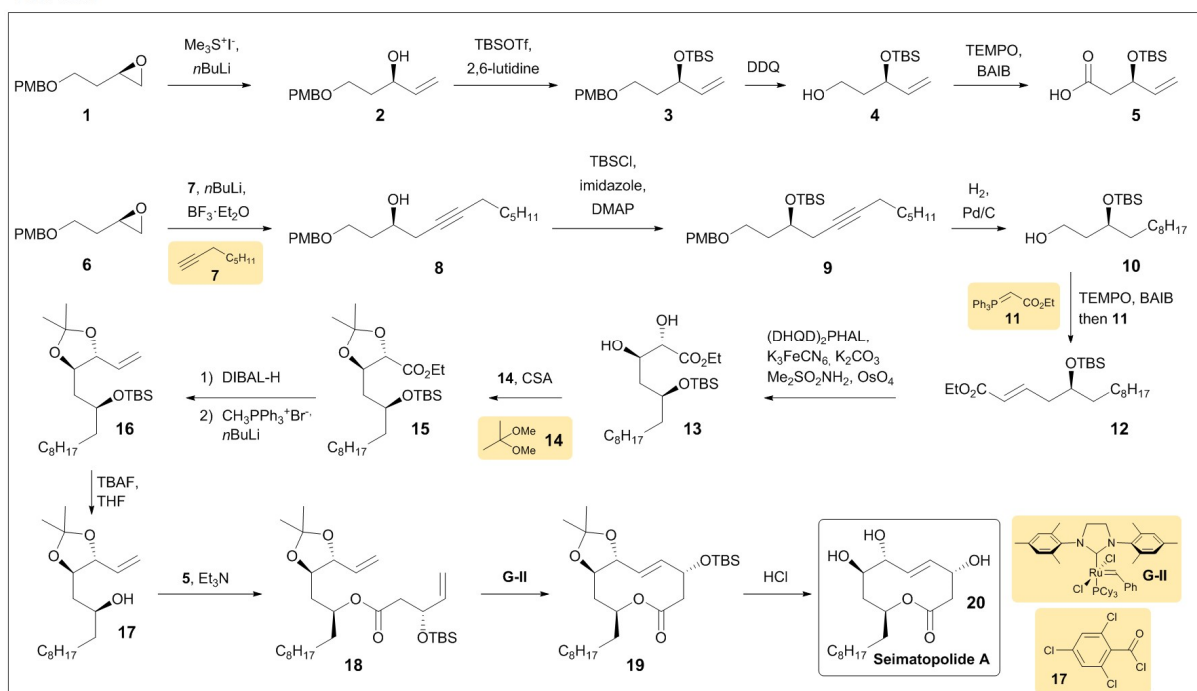


Score: Elegance:

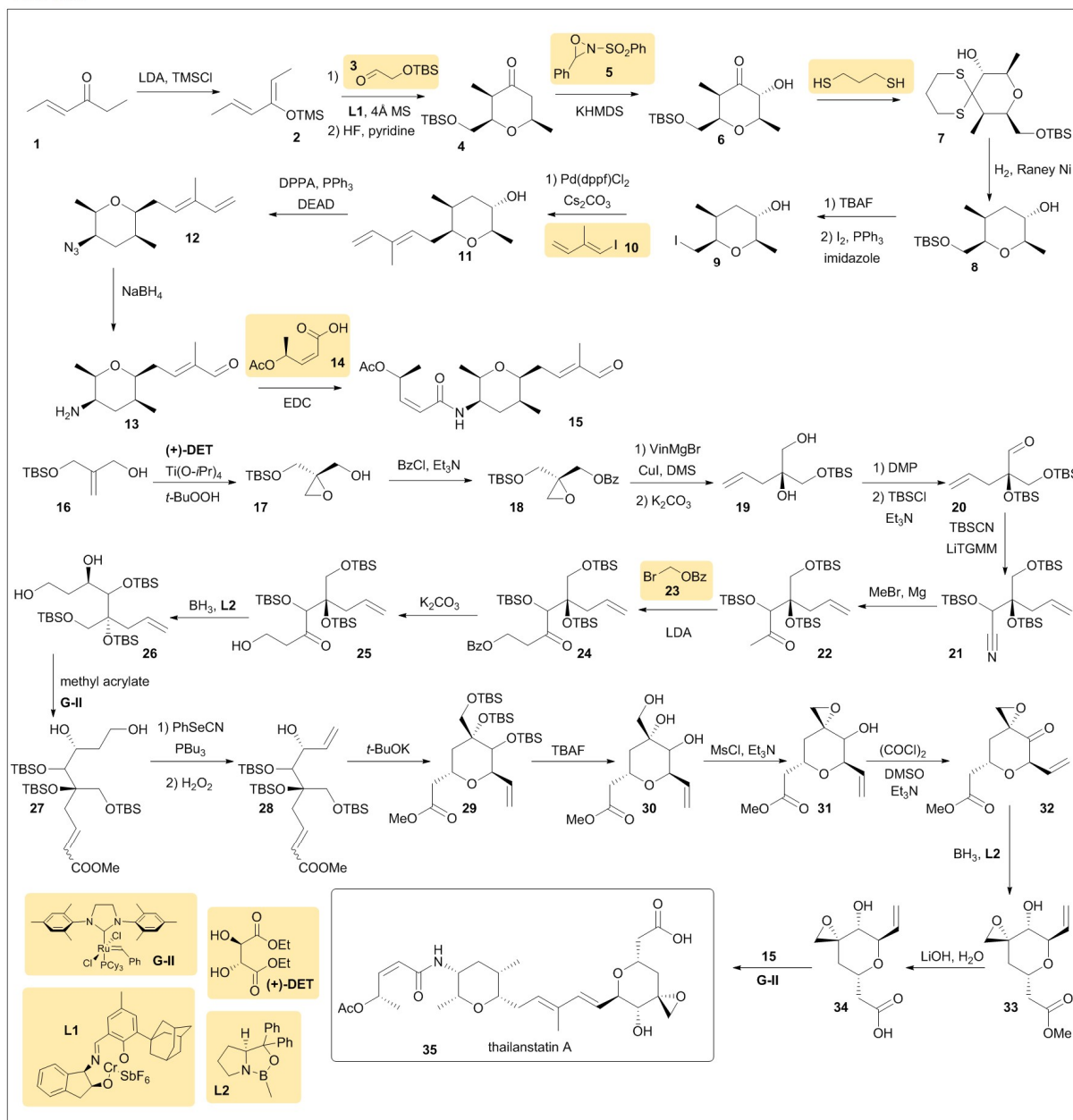
Path 11/40



Score: Elegance:

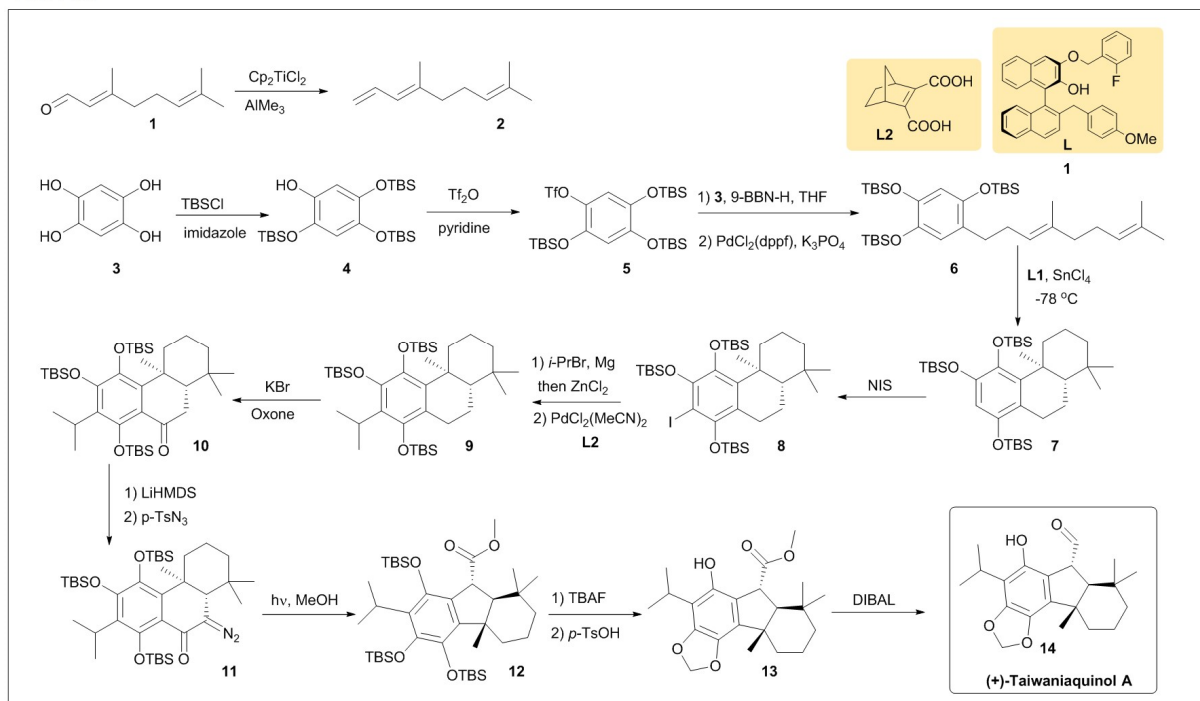


Score: Elegance:

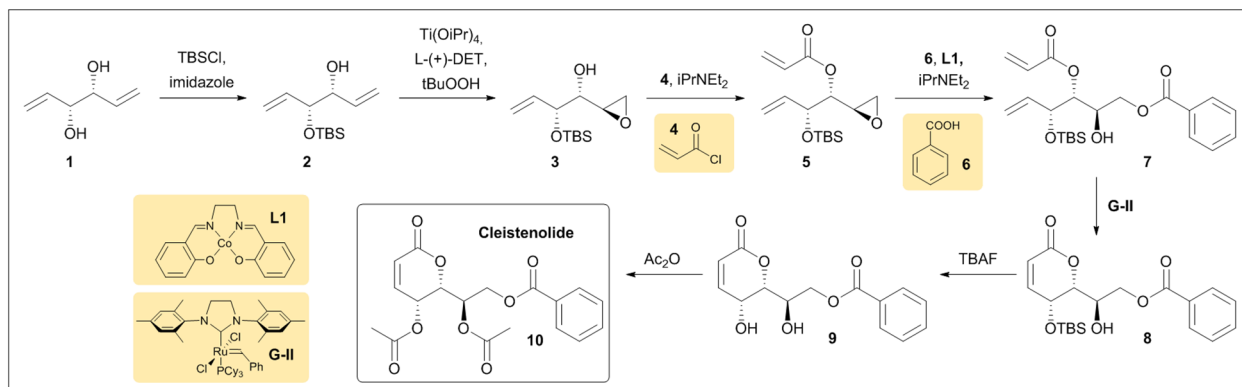


Score: Elegance:

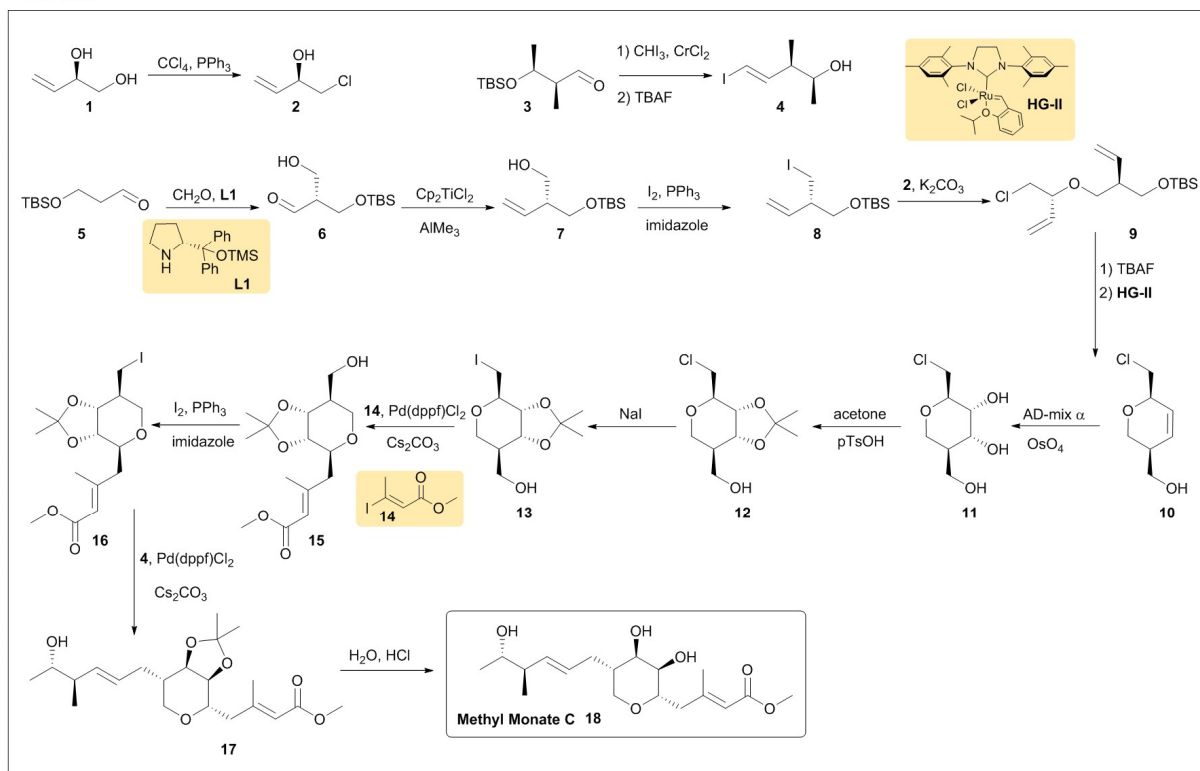
Path 14/40



Path 15/40

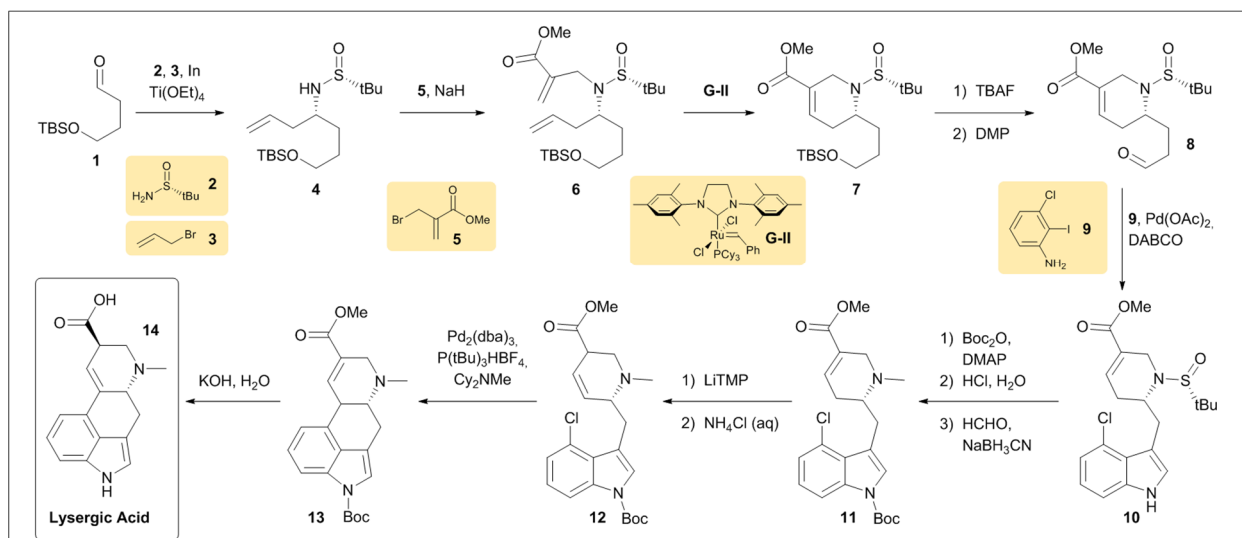


Path 16/40



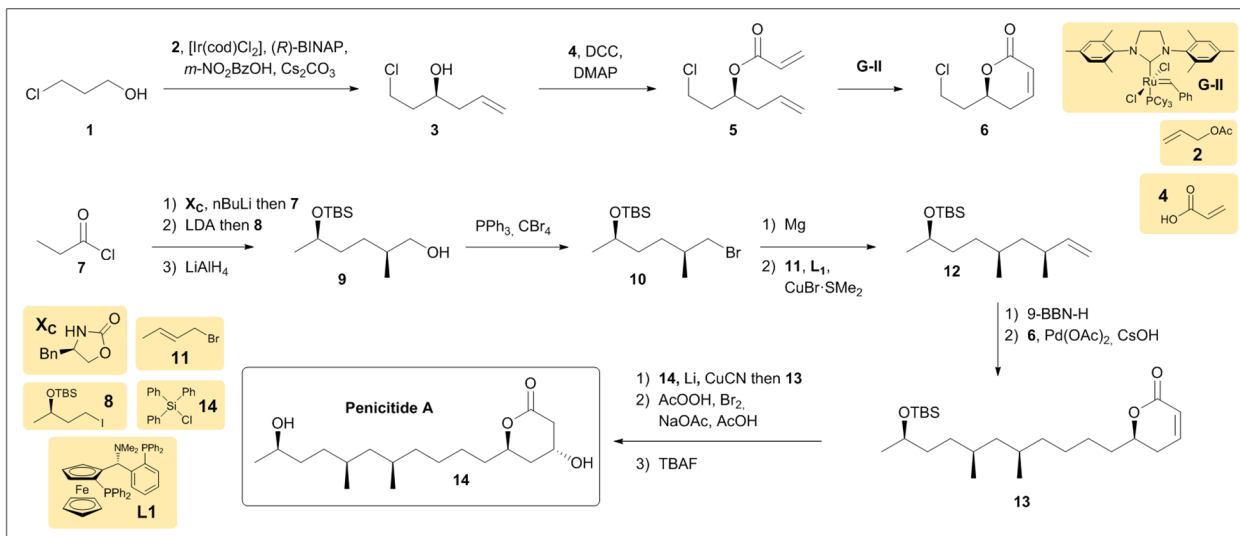
Score: Elegance:

Path 17/40

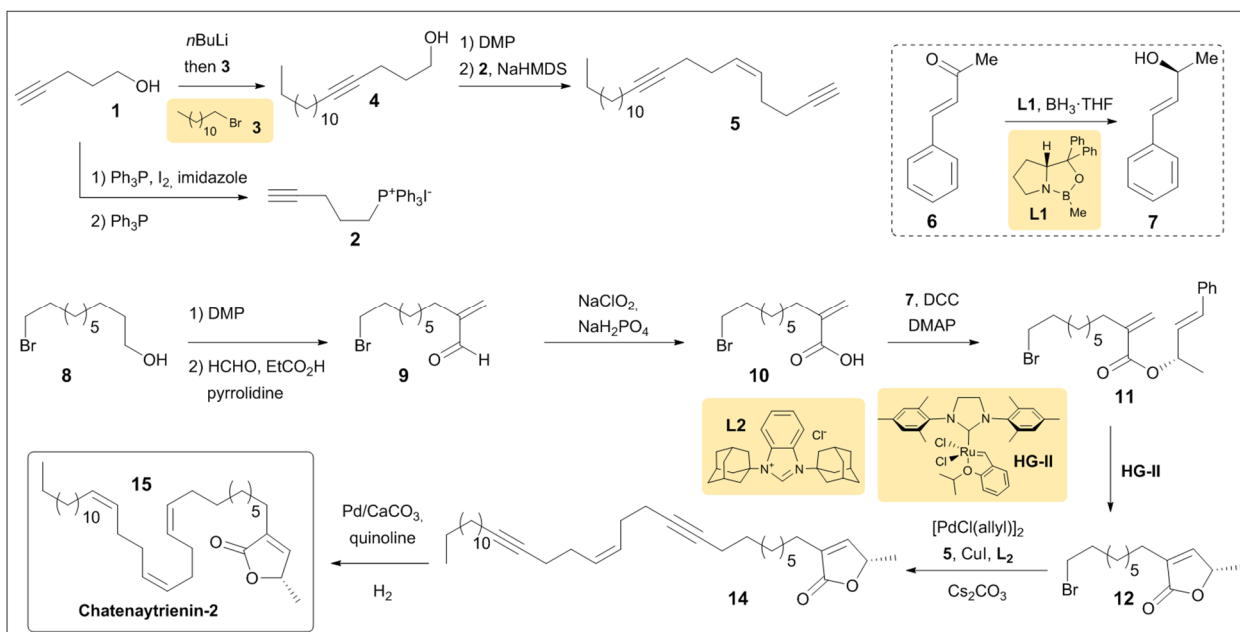


Score: Elegance:

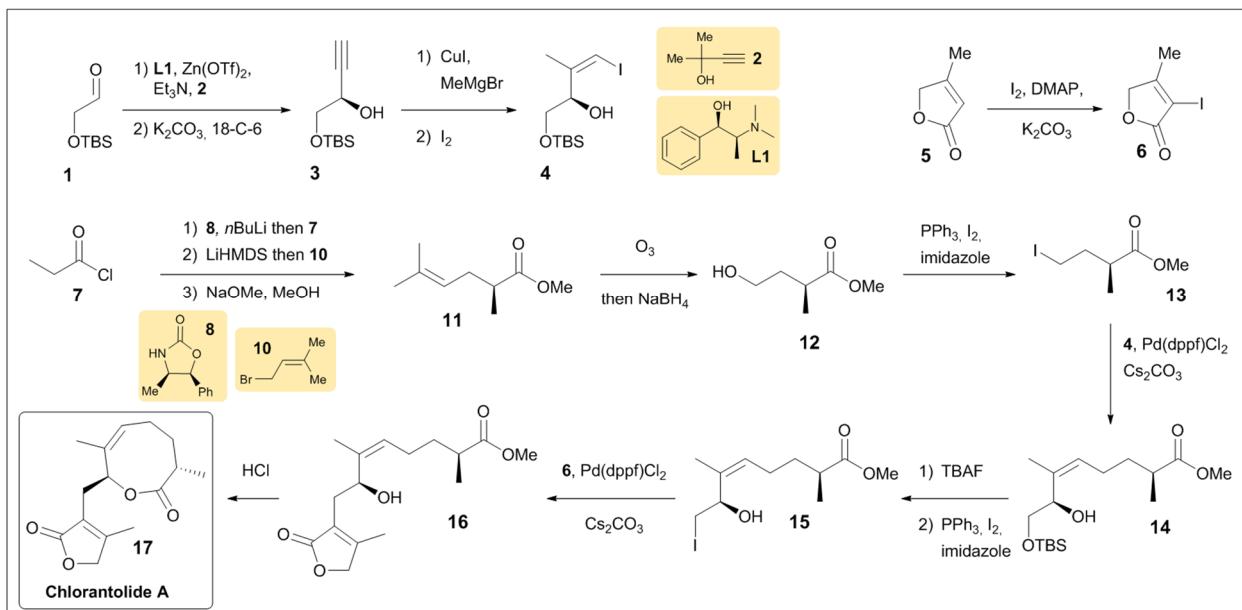
Path 18/40



Path 19/40

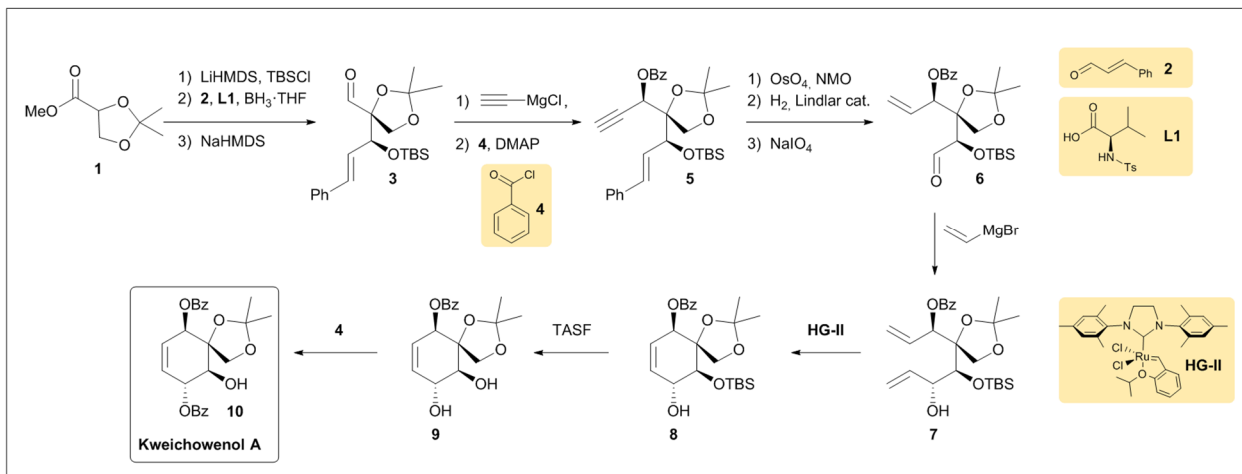


Path 23/40



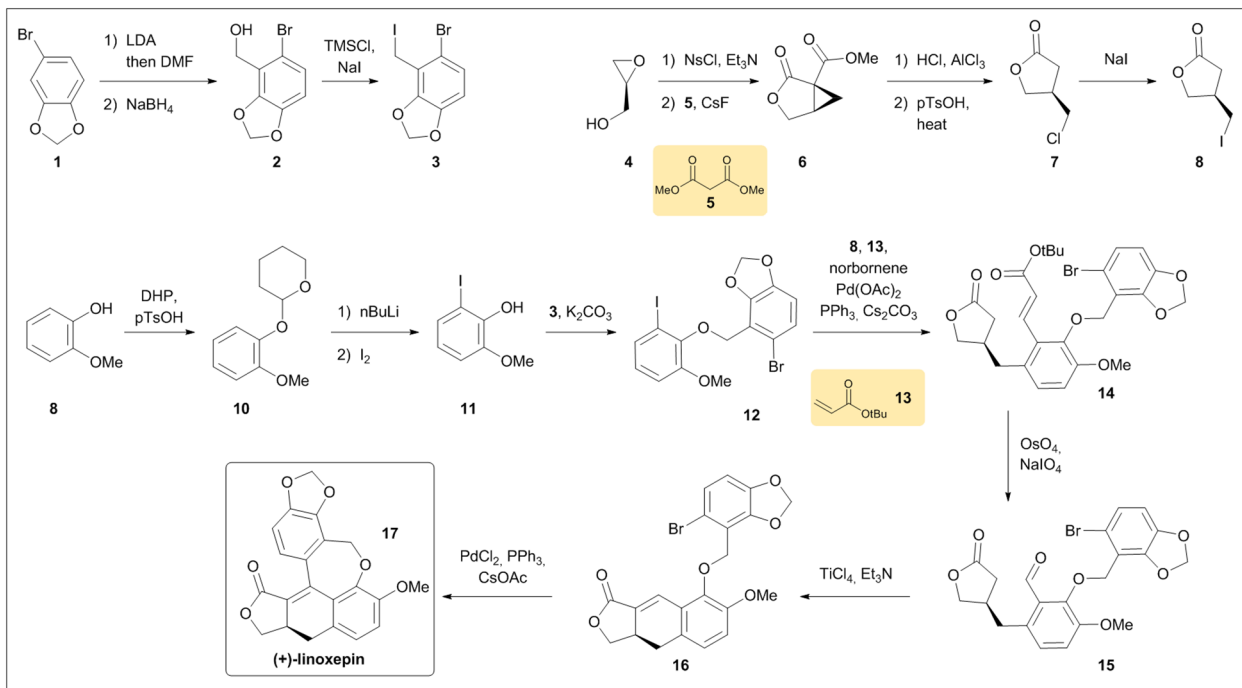
Score: Elegance:

Path 24/40



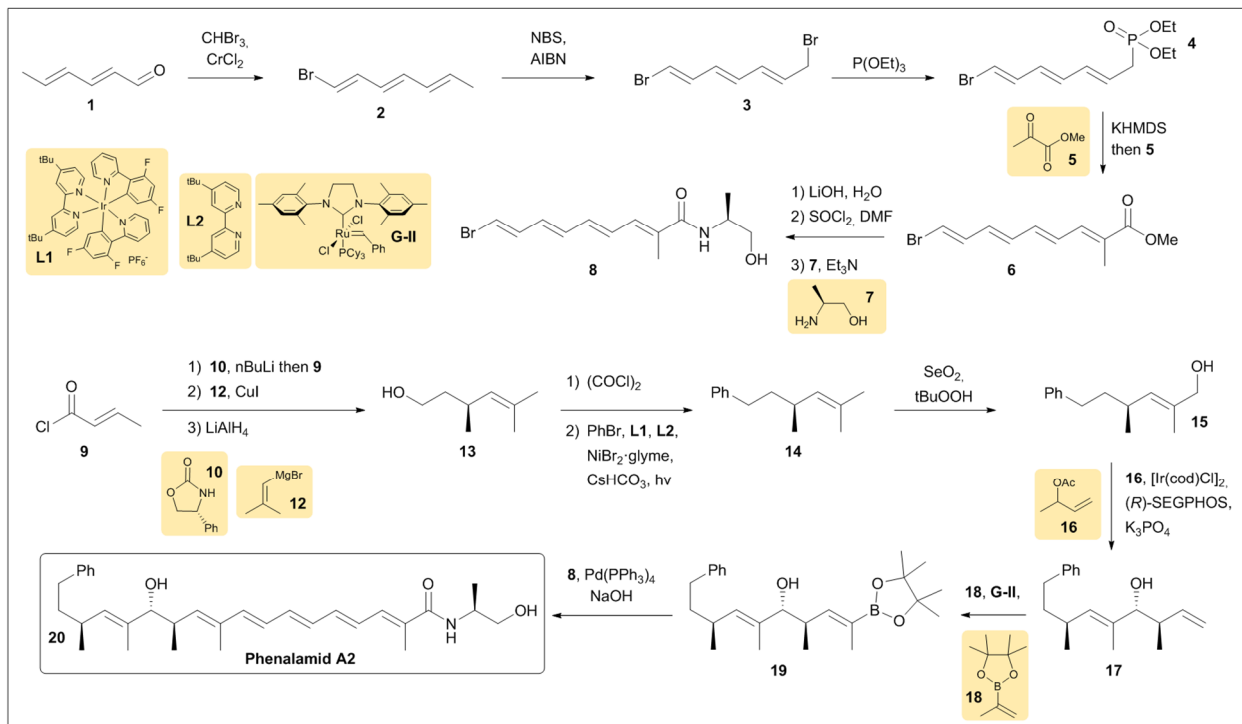
Score: Elegance:

Path 25/40



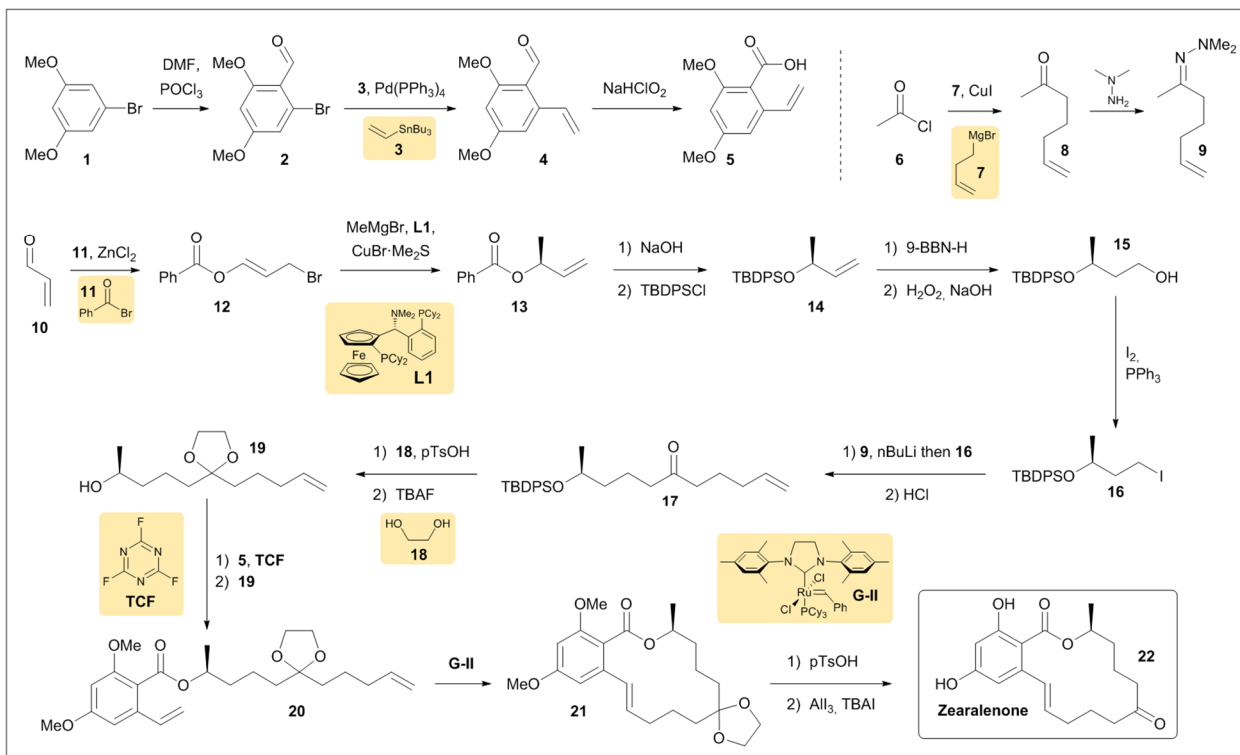
Score: Elegance:

Path 26/40



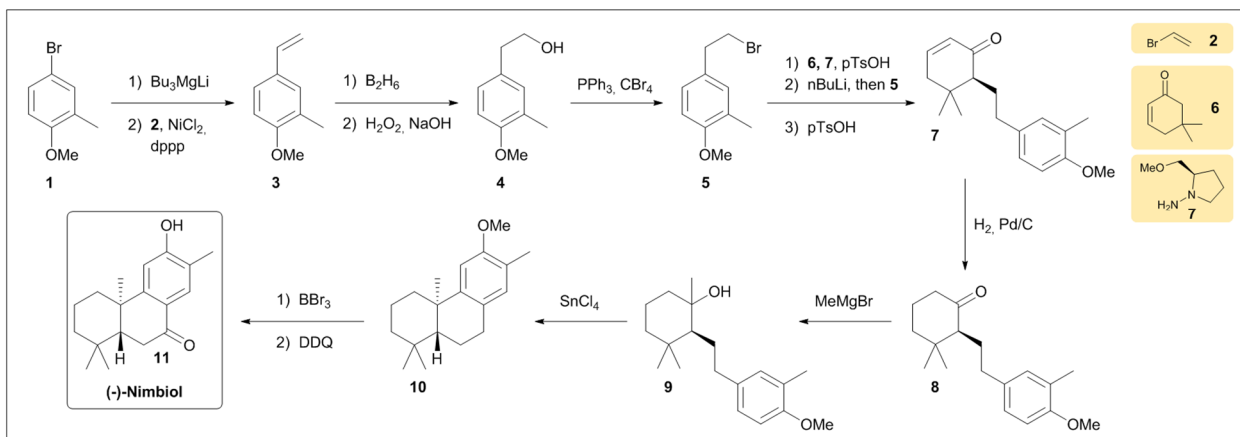
Score: Elegance:

Path 27/40



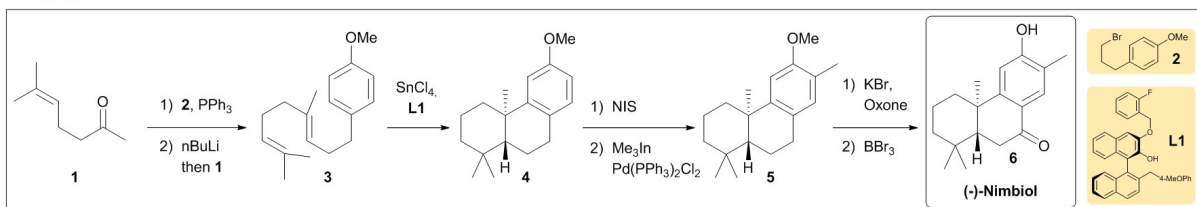
Score: Elegance:

Path 28/40



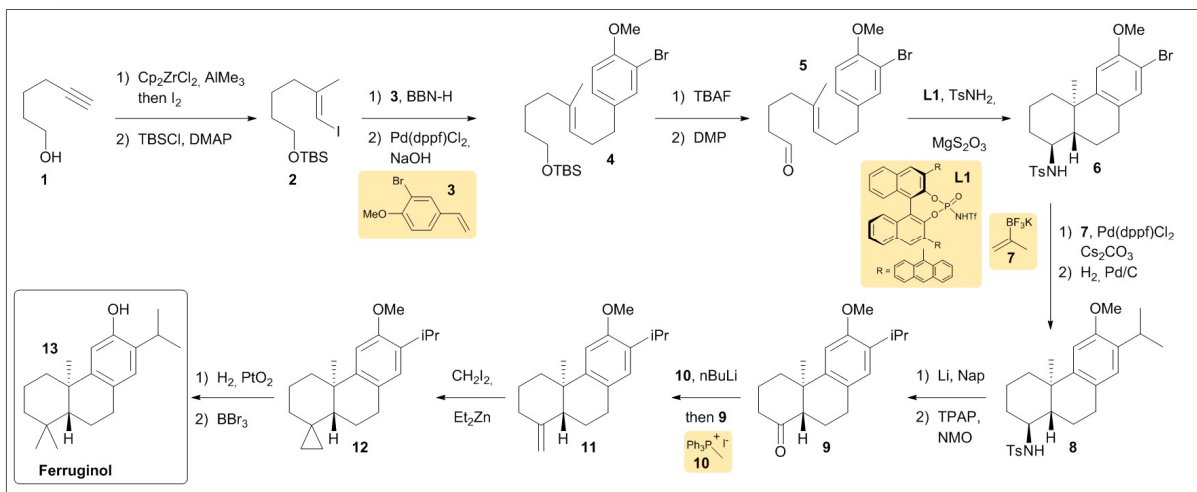
Score: Elegance:

Path 29/40



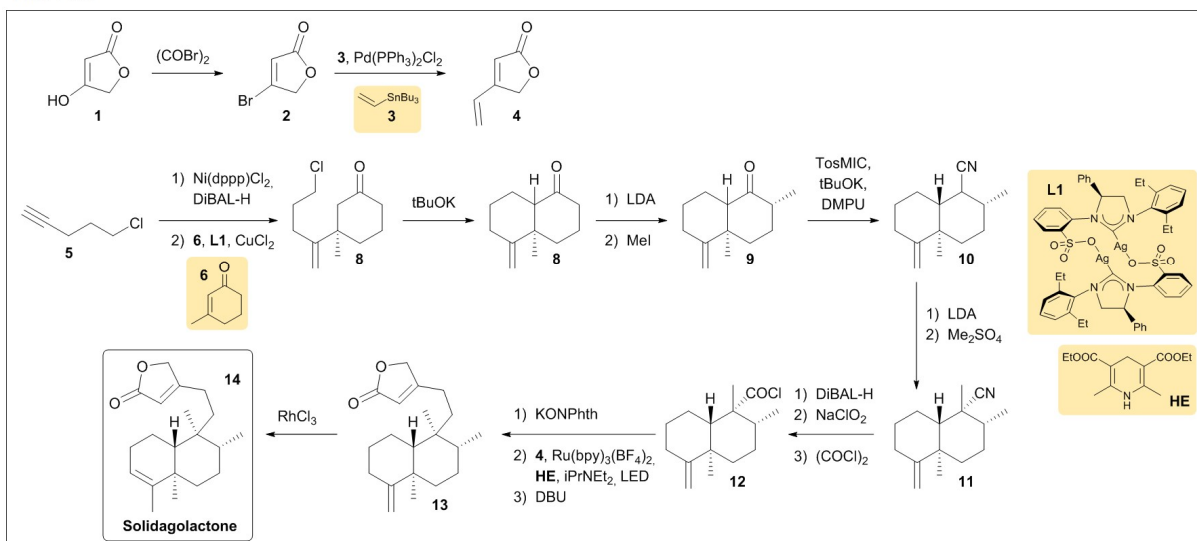
Score: Elegance:

Path 30/40



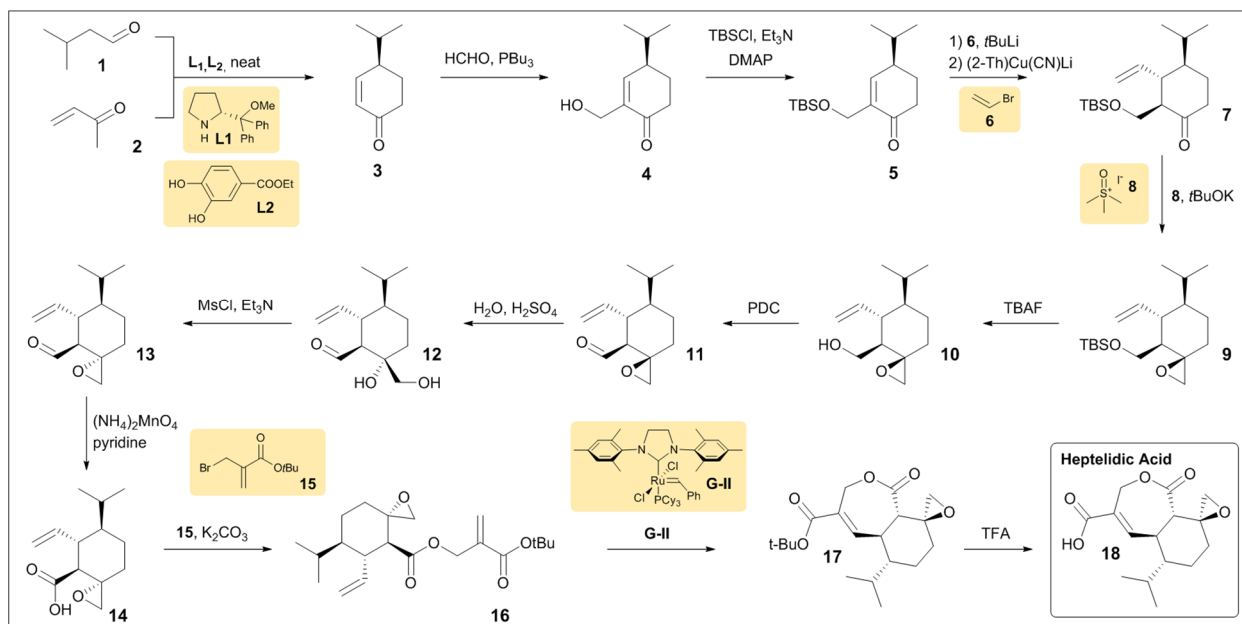
Score: Elegance:

Path 31/40



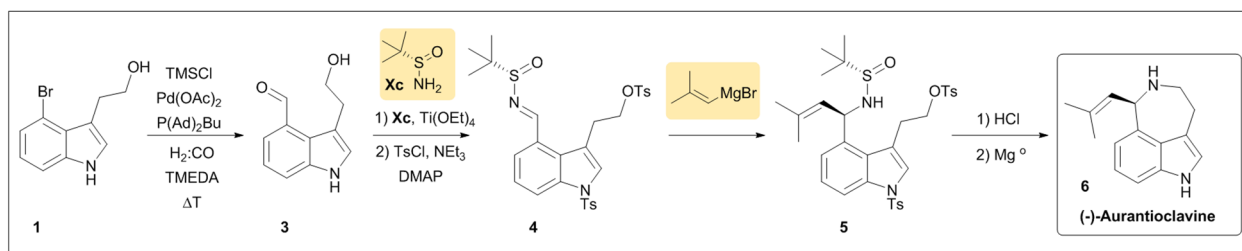
Score: Elegance:

Path 32/40



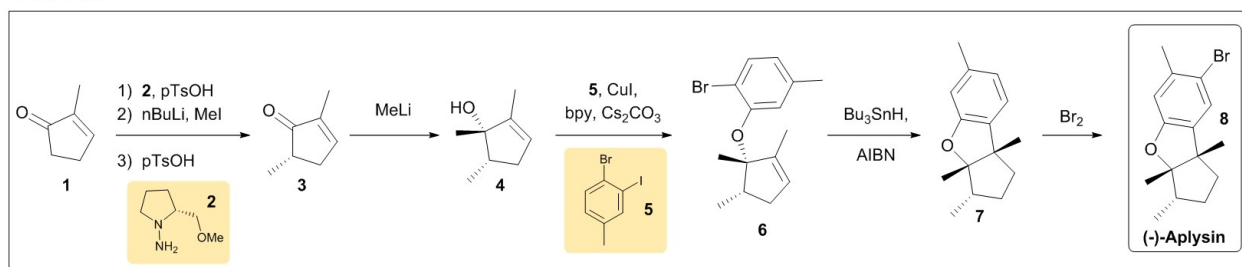
Score: Elegance:

Path 33/40



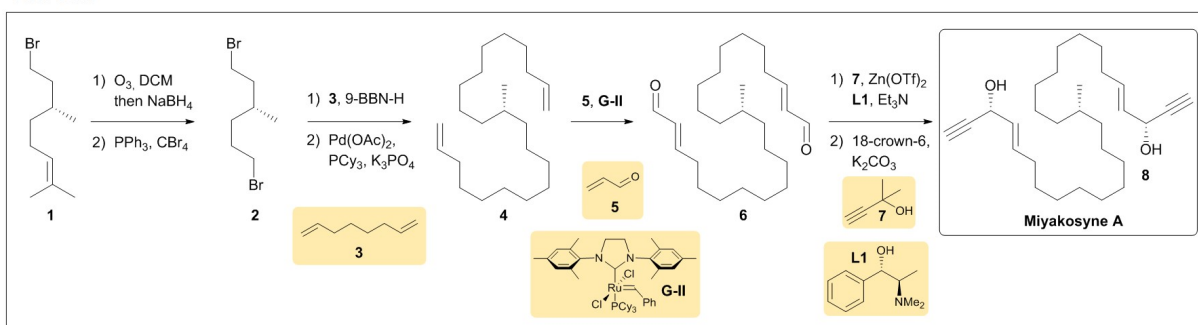
Score: Elegance:

Path 34/40



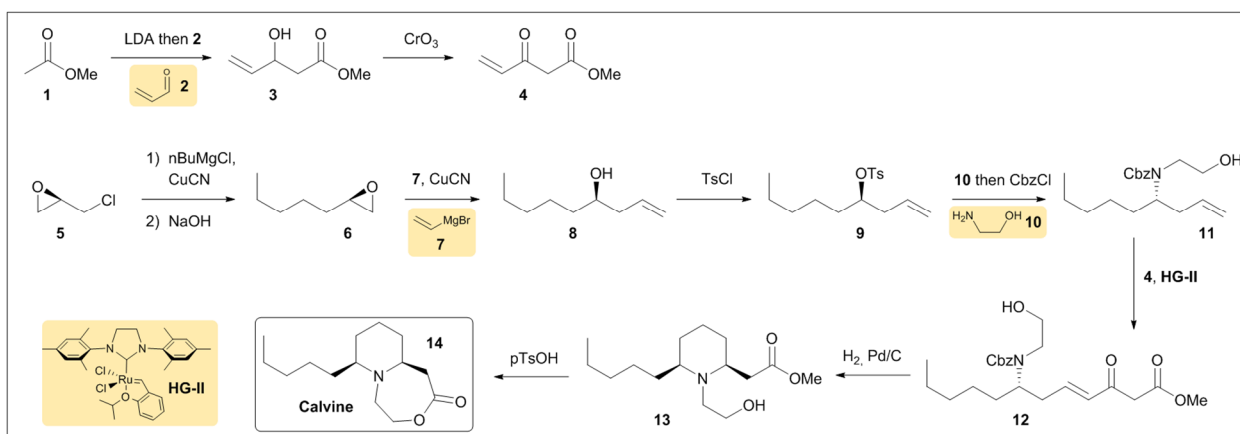
Score: Elegance:

Path 35/40



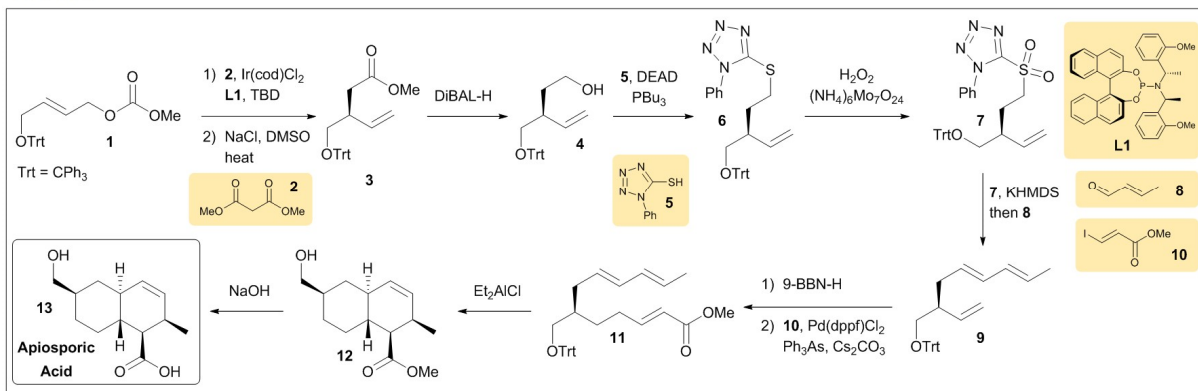
Score: Elegance:

Path 36/40



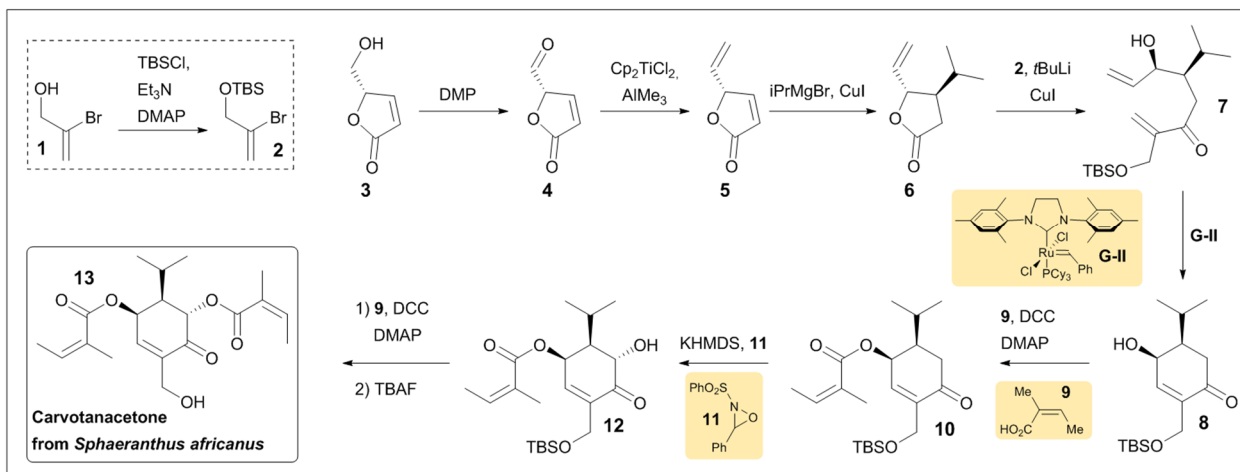
Score: Elegance:

Path 37/40



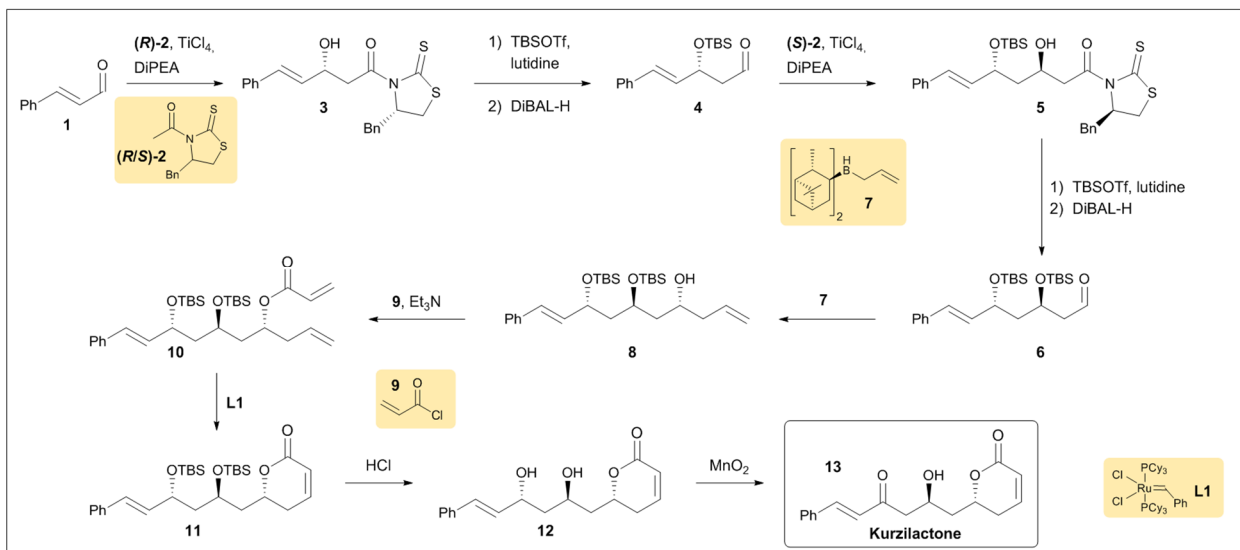
Score: Elegance:

Path 38/40



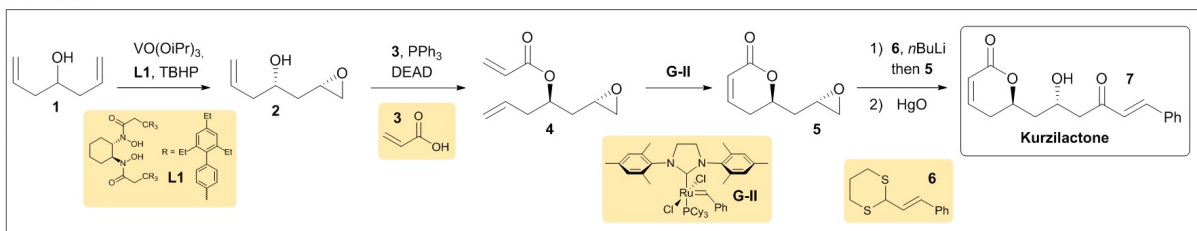
Score: Elegance:

Path 39/40



Score: Elegance:

Path 40/40



Score: Elegance:

ANSWER KEY	Source	Score	Elegance
Path 01: Yohimbine	<i>Org. Lett.</i> 10 , 745–748 (2008).		
Path 02: Laurencin	<i>Org. Lett.</i> 1 , 2029–2032 (1999).		
Path 03: Emetine	Designed by Chematica		
Path 04: Erythrocoamide A	Designed by Chematica		
Path 05: Chromane from <i>K. Spinosa</i>	Designed by Chematica		
Path 06: Centrolobine	<i>Org. Lett.</i> 14 , 4758–4761 (2012).		
Path 07: Galbulin	<i>Tetrahedron Lett.</i> 55 , 6324–6327 (2014).		
Path 08: Callyspongiolide	Designed by Chematica		
Path 09: Callyspongiolide	Designed by Chematica		
Path 10: Imperanene	<i>Org. Lett.</i> 3 , 3021–3023 (2001).		
Path 11: Kanamienamide	<i>J. Org. Chem.</i> 82 , 11262–11268 (2017).		
Path 12: Seimatopolide A	<i>European J. Org. Chem.</i> 2012 , 4910–4913 (2012).		
Path 13: Thailanstatin A	Designed by Chematica		
Path 14: Taiwaniaquinol A	Designed by Chematica		
Path 15: Cleistenolide	<i>J. Org. Chem.</i> 75 , 2389–2394 (2010).		
Path 16: Methyl Monate C	Designed by Chematica		
Path 17: Lysergic Acid	<i>J. Org. Chem.</i> 78 , 10885–10893 (2013).		
Path 18: Penicitide A	Designed by Chematica		
Path 19: Chatenaytrienin-2	<i>J. Org. Chem.</i> 84 , 12216–12220 (2019).		
Path 20: Botryococcene	Designed by Chematica		
Path 21: Dictyodendrin	<i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 54 , 5451–5455 (2015).		
Path 22: Okinonellin B	Designed by Chematica		
Path 23: Chlorantolide A	Designed by Chematica		
Path 24: Kweichowenol A	<i>Synlett.</i> 30 , 383–386 (2019).		
Path 25: Linoxepin	<i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 52 , 5305–5308 (2013).		
Path 26: Phenalamid A2	Designed by Chematica		
Path 27: Zearalenone	<i>Bioorg. Med. Chem.</i> 21 , 5271–5274 (2013).		
Path 28: Nimbiol	Designed by Chematica		
Path 29: Nimbiol	Designed by Chematica		
Path 30: Ferruginol	<i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 57 , 2115–2119 (2018).		
Path 31: Solidagolactone	<i>J. Am. Chem. Soc.</i> 137 , 660–663 (2015).		
Path 32: Heptelidic acid	Designed by Chematica		
Path 33: Aurantioclavine	<i>Org. Lett.</i> 12 , 2004–2007 (2010).		
Path 34: Aplysin	Designed by Chematica		
Path 35: Miyakosyne A	Designed by Chematica		
Path 36: Calvine	<i>Synlett.</i> 2006 , 0487–0489 (2006).		
Path 37: Apiosporic acid	<i>J. Org. Chem.</i> 77 , 4491–4495 (2012).		
Path 38: Carvotanacetone	Designed by Chematica		
Path 39: Kurzilactone	<i>Synthesis (Stuttg.)</i> 44 , 1365–1372 (2012).		
Path 40: Kurzilactone	Designed by Chematica		
SUM:			
AVERAGE (=SUM/20):			

	MW	Heavy Atoms	Chiral Atoms	Hetero-atoms	Aliphatic rings	Total rings	Total rings + Chiral atoms
Path 01: Yohimbine	456,5	34	5	6	3	6	11
Path 02: Laurencin	355,3	21	4	4	1	1	5
Path 03: Emetine	480,6	35	4	6	3	5	9
Path 04: Erythrococcamide A	343,4	25	1	5	2	3	4
Path 05: Chromane from K. Spinosa	358,5	26	1	4	1	2	3
Path 06: Centrolobine	312,4	23	2	3	1	3	5
Path 07: Galbulin	356,5	26	3	4	1	3	6
Path 08: Calyngospiolide	628,6	41	6	8	1	2	8
Path 09: Calyngospiolide	628,6	41	6	8	1	2	8
Path 10: Imperanene	330,4	24	1	5	0	2	3
Path 11: Kanamienamide	492,7	35	4	7	1	1	5
Path 12: Seimatopolide A	328,4	23	4	5	1	1	5
Path 13: Thailanstatin A	535,6	38	9	10	3	3	12
Path 14: Taiwaniaquinol A	344,4	25	3	4	3	4	6
Path 15: Cleistenolide	362,3	26	3	8	1	2	5
Path 16: Methyl Monate C	342,4	24	6	6	1	1	7
Path 17: Lysergic Acid	268,3	20	2	4	2	4	6
Path 18: Peniticide A	314,5	22	5	4	1	1	6
Path 19: Chatenaytrienin-2	512,8	37	1	2	1	1	2
Path 20: Botryococcene	466,8	34	6	0	0	0	6
Path 21: Dictyodendrin	742,7	54	0	13	0	8	8
Path 22: Okinonellin B	400,6	29	4	4	1	2	6
Path 23: Chlorantolide A	264,3	19	2	4	2	2	4
Path 24: Kweichowenol A	424,4	31	4	7	2	4	8
Path 25: Linoxepin	364,3	27	1	6	4	6	7
Path 26: Phenalamid A2	491,7	36	4	4	0	1	5
Path 27: Zearalenone	318,4	23	1	5	1	2	3
Path 28: Nimbiol	272,4	20	2	2	2	3	5
Path 29: Nimbiol	272,4	20	2	2	2	3	5
Path 30: Ferruginol	300,5	22	2	1	2	3	5
Path 31: Solidagolactone	302,5	22	4	2	3	3	7
Path 32: Heptelidic acid	280,3	20	4	5	3	3	7
Path 33: Aurantioclavine	226,3	17	1	2	1	3	4
Path 34: Aplysin	295,2	17	3	2	2	3	6
Path 35: Miyakosine A	428,7	31	3	2	0	0	3
Path 36: Calvine	239,4	17	2	3	2	2	4
Path 37: Apiosporic acid	224,3	16	5	3	2	2	7
Path 38: Carvotanacetone	364,4	26	3	6	1	1	4
Path 39: Kurzilactone	286,3	21	2	4	1	2	4
Path 40: Kurzilactone	286,3	21	2	4	1	2	4
Human (average)	360,2	25,95	2,55	4,70	1,50	2,95	5,50
Machine (average)	390,0	27,50	3,80	4,50	1,50	2,15	5,90

Figure S1. Statistics of natural products used as targets in chemical Turing test.

	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20
Path 1	2		0	5	0	5	1	5	0	3	7	8	9	3	2	2	10	8		
Path 2	2	2	0	5	8	7	2	4	0	9	0	9	1	8	1	8	0	2		
Path 3	2	7	0	5	8	3	6	2	1	4	1	8	8	8	3	9	10	7		
Path 4	6	9	0	5	9	5	8	1	1	7	8	3	1	3	0	8	0	2		
Path 5	5	10	10	5	5	5	8	7	0	2	7	8	1	7	3	3	10	9		
Path 6	7	1	10	5	4	2	9	4	1	8	3	9	10	2	7	9	0	5		
Path 7	3	2	10	5	8	8	7	7	1	3	0	9	0	7	7	3	10	10		
Path 8	3	1	0	3	5	7	2	0	3	2	0	2	0	3	2	2	10	3		
Path 9	2	8	0	5	3	4	9	0	2	7	0	9	9	2	8	3	10			
Path 10	3	1	10	5	5	8	2	8	3	5	1	9	9	5	7	9	0	7		
Path 11	7	1	0	5	5	7	3	1	3	5	0	3	2	3	2	3	10	9		
Path 12	4	7	0	5	3	2	2	7	3	7	1		9	3	4	4	0	8		
Path 13	2	8		3	2	4	8	0	3	2	6	9	8	3	8	3	10	2		
Path 14	6	1	10	5	0	1	1	0	2	2	9	2	8	8	8	2	0	9		
Path 15	5	1	10	5	7	3	8	5	1	4	8	9	1	5	1	1	0	1		
Path 16	2	8	10	5	10	8	9	8	4	5	10	9	10	7	4	2	10	8		
Path 17	8	1	10	5	4	2	8	8	3	3	4	5	5	8	8	2	10	8		
Path 18	8	2	10	5	2	8	7	8	3	3	0	10	9	7	2	8	10	5		
Path 19	8	1	10	5	7	9	7	5	3	5	0	8	2	5	6	3	10	3		
Path 20	6	8	10	4	5	2	7	1	2	7	0	2	9	7	7	7	10	9		
Path 21	3	1	10	5	0	5	5	0	7	5	9	2	0	2		0	10	7		
Path 22	7	9	10	5	6	2	7	5	2	7	8	9	10	8		7	10	2		
Path 23	5	8		5	5	7	8	2	3	7	4	10	9	8		2	10			
Path 24	3	1	10	5	5	7	7	8	5	9	8	10	0	3		6	10	2		
Path 25	6	9		5	5	3	8	5	2	7	5	9	0	5		2	0	8		
Path 26	3	2	10	5	3	2	8	0	2	5	0	2	9	3		3	10	8		
Path 27	2	8	10	5	8	5	3	1	2	6	0	2	0	3		2	10	6		
Path 28	2	2	0	5	7	5	2	1	3	5	5	9	9	2		8	0	8		
Path 29	4	8	10	5	2	2	8	1	2	3	8	5	1	7		2	10	3		
Path 30	2	2	0	5	3	5	2	1	2	4	2	2	1	7		3	10	8		
Path 31	3	1		5	5	5	3	7	6	2	1	9	2	5		3	0	5		
Path 32	1	8	10	5	6	3	3	1	3	2	2	9	8	5		8	0	4		
Path 33	4	1	0	5	0	2	8	0	2	4	3	2	1	2		2	10	1		
Path 34	8	1	10	5	5	5	7	5	2	9	8	4	9	7		3	10	5		
Path 35	5	7		5	5	2	8	1	2	5	9	10	9	8		8	10	6		
Path 36	2	8		5	8	5	8	5	7	7	8	8	1	9		7	0	7		
Path 37	8	1	10	5	7	8	7	5	2	3	9	10	0	5		3	10	3		
Path 38	5	8	10	5	6	6	8	7	4	3	8	10	7	2		8	0			
Path 39	3	2	0	5	5	5	4	7	2	5	0	0	0	0		2	10			
Path 40	7	0	0	5	5	2	8	1	7	3	10	0	0	5		2	10			

Figure S2. Human vs. Machine scores assigned by all experts who took the Synthesis Turing Test. Literature pathways are highlighted in red, pathways designed by Chematica are highlighted in blue. Red-on-red or blue-on-blue = correct classification; “Hard to tell” scores of 5 are in gray font. Since the test was timed, some experts did not provide answers within the 3 min time limit. One expert completed half of the test (first 20 pathways).

Path 1	4		7	2	8	5	7	8	9	5	5	2	4	2	5	5	8	3		
Path 2	3	4	2	2	6	4	3	3	6	3	0	0	2	2	7	4	4	2		
Path 3	3	4	4	2	4	7	4	3	8	5	1	2	1	2	4	3	8	4		
Path 4	7	5	4	2	2	8	3	8	6	4	2	1	2	4	7	4	8	5		
Path 5	6	6	6	4	4	2	5	5	8	6	9	2	4	2	7	6	8	4		
Path 6	6	5	6	2	3	9	5	4	6	3	4	1	3	5	6	2	6	4		
Path 7	3	3	6	3	2	3	6	3	5	7	0	2	3	4	3	3	5	5		
Path 8	7	2	2	4	3	3	5	3	6	3	0	2	4	4	3	7	6	3		
Path 9	5	5	3	2	5	4	4	3	6	4	0	1	4	6	5	6	9			
Path 10	2	6	7	1	2	3	2	4	5	3	4	1	3	3	6	2	8	3		
Path 11	7	4	4	1	3	3	3	7	5	5	0	1	1	6	5	6	6	2		
Path 12	2	3	4	2	2	8	3	2	5	4	1		3	3	7	5	6	2		
Path 13	1	5		3	5	3	3	5	5	2	5	1	3	1	7	7	5	5		
Path 14	7	6	6	6	8	9	9	8	7	6	8	3	5	4	3	8	7	1		
Path 15	7	8	8	2	3	8	7	5	8	5	8	2	5	2	8	5	4	2		
Path 16	3	5		3	2	3	2	5	5	4	5	2	3	3	4	6	7	2		
Path 17	6	7	8	2	5	7	7	5	6	6	3	2	5	4	6	6	7	4		
Path 18	6	5	3	2	5	2	4	5	6	6	2	2	3	3	7	5	6	4		
Path 19	9	7	5	3	3	8	5	7	6	5	5	4	4	4	5	5	5	3		
Path 20	2	5	6	3	3	4	4	3	6	4	0	1	4	5	7	4	7	2		
Path 21	6	7	8	2	9	8	6	7	8	3	9	3	7	7		8	3	1		
Path 22	8	5	6	3	3	8	3	4	7	4	8	2	2	4		5	5	2		
Path 23	5	8		2	3	7	4	6	7	5	4	2	3	3		6	6			
Path 24	2	6	4	4	4	7	5	3	8	4	5	1	2	3		4	9	3		
Path 25	8	6		2	8	3	2	6	7	6	5	3	4	8		6	7	5		
Path 26	3	8	4	3	7	7	4	3	7	3	2	2	1	5		6	5	2		
Path 27	3	6	6	2	3	2	4	2	4	4	0	3	3	5		6	6	3		
Path 28	7	7	8	2	3	8	5	7	7	5	5	2	6	6		4	5	3		
Path 29	7	8	8	1	5	8	7	9	8	6	2	4	7	8		6	6	4		
Path 30	2	8	4	2	6	1	2	4	7	5	2	3	6	2		6	7	4		
Path 31	4	7		1	7	7	4	3	8	7	8	2	4	4		7	7	3		
Path 32	2	4	6	2	3	7	6	4	8	7	2	2	6	5		5	4	2		
Path 33	8	7	8	0	6	9	7	5	5	4	6	3	5	5		6	7	6		
Path 34	8	7	6	2	6	7	6	6	8	5	6	4	2	10		6	5	5		
Path 35	8	7		4	7	9	7	7	8	4	9	5	8	2		4	7	4		
Path 36	6	2		2	3	5	3	4	7	2	3	3	6	2		5	7	3		
Path 37	8	7	8	2	4	5	4	5	8	7	9	2	7	8		6	6	4		
Path 38	5	7	7	2	4	4	3	5	8	4	8	0	2	4		5	6			
Path 39	1	3	6	0	3	2	2	5	4	4	0	0	4	2		6	10			
Path 40	9	9	6	0	4	8	7	6	5	8	10	0	3	3		6	5			

Figure S3. Elegance scores assigned by all experts who took the Synthesis Turing Test. Literature pathways are highlighted in red, pathways designed by Chematica are highlighted in blue. Red-on-red or blue-on-blue = correct classification; “Hard to tell” scores of 5 are in gray font. Since the test was timed, some experts did not provide answers within the 3 min time limit. One expert completed half of the test (first 20 pathways).

Average for human	4,25	2,68	5,88	5,00	4,85	5,15	5,20	4,65	2,75	5,20	3,45	6,47	2,65	4,50	4,50	3,70	6,00	5,68				4,58
Average for machine	4,45	5,75	6,47	4,75	4,95	4,15	6,60	2,55	2,55	4,50	5,15	6,50	6,70	5,50	4,50	4,90	7,50	5,63				5,17
Average elegance in human	4,85	5,58	5,94	1,85	4,50	5,35	4,35	4,60	6,35	4,60	3,85	2,00	4,05	4,05	5,80	5,15	6,40	3,26				4,55
Average elegance in machine	5,45	5,90	5,31	2,60	4,30	5,90	4,75	5,25	6,80	4,75	4,40	2,00	3,65	4,20	5,40	5,45	6,25	3,25				4,75
# of human predicted as machine	6	4	10	0	7	7	10	7	3	7	6	12	4	5	5	5	12	11				121
# of human predicted as human	13	15	7	0	7	6	9	7	16	8	13	6	15	9	5	15	8	6				165
# of machine predicted as human	9	7	6	3	6	11	4	14	19	10	8	7	5	7	6	11	5	6				144
# of machine predicted as machine	7	13	11	0	7	5	16	4	1	6	11	12	15	11	4	9	15	8				155
# of hard to tell (5 & no answer)	5	0	0	37	13	11	1	8	1	9	2	2	1	8	0	0	0	4				102

Figure S4. Statistics of individual experts and averages and sums for the entire Test (right column).

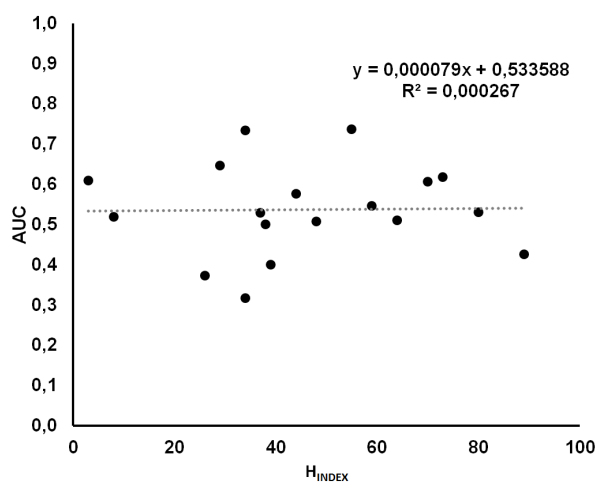


Figure S5. Statistics of Turing test responders. Vertical axis plots the area under the curve, AUC, values as in the main-text **Figure 2c**. H-indices were retrieved from Web of Science Core Collection (www.webofknowledge.com) accessed July 10, 2020. This plot is also included as an inset in **Figure 2c**.

S2. Synthesis of Dauricine.

S2.1. Details of Chematica's output for the Dauricine pathway.

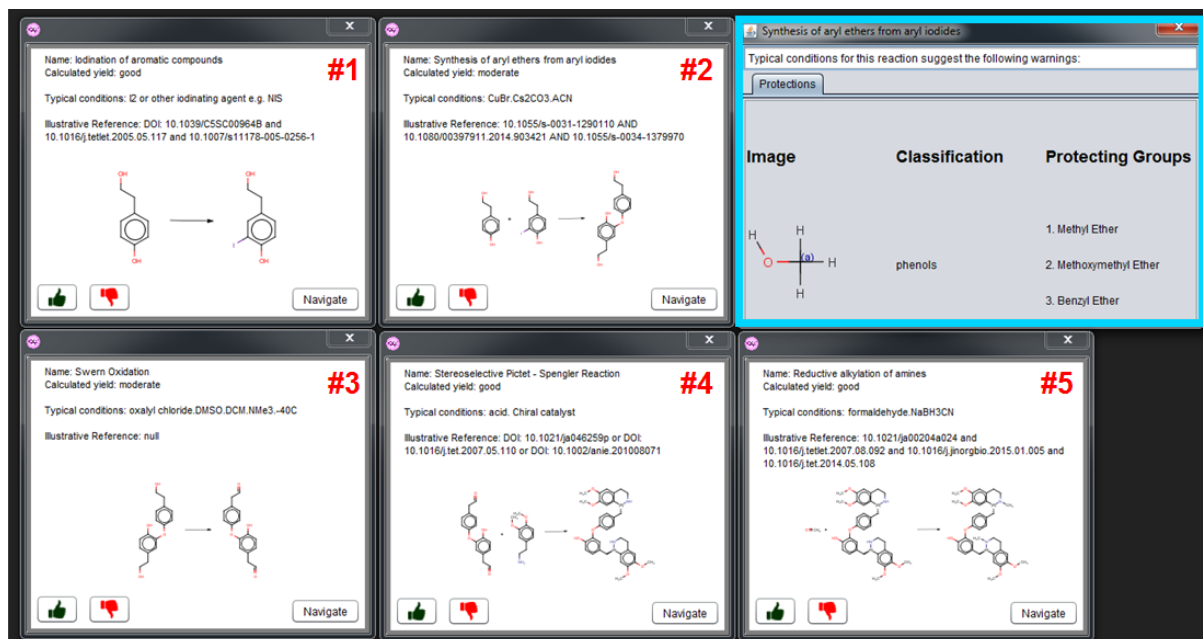
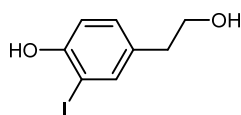


Figure S6. Details of Chematica's output for the synthesis of Dauricine; the figure complements main-text **Figure 3**. Expansion of each reaction node provides, *inter alia*, reaction miniature, name of the reaction, general class of reaction conditions, and most relevant literature references with specific conditions. Protecting groups proposed for the *O*-arylation step are shown in the blue-border sub-window on the upper-right.

S2.2. Synthetic details.

All reactions were carried out under an argon atmosphere in oven-dried glassware with magnetic stirring. Solvents used in reactions were purified by passage through a bed of activated alumina.^{S1} Reagents were purified prior to use unless otherwise stated following the guidelines of Perrin and Armarego.^{S2} Purification of reaction products was carried out by flash chromatography on Biotage Isolera 4 systems with Ultra-grade silica cartridges. Visualization was accomplished with UV light. Infrared spectra were recorded on a Bruker Tensor 37 FT-IR spectrometer. ¹H NMR spectra were recorded on AVANCE III 500 MHz w/ direct cryoprobe (500 MHz) spectrometer and are reported in ppm using solvent as an internal standard (CDCl₃ at 7.26 ppm). Data are reported as (ap = apparent, s = singlet, d = doublet, t = apparent triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad; coupling constant(s) in Hz; integration). Proton-decoupled ¹³C NMR spectra were recorded on an AVANCE III 500 MHz w/ direct cryoprobe (126 MHz) spectrometer and are reported in ppm using solvent as an internal standard (CDCl₃ at 77.16 ppm). Accurate masses were obtained using an Agilent 6120A LC-TOF MS. Optical rotations were measured on a PerkinElmer Model 341 Polarimeter with a sodium lamp. Optical rotatory dispersion (ORD) measurements were taken on a Jasco J-815 Circular Dichroism (CD) Spectropolarimeter.



4-(2-hydroxyethyl)-2-iodophenol (**2**)

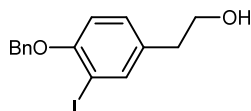
A solution of I₂ (5.00 g, 36.2 mmol) and KI (6.01 g, 36.2 mmol) in 1:1 H₂O:EtOH (240 mL) was added slowly to 4-(2-hydroxyethyl)phenol (9.18 g, 36.2 mmol) dissolved in 40% dimethylamine solution (32 mL). The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 5 h after which the reaction was neutralized with 2 M HCl and extracted into AcOEt (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with sat. aq. Na₂S₂O₃ solution (aq.) (2 x 50 mL) and brine (1 x 50 mL). The resulting organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure yielding light brown oil. The resulting oil was dissolved in hot H₂O, cooled, and filtered yielding 4-(2-hydroxyethyl)-2-iodophenol (**2**, 5.35 g, 56%), a white crystalline solid (mp = 102–104°C). Analytical data matched those reported in literature.^{S3}

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.53 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.52 (s, 1H), 3.82 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 153.6, 138.4, 132.7, 130.8, 115.0, 85.8, 63.6, 37.7.

HRMS (ESI) calcd for [C₈H₉IO₂+H+H₂O]⁺: 282.9831, found: 283.177.

IR (ATR) ν = 3448, 3076, 1419, 1037, 1002, 812, 704 cm⁻¹.



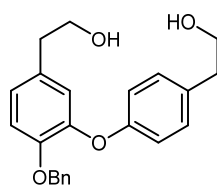
2-(4-(benzyloxy)-3-iodophenyl)ethan-1-ol (3**):** 4-(2-hydroxyethyl)-2-iodophenol **2** (4.3 g, 16.3 mmol) was dissolved in EtOH (50 mL) with BnCl (2.84 mL, 24.4 mmol) and K₂CO₃ (3.38 g, 24.4 mmol), and heated to 80 °C. The mixture was allowed to stir at this temperature for 12 h. Upon completion, the reaction mixture was cooled to room temperature, the solids were filtered off, and the solution was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified *via* column chromatography using 1:1 AcOEt:hexanes, isolating the spot with R_f = 0.42 in 1:1 AcOEt:hexanes solution. The fractions were concentrated yielding **3** (5.31 g, 99%), a white, chalky powder (mp = 66–67 °C).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.35–7.30 (m, 1H), 7.13 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.14 (s, 1H, br), 3.82 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 155.9, 139.9, 136.6, 133.3, 130.1, 128.6, 127.9, 127.1, 112.8, 87.1, 71.0, 63.5, 37.8.

HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{IO}_2+\text{Na}]^+$: 376.9998, found: 377.0015.

IR (ATR) ν = 3253, 2852, 2632, 1490, 1255, 1024, 693 cm^{-1} .



2-(4-(benzyloxy)-3-(4-(2-hydroxyethyl)phenoxy)phenyl)ethan-1-ol (4)

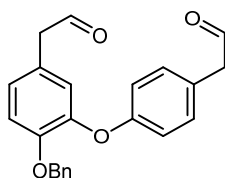
Benzyl-protected 4-(2-hydroxyethyl)-2-iodophenol **3** (4.00 g, 11.3 mmol) was dissolved in NMP (9 mL) with 4-(2-hydroxyethyl)phenol **1** (2.34 g, 16.9 mmol), Cs_2CO_3 (7.36 g, 22.6 mmol), CuI (2.15 g, 11.3 mmol), and 2,2,6,6-tetramethylheptane-3,5-dione (4.71 mL, 22.6 mmol) under Ar atmosphere. The reaction flask was covered in foil and heated to 120 $^\circ\text{C}$. The mixture was allowed to stir at this temperature for 48 h before cooling to room temperature and diluting with AcOEt (50 mL). After passing crude mixture through a Celite plug, the mixture was washed with sat. aq. NH_4Cl solution (1 x 300 mL), extracted with AcOEt and H_2O and washed with brine (2 x 300 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified *via* column chromatography using 95:5 CH_2Cl_2 :MeOH, isolating the spot with $R_f = 0.26$ in 9:1 CH_2Cl_2 :MeOH solution. The fractions were concentrated under reduced pressure yielding diol **4** (2.3 g, 56%), viscous copper-colored oil.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.30–7.27 (m, 1H), 7.25–7.23 (m, 1H), 7.19 (dd, $J = 7.0, 1.6$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.98–6.94 (m, 2H), 6.93–6.88 (m, 3H), 5.07 (s, 2H), 3.85 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.81 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.84 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.78 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 156.9, 149.1, 145.5, 136.9, 132.3, 132.3, 130.0, 128.4, 127.8, 127.1, 125.2, 122.2, 117.1, 115.5, 71.0, 63.8, 63.6, 38.4, 38.3.

HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_4+\text{Na}]^+$: 387.1598, found: 387.1564.

IR (ATR) ν = 3311, 2867, 1607, 1266, 1212, 1013, 808, 695 cm^{-1} .



2-(4-(benzyloxy)-3-(4-(2-oxoethyl)phenoxy)phenyl)acetaldehyde (**5**)

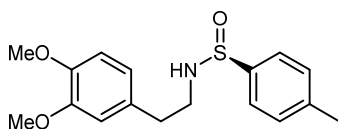
This procedure was adapted from a literature.^{S3} Dess-Martin periodinane (4.33 g, 10.2 mmol) was added to an oven-dried 100 mL flask with a stir bar, followed by CH₂Cl₂ (25 mL). The flask was sealed, put under Ar atmosphere and cooled to 0 °C. Diol **4** (1.550 g, 4.25 mmol) dissolved in CH₂Cl₂ (20 mL) was added and the reaction was stirred for 15 min at 0 °C before warming to room temperature. The vessel was permitted to stir for 2 h. The reaction was subsequently quenched with sat. aq. NaHCO₃ solution (50 mL) and the organic and aqueous layers were separated. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 30 mL), and the combined organic layers were washed with brine (1 x 50 mL). The resulting organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified *via* column chromatography using 1:1 AcOEt:hexanes, isolating the spot with R_f= 0.51 in 1:1 AcOEt:hexanes solution. The fractions were concentrated under reduced pressure yielding dialdehyde **5** (998 mg, 65%) as pale yellow oil.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.74 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 9.72 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.29–7.27 (m, 1H), 7.25–7.23 (m, 2H), 7.20–7.16 (m, 3H), 7.14 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.3 Hz 1H), 6.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 3H), 6.92 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 3.66 (d, *J* = 2.3, 2H), 3.61 (d, *J* = 2.1, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 199.4, 199.1, 157.5, 149.8, 145.5, 136.6, 130.8, 128.4, 128.0, 127.9, 127.0, 126.2, 125.7, 125.3, 123.0, 117.4, 115.6, 70.9, 49.8, 49.6.

HRMS (ESI) calculated for [C₂₃H₂₀O₄+H+H₂O]⁺: 379.1631, Found: 379.2396.

IR (ATR) ν = 2810, 2734, 1720, 1453, 1266, 1214, 733, 695 cm⁻¹.



(S)-N-(3,4-dimethoxyphenethyl)-4-methylbenzenesulfinamide ((S)-7)

n-BuLi (8.8 mL, 22 mmol) in hexanes (2.5 M) was slowly added to a solution of 3,4-dimethoxyphenylamine (3.6 g, 20 mmol) in THF (180 mL) at -78°C . The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and was then added to a solution of (*1R,2S,5R*)-(*S*)-menthyl-*p*-toluenesulfinate (5.9 g, 20 mmol) in THF (20 mL). The reaction stirred for 1 h at room temperature and was then quenched with aq. Na_2HPO_4 (100 mL, 1 M), and extracted with AcOEt (3 x 100 mL). The resulting organic layer was washed with brine (1 x 200 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified *via* column chromatography using 1:1 AcOEt:hexanes, isolating the spot with $R_f = 0.25$ in 1:1 AcOEt:hexanes solution. The fractions were concentrated under reduced pressure yielding amine (**S**)-7 (5.20 g, 81%) as light yellow-orange oil. Analytical data matched those reported in literature.^{S4,S5}

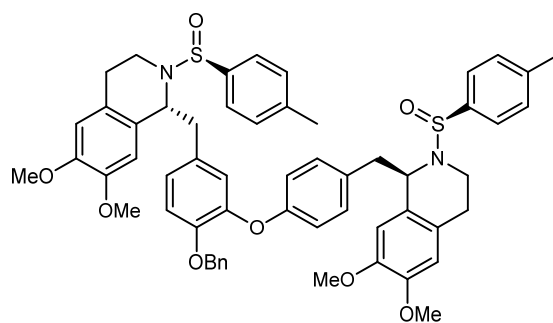
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +62.2$ (*c* 0.8, acetone);

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.48 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.66 (dd, $J = 8.6, 2.1$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 4.06 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.34–3.27 (m, 1H), 3.06–2.98 (m, 1H), 2.71 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.36 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 149.0, 147.7, 141.2, 141.1, 130.9, 129.5, 125.9, 120.8, 112.0, 111.3, 55.9, 55.8, 42.3, 36.5, 21.3.

HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{S} + \text{Na}]^+$: 342.1098, found: 342.1133.

IR (ATR) $\nu = 2395, 1515, 1235, 1028, 725$ cm^{-1} .



(-)-1-(4-(benzyloxy)-3-(4-(((6,7-dimethoxy-2-(*p*-tolylsulfinyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl)methyl)phenoxy)benzyl)-6,7-dimethoxy-2-(*p*-tolylsulfinyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline ((+)-SI-1)

Under Ar atmosphere dialdehyde **5** (100 mg, 0.277 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1 mL) and added to amine (**S**)-**7** (400 mg, 1.25 mmol) and activated 4 Å MS (100 mg) under Ar atmosphere. The reaction mixture was cooled to -78 °C and BF₃·OEt₂ (230 μL, 1.80 mmol) was slowly added. The resulting reaction mixture was permitted to stir for 1.5 hour at -78 °C. The reaction was quenched *via* slow addition of 1:1 Et₃N:MeOH solution (500 μL) then concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified *via* flash column chromatography using 1:1 AcOEt:hexanes, isolating the spot with R_f = 0.45 in 2:3 AcOEt:hexanes solution. The fractions were concentrated under reduced pressure yielding tetrahydroisoquinoline (+)-**SI-1** (90.0 mg, 33%) as a shimmery pale yellow-tinted oil (appt. dr >20:1, by ¹H NMR).

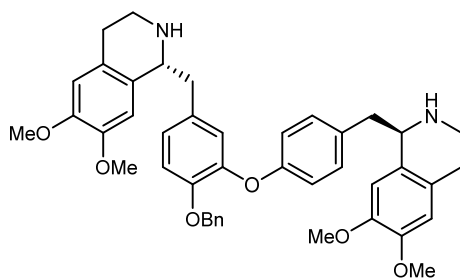
[α]_D²⁵ +27.8 (*c* 0.12, acetone);

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.44 (dd, *J* = 8.3, 3.9 Hz, 4H), 7.31–7.27 (m, 2H), 7.25–7.17 (m, 6H), 6.87 (m, 2H), 6.77–6.73 (m, 2H), 6.60 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 6.52 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 6.45 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.02 (d, *J* = 13.5 Hz, 2H), 5.06 (s, 2H), 4.56 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.52 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.50–3.40 (m, 2H), 3.16–3.06 (m, 2H), 3.06–2.98 (m, 2H), 2.95–2.83 (m, 3H), 2.76 (dd, *J* = 13.2, 7.8 Hz, 1H), 2.62–2.59 (m, 1H), 2.58–2.55 (m, 1H), 2.38 (s, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 156.9, 149.2, 147.7, 147.7, 146.6, 145.1, 141.1, 141.0, 140.5, 136.9, 132.1, 131.8, 130.9, 130.8, 130.6, 129.4, 129.4, 129.4, 128.6, 128.5, 128.5, 128.4, 128.4, 127.9, 127.8, 127.1, 127.0, 127.0, 126.9, 126.3, 126.2, 126.2, 125.6, 125.5, 123.0, 116.6, 115.0, 111.5, 111.5, 110.1, 109.9, 70.9, 57.5, 57.3, 55.9, 55.8, 55.8, 55.5, 43.2, 43.2, 41.2, 41.1, 28.6, 28.6, 21.4, 21.4.

HRMS (ESI) calculated for [C₅₇H₅₈N₂O₈S₂ + Na]⁺: 985.3498, found: 985.3537.

IR (ATR) ν = 2932, 2359, 2341, 1610, 1506, 1464, 1371, 1269, 1246, 1226, 1169, 1115 cm⁻¹.



(-)-1-(4-(benzyloxy)-3-(4-(((6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl)methyl)phenoxy)benzyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline ((-)-8)

Tetrahydroisoquinoline (+)-**SI-1** (40 mg, 0.042 mmol) was dissolved in EtOH (1 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Once at that temperature, conc. HCl (140 μ L) was added dropwise. After stirring for 10 min at 0 °C, sat. aq. K₂CO₃ solution was added (2.1 mL). Following extractive workup with AcOEt (2 x 3 mL), the crude organic solution was concentrated *via* reduced pressure and purified *via* flash column chromatography with 85:10:5 EtOAc:MeOH:NH₄OH, isolating the spot with R_f = 0.35 in 85:10:5 AcOEt:MeOH:NH₄OH. The fraction was concentrated under reduced pressure yielding tetrahydroisoquinoline (**-**)-**8** (26.0 mg, 92%) as a light yellow oil.

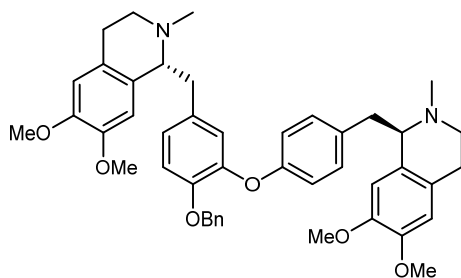
$[\alpha]_D^{25}$ -41.3 (*c* 0.12, MeOH);

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.31–7.27 (m, 3H), 7.25–7.22 (m, 2H), 7.19 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.0–6.94 (m, 3H), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 6.57 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.15 (dd, *J* = 8.9, 4.1 Hz, 1H), 4.11 (dd, *J* = 8.9, 4.1 Hz, 1H) 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.24–3.16 (m, 3H), 3.09 (dd, *J* = 13.8, 4.4 Hz, 1H), 2.97–2.84 (m, 4H), 2.80–2.65 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 156.9, 149.1, 147.5, 147.1, 147.0, 145.6, 137.0, 132.7, 130.4, 130.1, 130.1, 128.4, 127.8, 127.2, 127.1, 127.0, 126.9, 125.6, 122.5, 120.7, 117.2, 115.5, 118.8, 111.8, 109.4, 71.0, 56.9, 56.8, 56.0, 56.0, 55.9, 41.9, 41.9, 40.9, 40.6, 29.4, 29.3.

HRMS (ESI) calcd for [C₄₃H₄₆N₂O₆+H]⁺: 687.3478, found: 687.3425.

IR (ATR) ν = 3854, 3745, 3629, 2361, 2340, 2160, 2050, 1979, 1700, 1653, 1559, 1517, 1457, 1419, 1259, 1237, 1143, 1026, 668, 652, 605 cm⁻¹.



(-)-O-benzyl Dauricine ((-)-9):

37% aq. formaldehyde solution (87 μ L) was added to tetrahydroisoquinoline (**(-)-8**) (20 mg, 29 μ mol) dissolved in CH_2Cl_2 (0.5 mL) and reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 1 h. Sodium triacetoxyborohydride (123 mg, 0.582 mmol) was added. After stirring for 30 min at room temperature, the reaction was quenched with sat. aq. NaHCO_3 solution (1.5 mL). Following extractive workup with AcOEt (2 x 2 mL), the crude organic solution was concentrated via reduced pressure and purified *via* flash column chromatography with 85:10:5 AcOEt:MeOH: NH_4OH , isolating the spot with $R_f = 0.50$ in 85:10:5 AcOEt:MeOH: NH_4OH . The fraction was concentrated under reduced pressure yielding (-)-O-benzyl Dauricine ((-)-9) (15.0 mg, 72%) as a colorless oil.

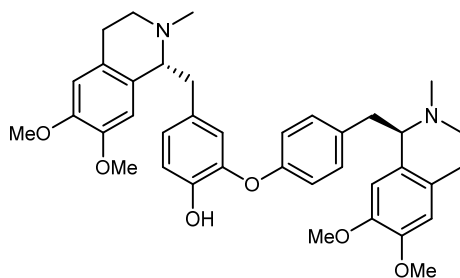
$[\alpha]_D^{25} -61.6$ (c 0.05, MeOH);

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.31–7.27 (m, 2H), 7.25–7.21 (m, 3H), 7.01 (dd, $J = 8.4, 1.6$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.82–6.76 (m, 4H), 6.53 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H), 6.06 (d, $J = 3.7$ Hz, 2H), 5.06 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.81 (d, $J = 5.3$ Hz, 3H), 3.69 (t, $J = 5.9$, 1H), 3.64 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.53 (d, $J = 3.0$ Hz, 3H), 3.23–3.10 (m, 3H), 3.09–3.03 (m, 1H), 2.87–2.69 (m, 6H), 2.62–2.58 (m, 1H), 2.57–2.55 (m, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.49 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 156.7, 148.8, 147.3, 146.4, 146.4, 145.2, 137.1, 133.7, 133.7, 130.7, 128.4, 127.7, 127.0, 126.0, 126.0, 123.1, 116.6, 115.2, 115.2, 111.2, 111.0, 110.9, 110.9, 71.1, 65.0, 64.7, 55.8, 55.7, 55.6, 55.5, 47.0, 46.8, 42.7, 40.6, 40.4, 25.5, 25.5.

HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{45}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_6+\text{H}]^+$: 715.3778, found: 715.3731.

IR (ATR) $\nu = 3812, 3722, 3666, 2936, 2611, 2286, 2241, 2217, 2199, 2184, 2161, 2149, 2071, 1608, 1504, 1463, 1256, 1124, 1103, 739, 608$ cm^{-1} .



(-)-Dauricine ((-)-10)

(-)-*O*-benzyl Dauricine ((-)-9) (6.00 mg, 8.4 μ mol) was dissolved in MeOH (300 μ L) and the solution was degassed with an Ar balloon for 10 min, followed by the addition of Pd(OH)₂ (0.8 mg, 6 μ mol). The reaction mixture was degassed *via* the freeze-pump-thaw method (3x), charged with H₂ balloon, and permitted to stir for 10 h at room temperature. Upon completion, as determined by TLC, the reaction was diluted with MeOH (1 mL), filtered through a pipette Celite plug, concentrated under reduced pressure, washed with hexanes (2 mL), and dried to afford (-)-Dauricine ((-)-10) (5.10 mg, 97%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{25}$ -96.3 (*c* 0.04, MeOH);

CD (*c* 1.78 mM, MeOH) $\Delta\epsilon_{287}$ -15.77 mdeg, $\Delta\epsilon_{235}$ -60.80 mdeg;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.84–6.78 (m, 3H), 6.57 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.06 (d, *J* = 30.5 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.71 (m, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.23–3.09 (m, 3H), 3.03 (m, 1H), 2.87–2.67 (m, 6H), 2.55 (m, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.49 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 155.0, 147.4, 147.3, 146.5, 146.3, 145.6, 142.8, 135.1, 131.0, 126.1, 125.9, 120.4, 117.3, 115.6, 111.2, 111.2, 110.9, 110.9, 64.7, 55.8, 55.7, 55.6, 55.6, 46.9, 46.8, 42.7, 40.6, 40.4, 25.5, 25.3.

HRMS (ESI) calcd for [C₃₈H₄₄N₂O₆+H]⁺: 625.3278, found: 625.3269.

IR (ATR) ν = 3323, 2279, 2243, 2184, 2166, 2160, 2076, 2055, 2041, 2031, 2018, 1989 cm⁻¹.

Analytical Data match natural (-)-Dauricine (purchased from AdooQ[®] Bioscience):

$[\alpha]_D^{25}$ -107.8 (*c* 0.04, MeOH); **CD** (*c* 1.78 mM, MeOH) $\Delta\epsilon_{287}$ -16.02 mdeg, $\Delta\epsilon_{235}$ -64.81 mdeg;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.04 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.84–6.78 (m, 3H), 6.58 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H), 6.08 (d, *J* = 30.01, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.70 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.21–3.09 (m, 3H), 3.03 (dd, *J* = 8.7, 5.4 Hz, 1H), 2.85–2.69 (m, 6H), 2.56 (m, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.48 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 155.0, 147.3, 147.3, 146.5, 146.3, 145.6, 142.8, 135.1, 131.0, 129.0, 126.1, 125.9, 120.4, 117.3, 115.6, 111.2, 111.2, 110.9, 110.9, 64.7, 55.8, 55.7, 55.6, 55.6, 46.9, 46.8, 42.7, 42.6, 40.6, 40.3, 25.5, 25.3.

HRMS (ESI) calcd for [C₅₇H₅₈N₂O₈S₂+H]⁺: 625.3278, found: 625.3278.

IR (ATR) ν = 3437, 2930, 2349, 2285, 2190, 2161, 2138, 2104, 2050, 2036, 2023, 1998 cm⁻¹.

S2.3. Raw spectroscopic data.

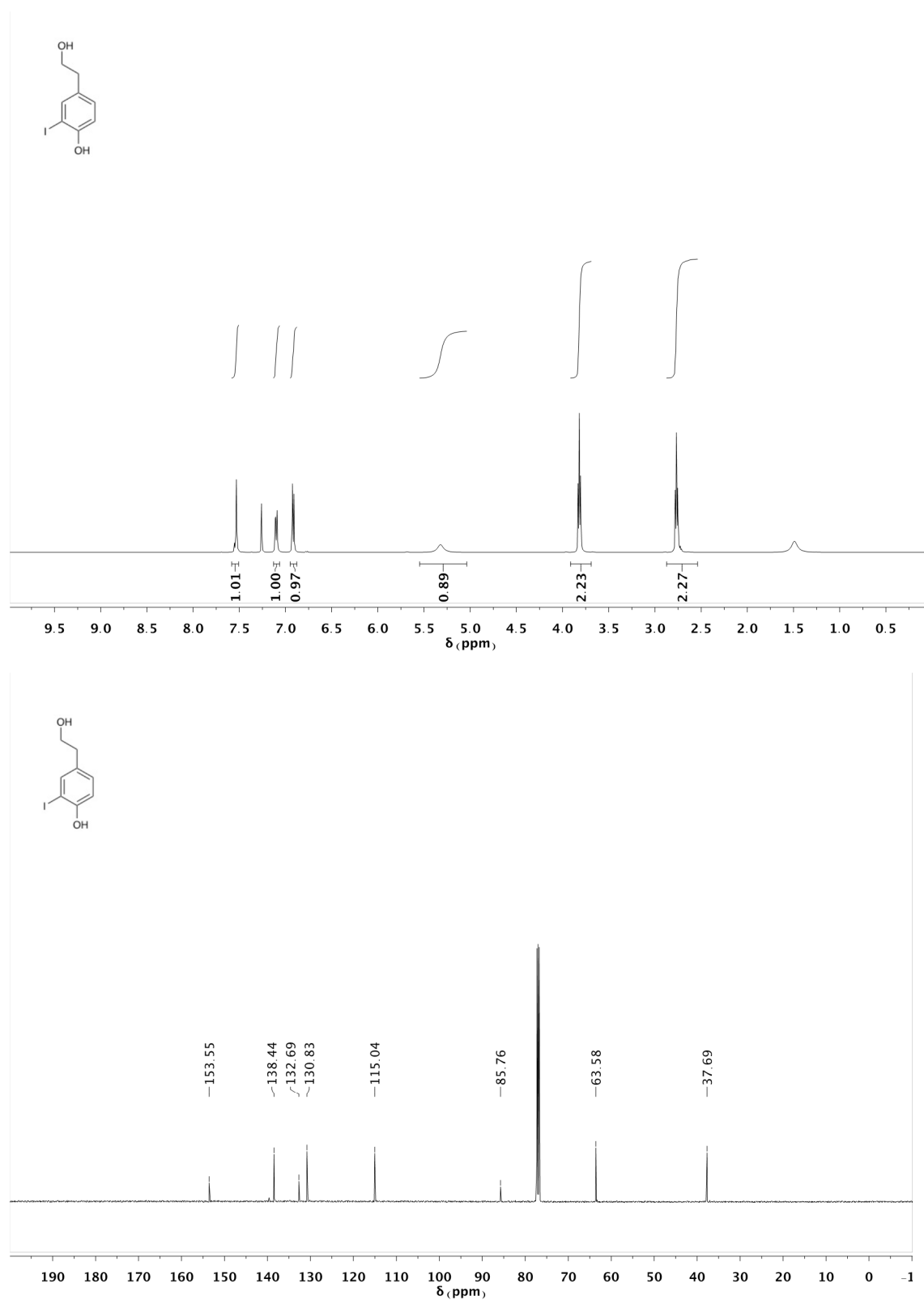


Figure S7. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) of compound **2**.

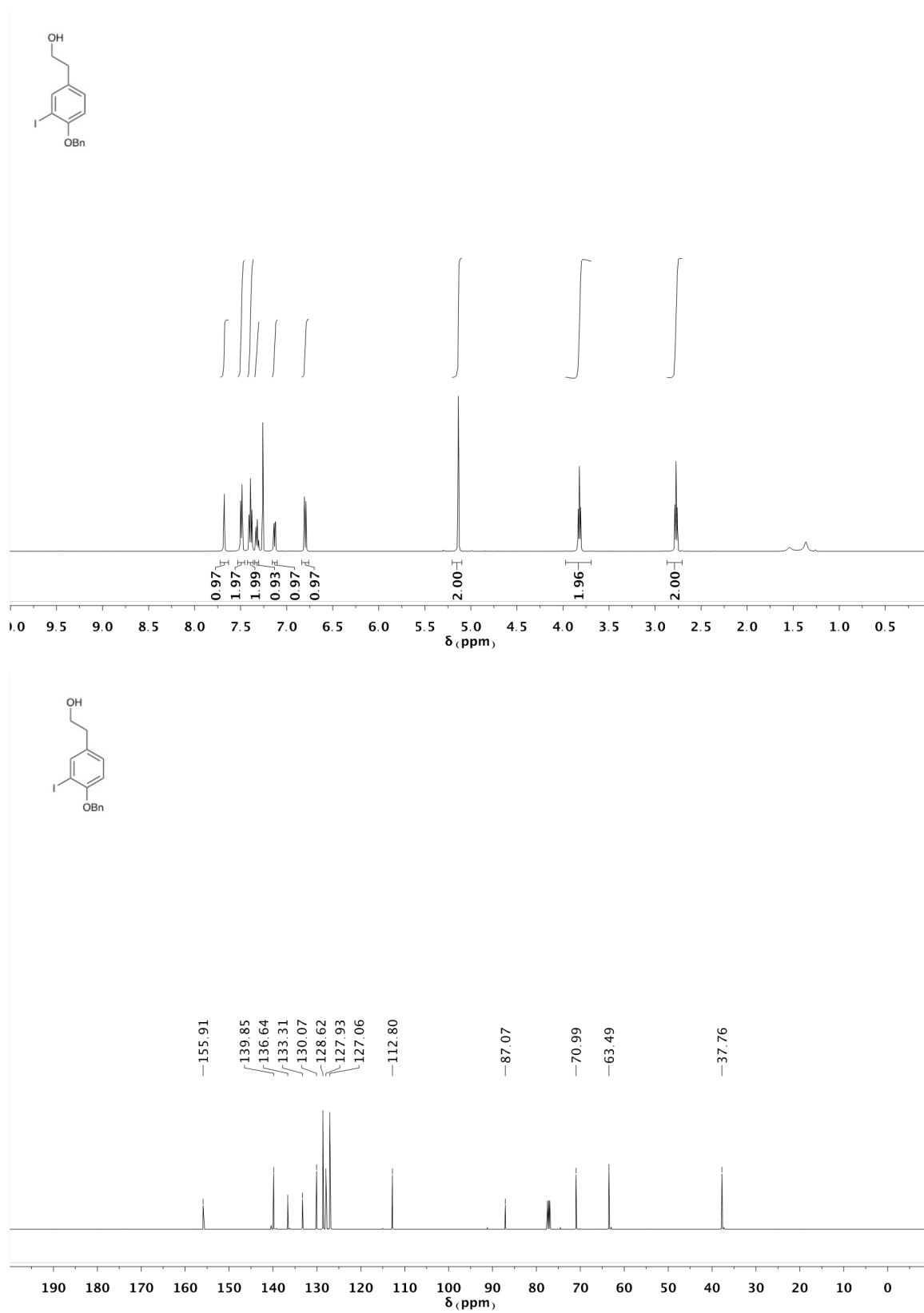


Figure S8. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) of compound **3**.

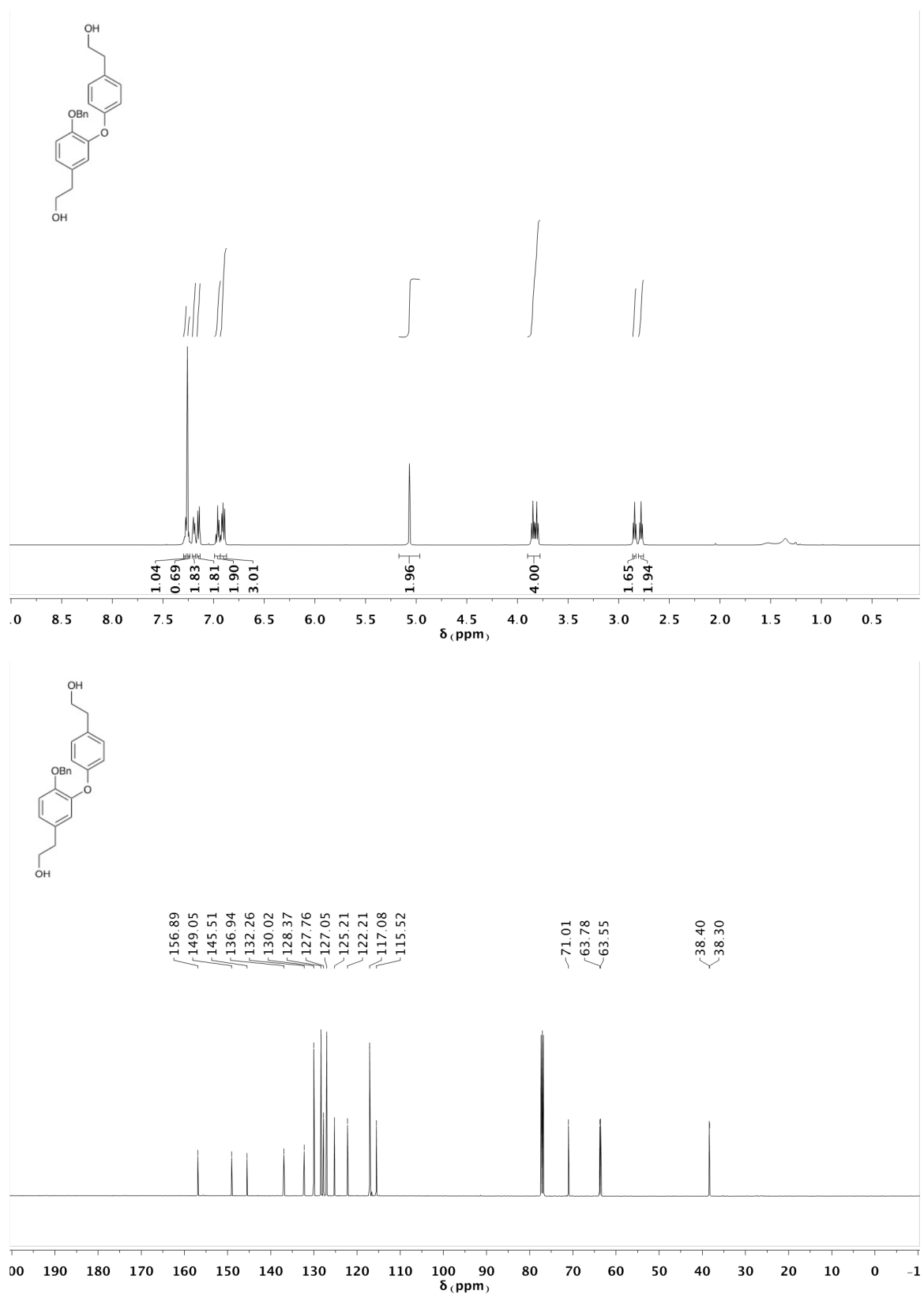


Figure S9. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) of compound 4.

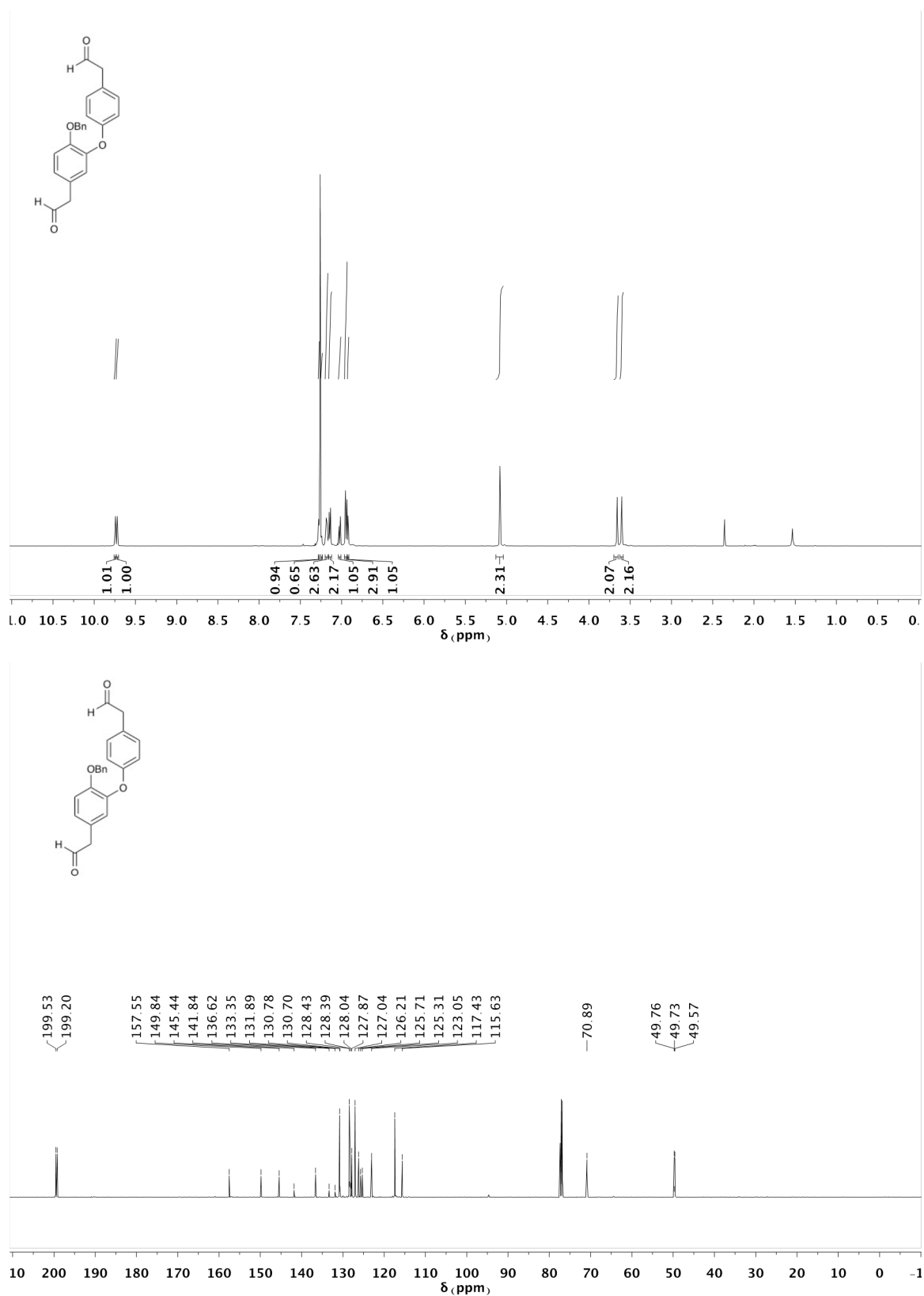


Figure S10. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) of compound 5.

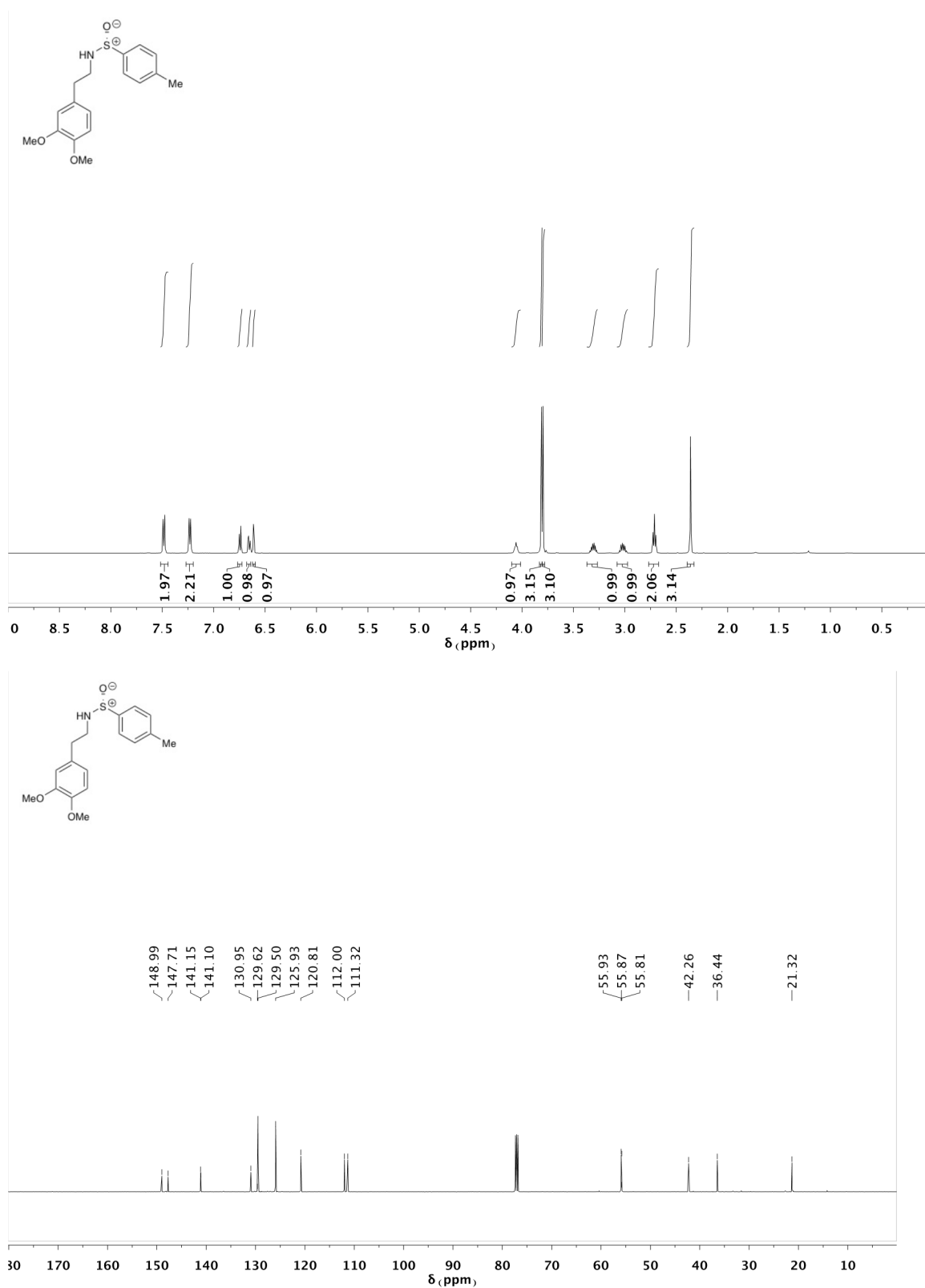


Figure S11. ^1H NMR (top) and ^{13}C NMR (bottom) of compound (S)-7.

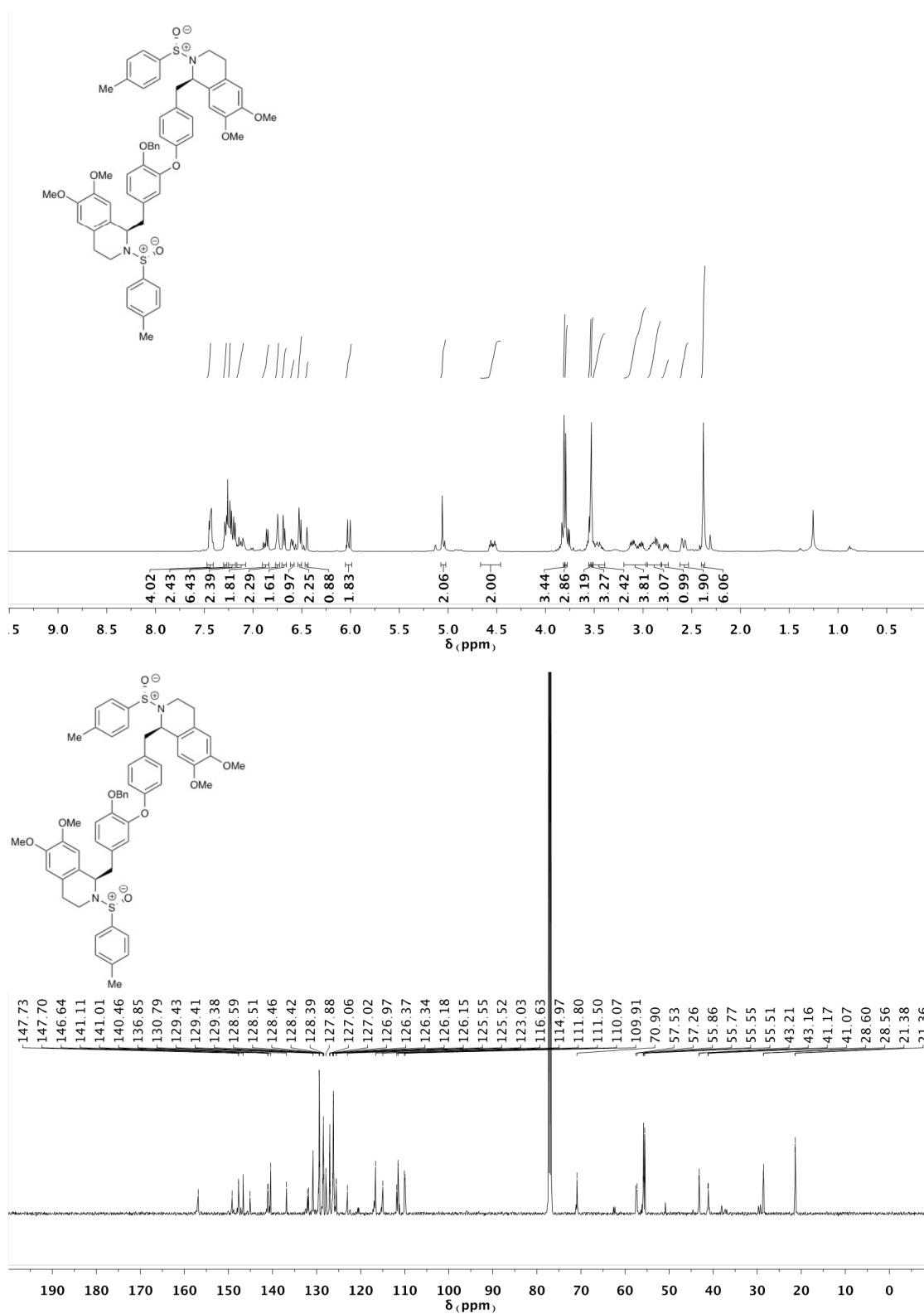


Figure S12. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) of compound (+)-SI-1.

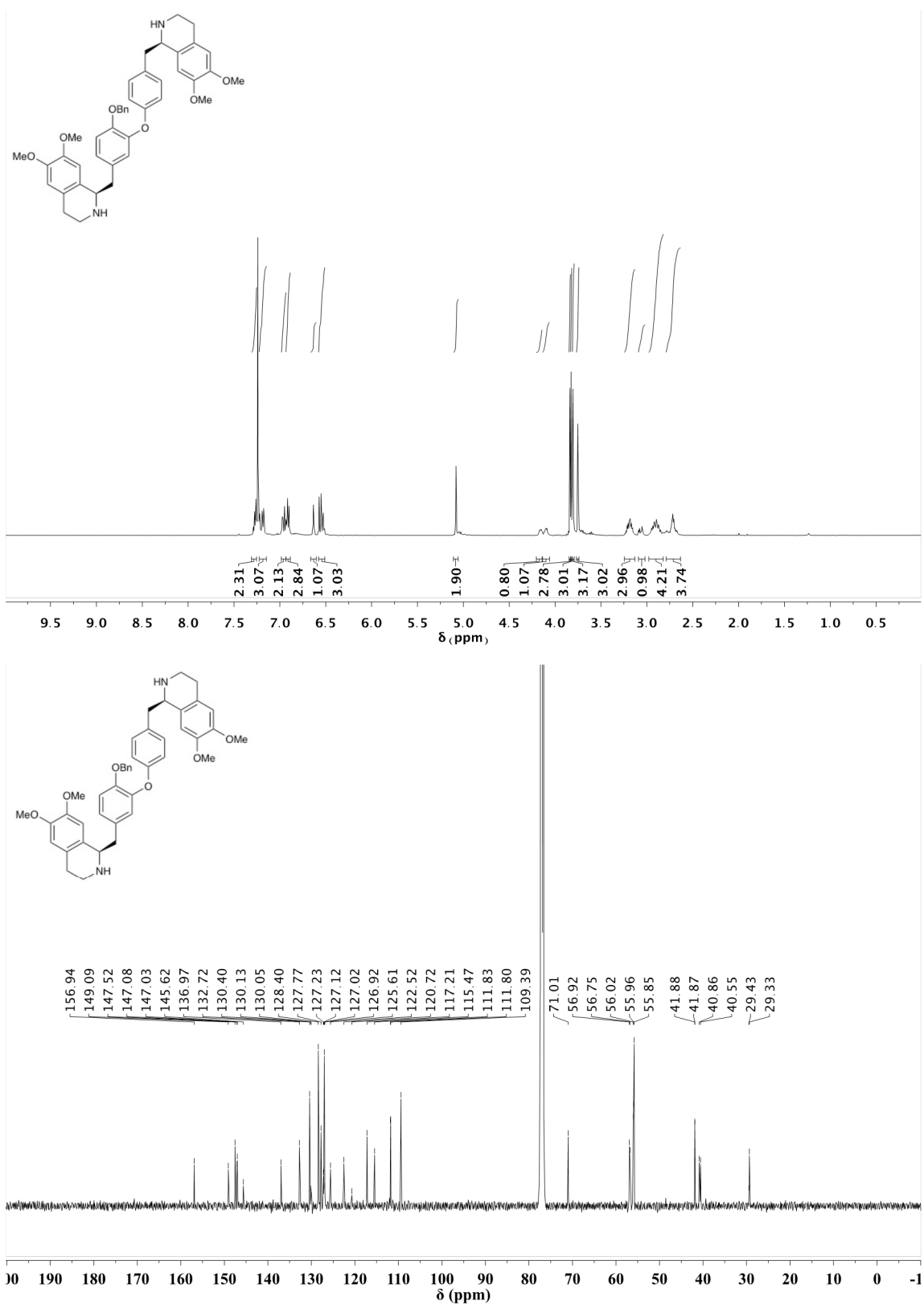


Figure S13. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) of compound (-)-8.

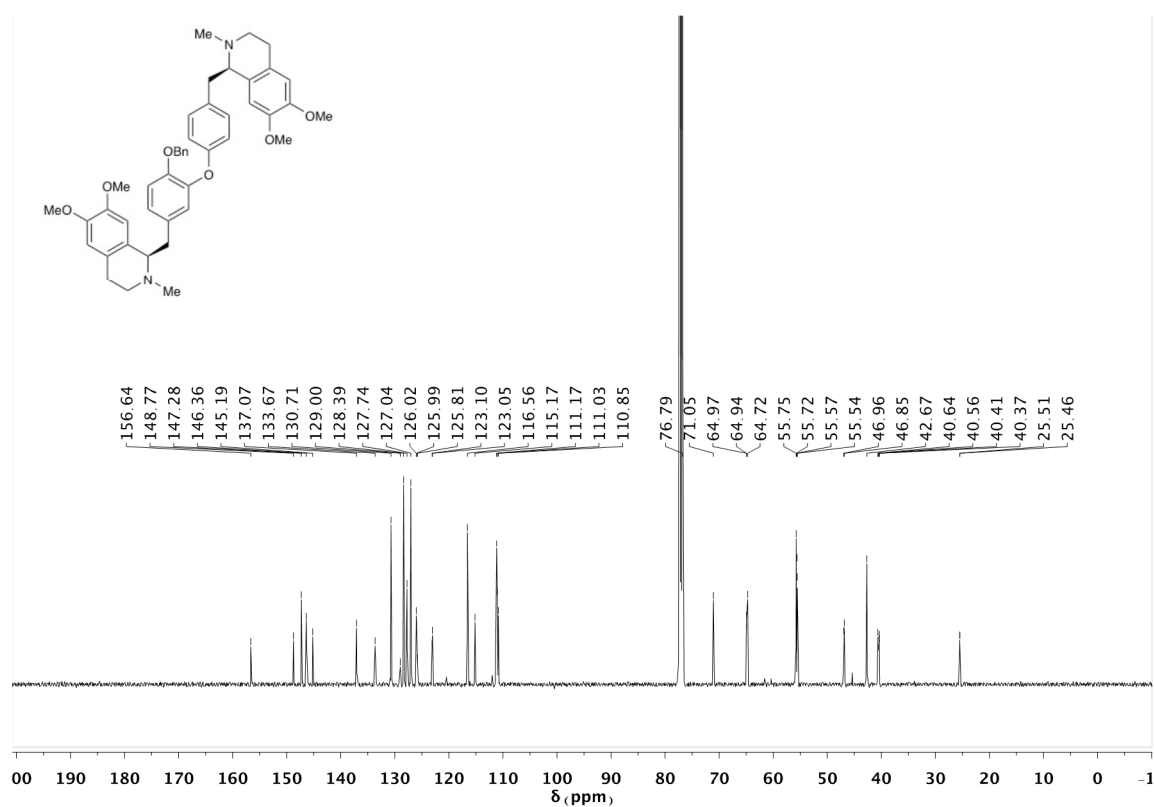
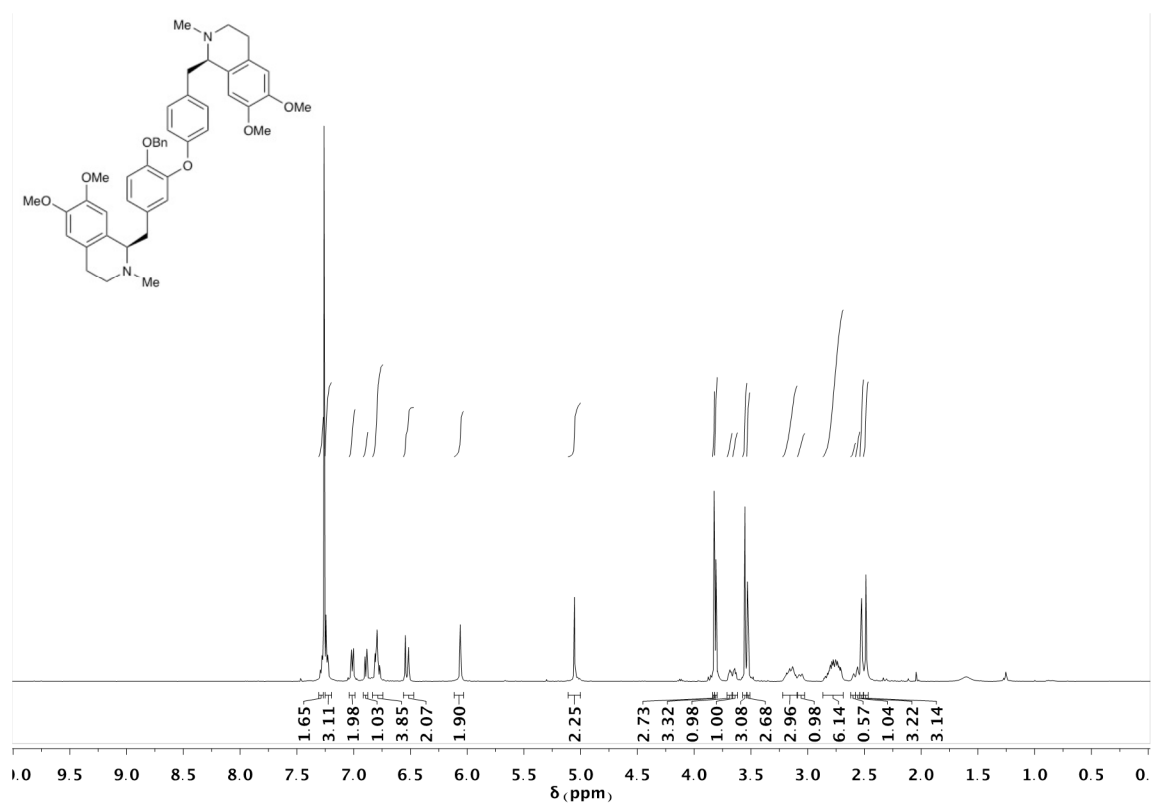


Figure S14. ^1H NMR (top) and ^{13}C NMR (bottom) of compound (-)-9.

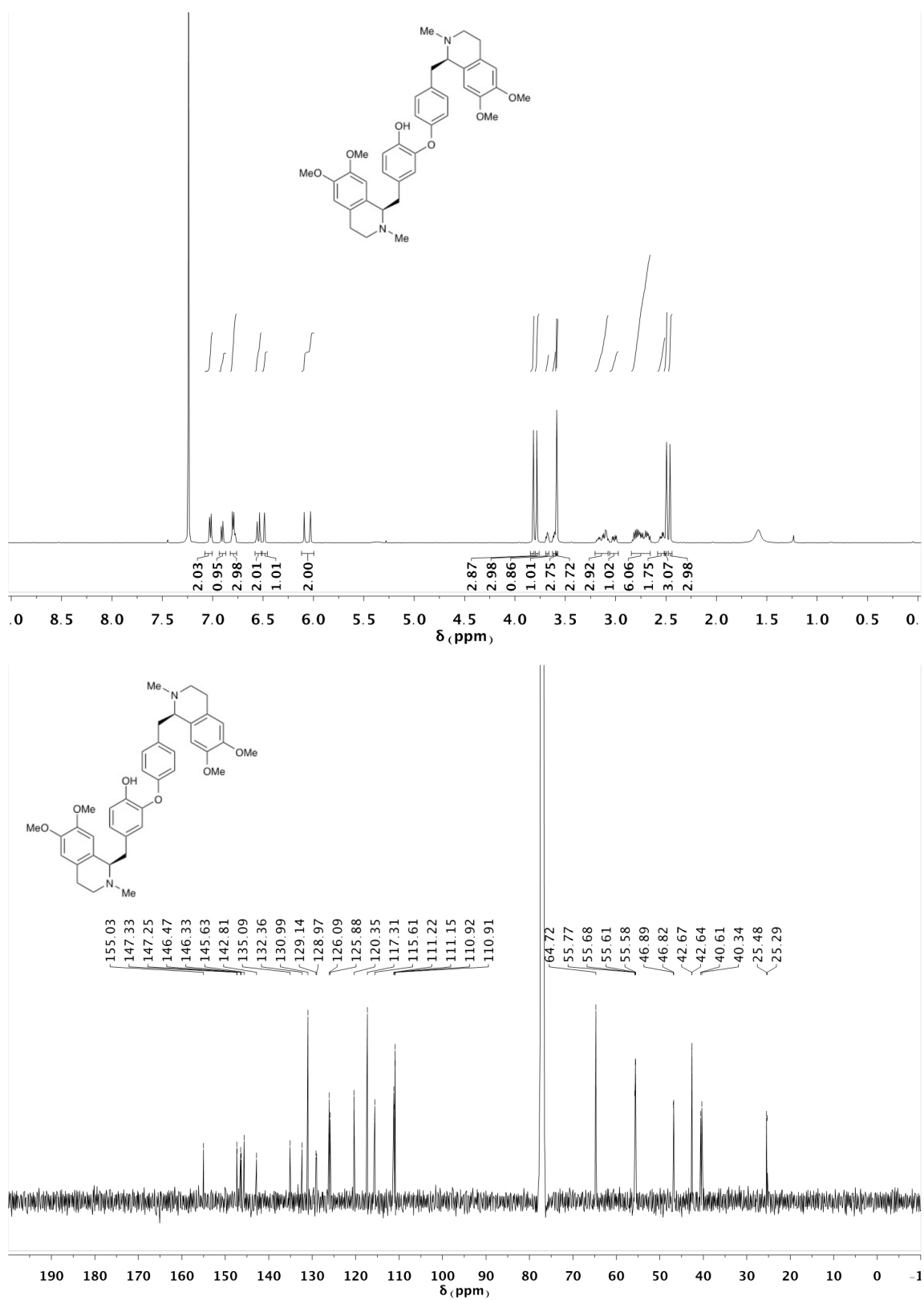


Figure S16. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) of natural (-)-Dauricine ((-)-10), purchased from AdooQ® Bioscience.

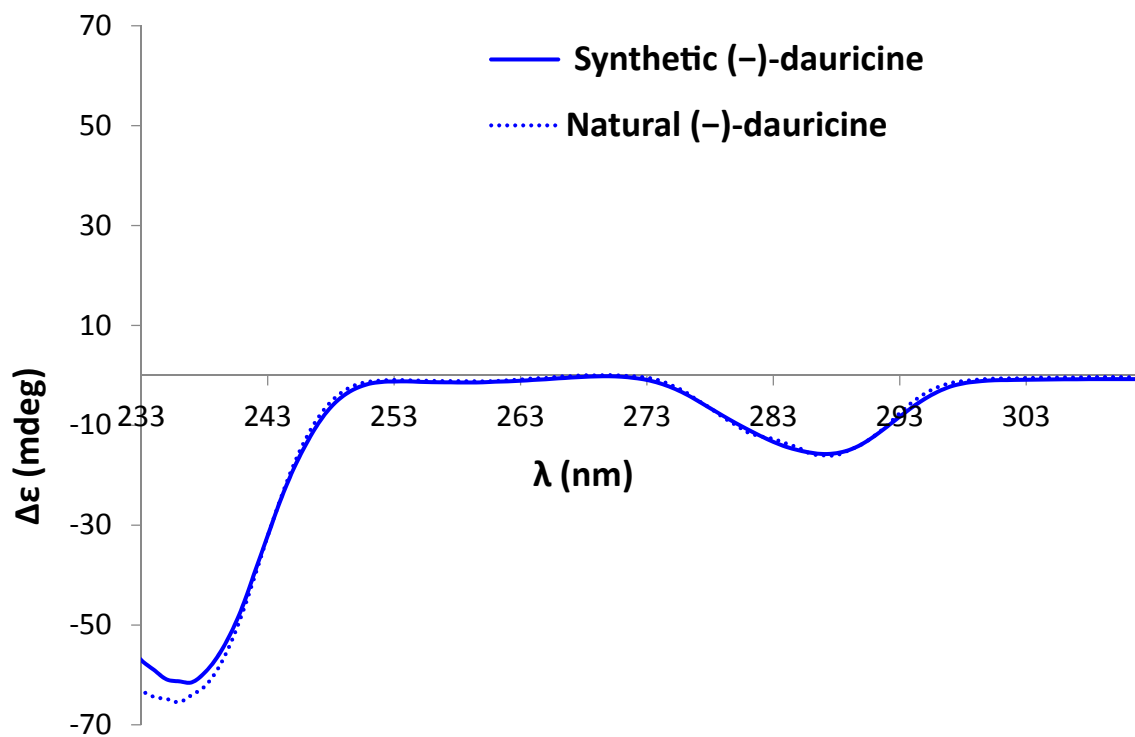


Figure S17. Optical Rotatory Dispersion (ORD) spectra for natural (–)-Dauricine (blue dotted line) and synthetic (–)-Dauricine (blue solid line) taken in MeOH at *c* 1.78 mM. $\Delta\epsilon_\lambda$ at $\lambda=287$ and $\lambda=235$ selected as minima.

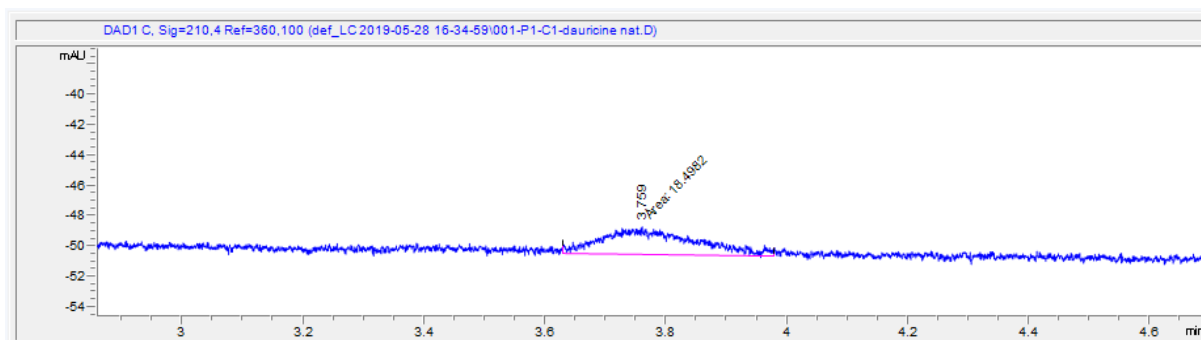


Figure S18. Supercritical fluid chromatography (SFC) trace for natural (–)-Dauricine.

Column: Chiralpak IC-3, mobile phase: 10% MeOH in CO₂, flow rate = 2.5 mL/min, 210 nm:
3.72 min.

S3. Synthesis of Tacamonidine.

S3.1. Structure of Tacamonidine vs Tacamonine.

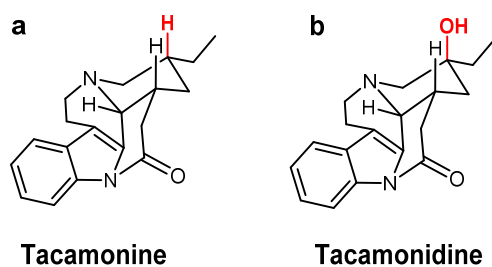
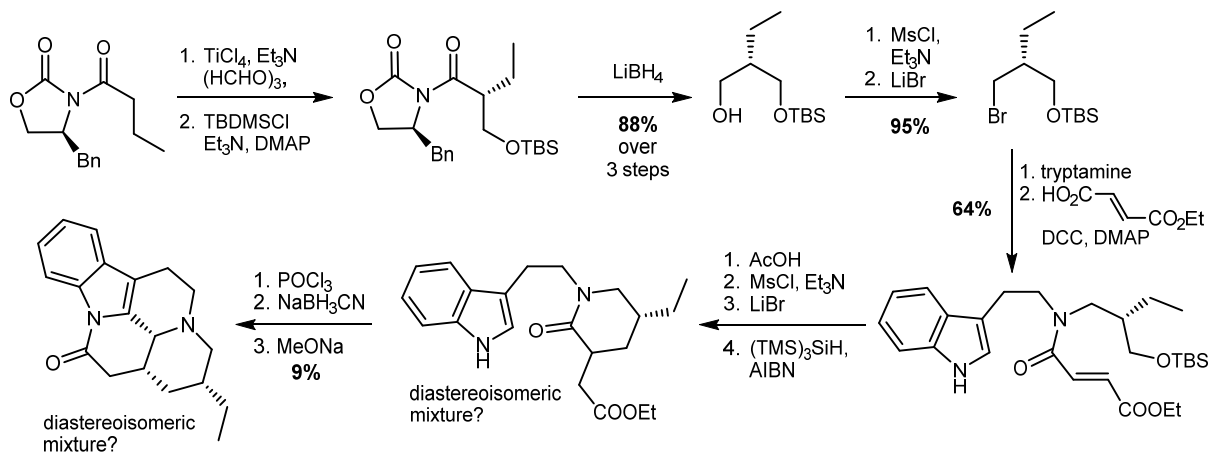


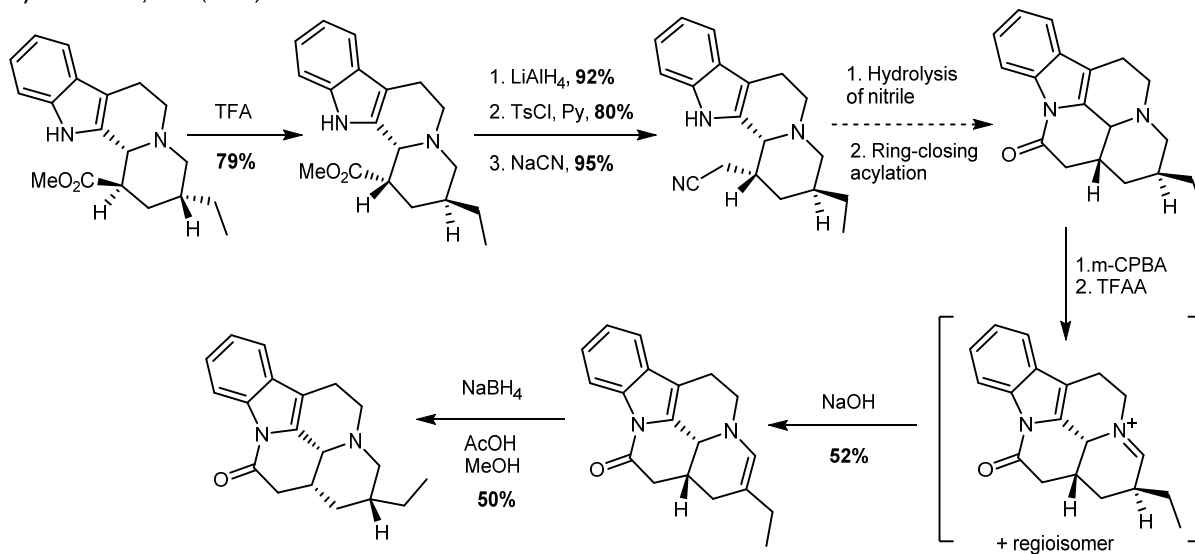
Figure S19. The structure of **a)** Tacamonine vs. **b)** Tacamonidine. Although the structures differ only by the presence of tertiary hydroxyl group in Tacamonidine, such difference completely changes their synthetic strategies (see **Section S3.2**)

S3.2. Existing syntheses of Tacamoneine.

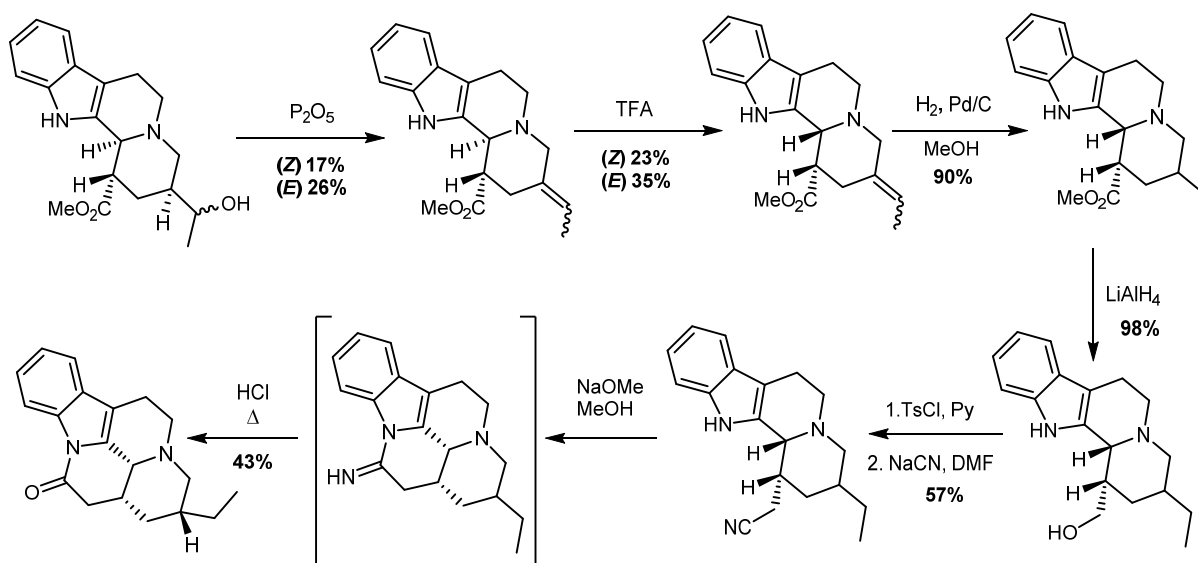
a) Fukumoto, 1994 (lit. S6,S7)



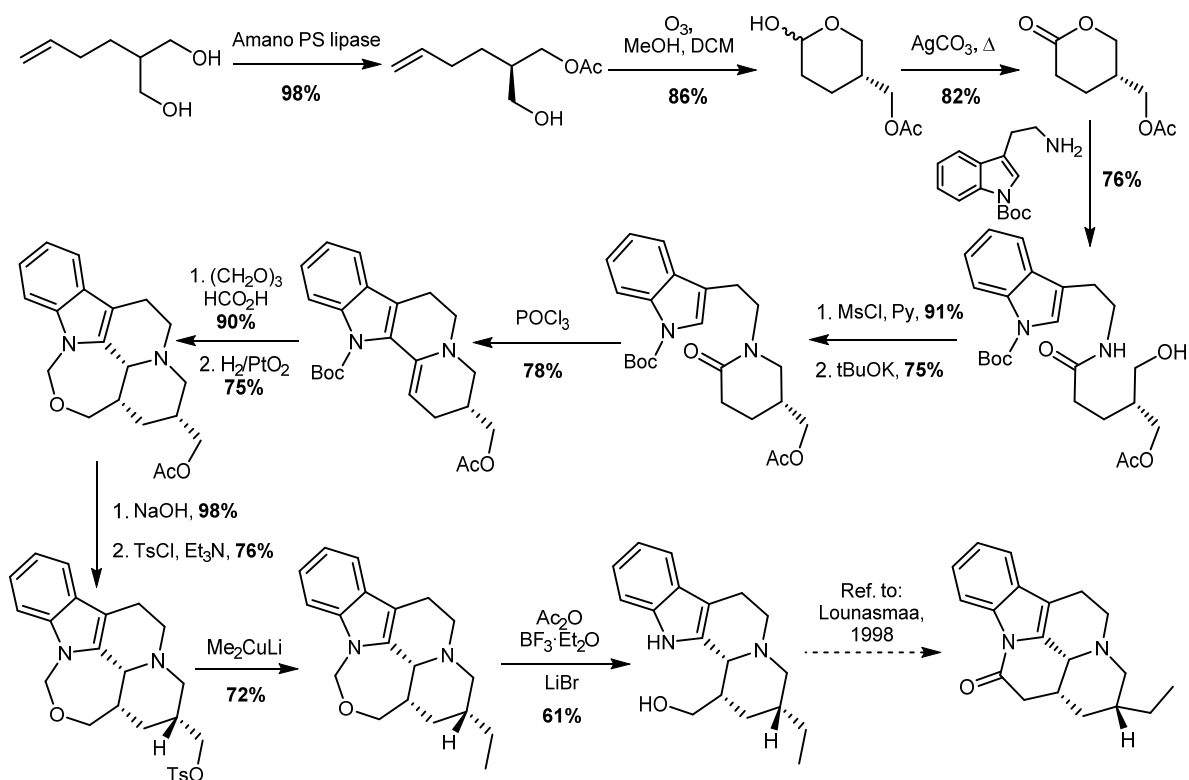
b) Lounasmaa, 1995 (lit. S8)



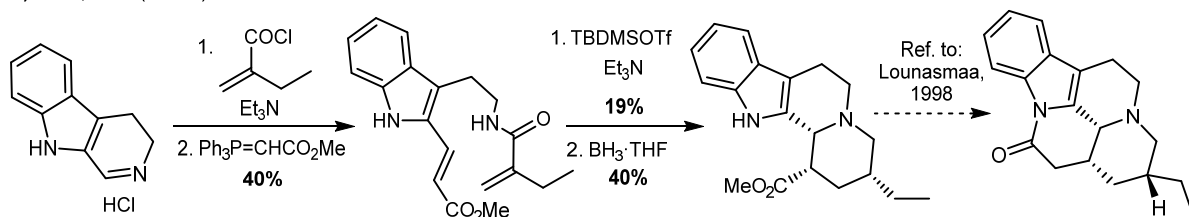
c) Lounasmaa, 1998 (lit. S9)



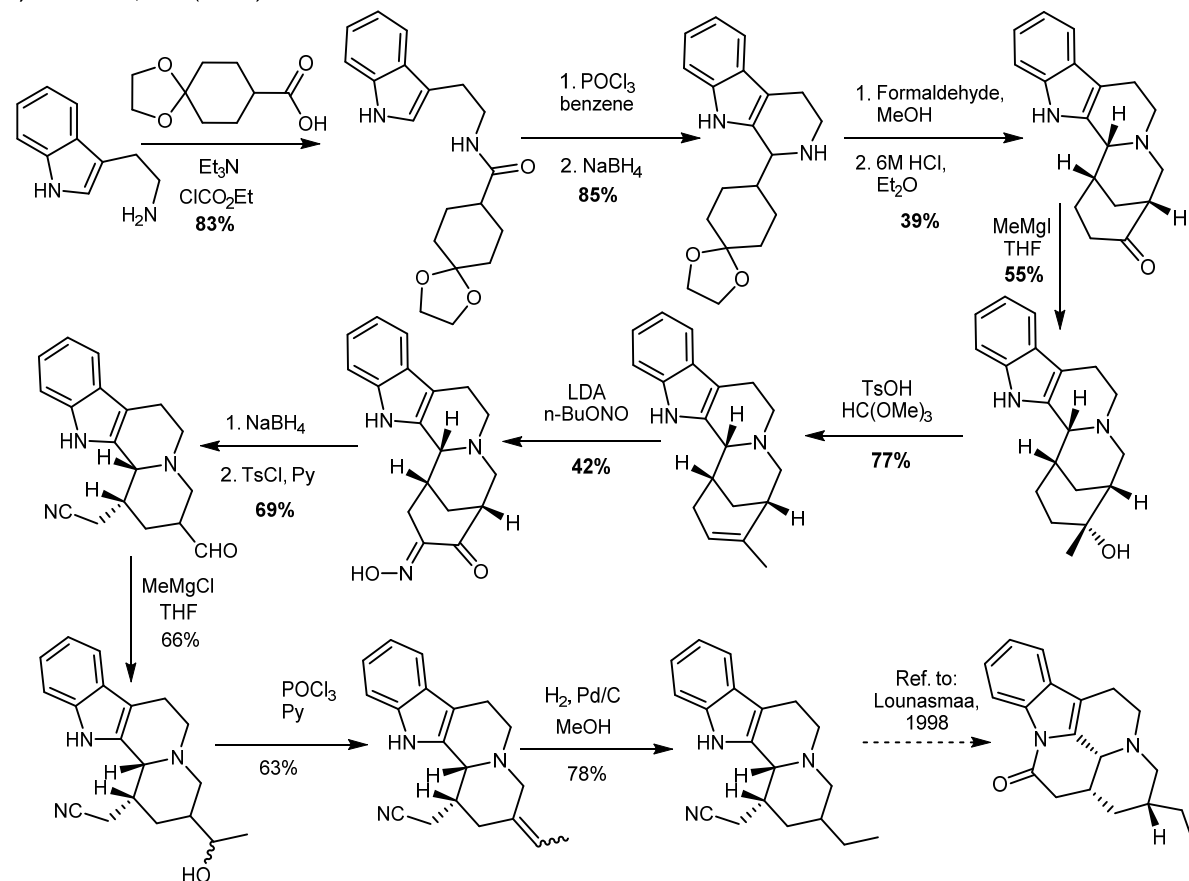
d) Lesma, 1999 & 2001 (lit. S10, S11)



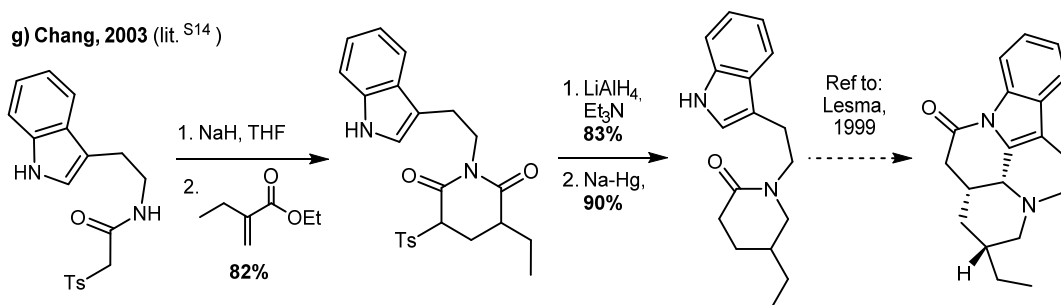
e) Ihara, 2000 (lit. S12)



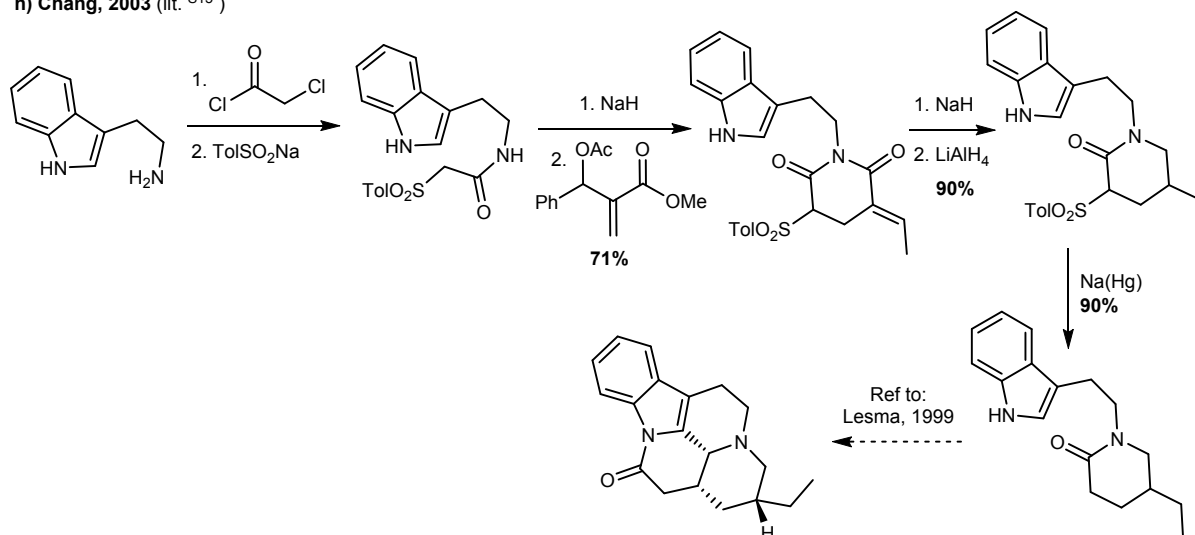
f) Tse-Lok Ho, 2002 (lit. S13)



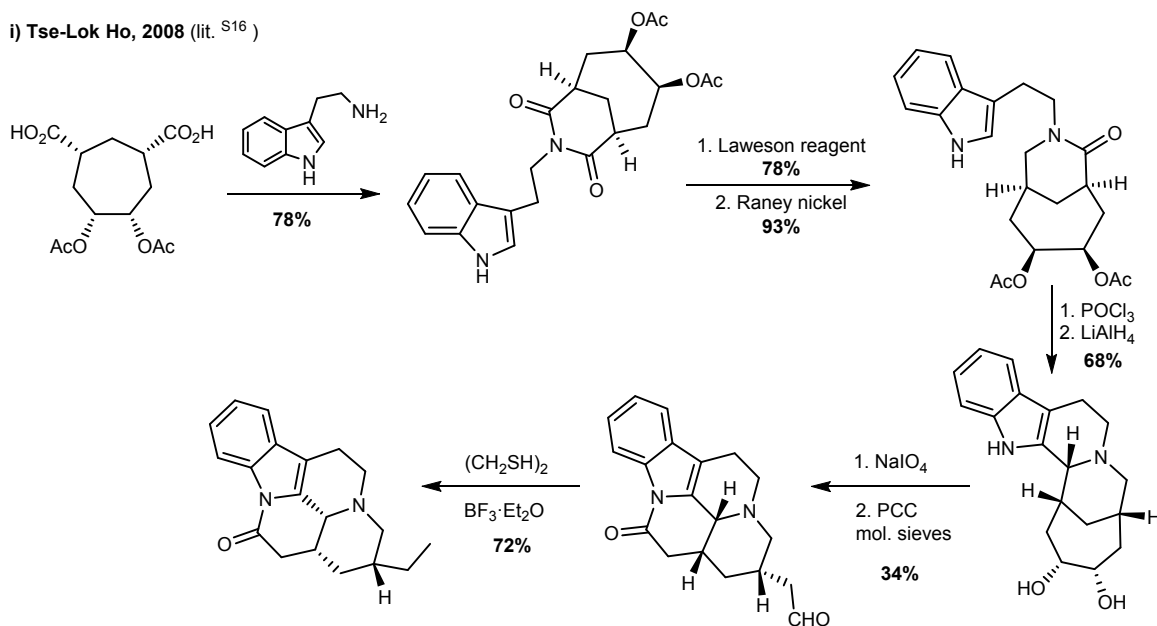
g) Chang, 2003 (lit. S14)



h) Chang, 2003 (lit. S15)



i) Tse-Lok Ho, 2008 (lit. S16)



j) Padwa, 2008 (lit. S17)

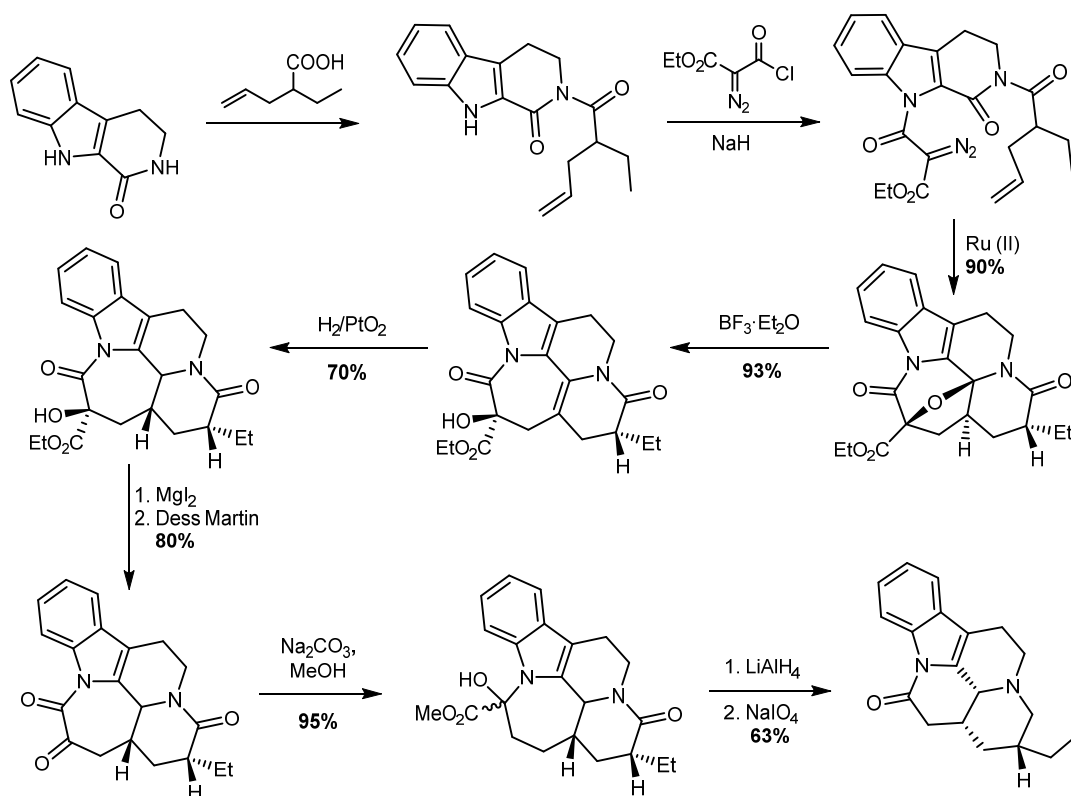


Figure S20. Literature syntheses of Tacamonine. Although our target differs from Tacamonine only by the presence of a tertiary alcohol stereocenter, the presented syntheses of Tacamonine cannot be easily adapted to Tacamonidine for the following reasons:

- Fukumoto 1994;** The strategy suffers from low stereocontrol and poor yield at the last step. By introduction of additional hydroxyl group, generation of stereocenters would be even more difficult to control, especially during the reduction of enamine. In this reaction replacing proton with more steric, protected hydroxyl group would cause covering one side (previously less hindered) of the enamine and promote reduction from the second, undesirable, side.
- Lounasmaa 1995;** Presented synthesis already starts from a complex substrate containing stereocenter next to the ethyl group. At this stage, it is impossible to incorporate hydroxyl group in a stereocontrolled manner.
- Lounasmaa 1998;** Adaptation of this synthesis would require stereoselective monohydroxylation of a double bond and subsequent protection of the formed hydroxyl group.
- Lesma 1999&2001;** Stereodifferentiation of stereocenters from substrate's racemic mixture was performed enzymatically – in this case, the enzyme acylated only one hydroxyl group in the diol. Application of this enzymatic method to Tacamonidine would require starting from triol, or triol with protected tertiary hydroxyl group. Reactivity and selectivity of this enzyme against modified substrate is unknown.

- e) **Ihara 2000**; The structure of the substrate used does not allow for the introduction of hydroxyl group.
- f) **Tse-Lok Ho 2002**; Adaptation of this synthesis would require stereoselective monohydroxylation of a double bond and subsequent protection of the formed hydroxyl group.
- g) **Chang 2003**; The structure of the substrate used does not allow for the introduction of hydroxyl group.
- h) **Chang 2003**; During reduction of imide to amide, double bond that could be used to introduce hydroxyl group is also reduced.
- i) **Tse-Lok Ho 2008**; This strategy is based on the use of a symmetric, seven-membered ring substrate. Addition of a hydroxyl group to this substrate desymmetrizes it, which makes this methodology much more difficult to adapt – using the asymmetric substrate with additional hydroxyl group in the thionation-reduction sequence, reaction would have to occur selectively on the carbonyl group with hydroxyl group in alpha position. That kind of stereoselective thionating agents are not known.
- j) **Padwa 2008**; To adapt this strategy to Tacamonidine, carboxylic acid would have to have a protected tertiary hydroxyl group in acid's alpha position. Such substrate is not commercially available or readily makeable – its synthesis requires using Davis' methodology^{S18} (stereocontrolled synthesis of tertiary alcohols in alpha position to esters) which suffers from low yields and poor enantiomeric excess, or preparing the substrate by longer synthesis using Seebach methodology^{S19}. Moreover, replacing proton with more steric, protected hydroxyl group could affect the stereoselectivity of H₂/PtO₂ reduction by covering the previously less hindered side of the molecule.

S3.3. Literature synthesis of aldehyde 14.

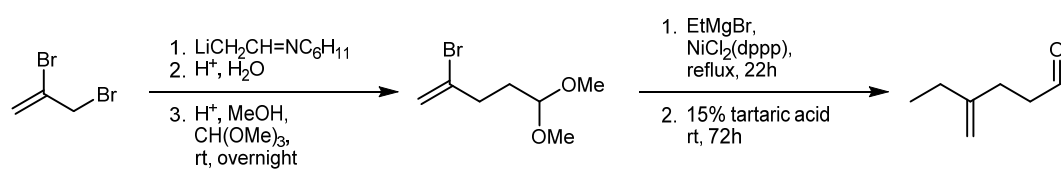


Figure S21. Literature synthesis^{S20} of aldehyde 14

S3.5. Synthetic details.

Reagents and solvents were purchased from commercial sources (Sigma-Aldrich, ABCR, POCH, Chempur). All reagents were used without further purification unless otherwise noted. Flash column chromatography was performed using Merck silica gel 60 (230-400 mesh, 40-63 μm). Reactions were monitored using Macherey-Nagel silica gel 60F254 aluminium plates and Merck silica gel 60F254 aluminium plates. TLC's were visualized by UV fluorescence (254 or 365 nm), iodine vapors or cerium-molybdate stain (Hanessian's stain).

All solvents were dried using appropriate molecular sieves (3 or 4 \AA). Solvents used for more humidity-sensitive reactions (THF, Et₂O, DCM, MeOH) were additionally distilled according to literature procedures^{S21} and kept in Schlenk tubes under inert gas. In the following experimental procedures, these solvents are described as "dry".

Phosphate buffer was prepared according to the following procedure. To prepare 100 mL of buffer: 13.8 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O and 4 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O was added to the flat-bottomed flask. Then, 100 mL of deionized water was added and the solution was stirred for 30-40 minutes until the salts were dissolved completely. The pH was measured with pH-meter (Seven2Go, Metler Toledo) and, if necessary, it was adjusted to pH 5.3 by adding H₃PO₄ (85%) or NaOH (solid). Thus prepared buffer is stable up to 3-4 weeks at room temperature.

NMR spectra were collected on a Bruker 400 MHz Avance III spectrometer or Varian VNMRs 600 MHz spectrometer at room temperature. Chemical shifts (δ) were reported in parts per million (ppm) relative to residual solvent peaks rounded to the nearest 0.01 (ref: CHCl₃ [¹H: 7.26, ¹³C: 77.2]). Coupling constants (J) were reported in Hz to the nearest 0.1 Hz. Peak multiplicity was indicated as follows: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), qi (quintet), sx (sextet) and m (multiplet).

HRMS spectra were recorded on AutoSpec Premier (Waters) or MaldiSYNAPT G2-S HDMS (Waters) spectrometers and are given in m/z.

UV-VIS spectra were recorded on Varian UV-VIS Cary 1E spectrometer.

IR spectra were recorded on FTIR Jasco 6200 spectrometer.

Optical rotation was recorded on Jasco P-2000 polarimeter.

Enantiomeric/diastereomeric excess was measured using chiral HPLC, column OD-H Daicel Chiralcel, apparatus: Jasco PU-2089PLUS, detector: Jasco MD-2010PLUS.

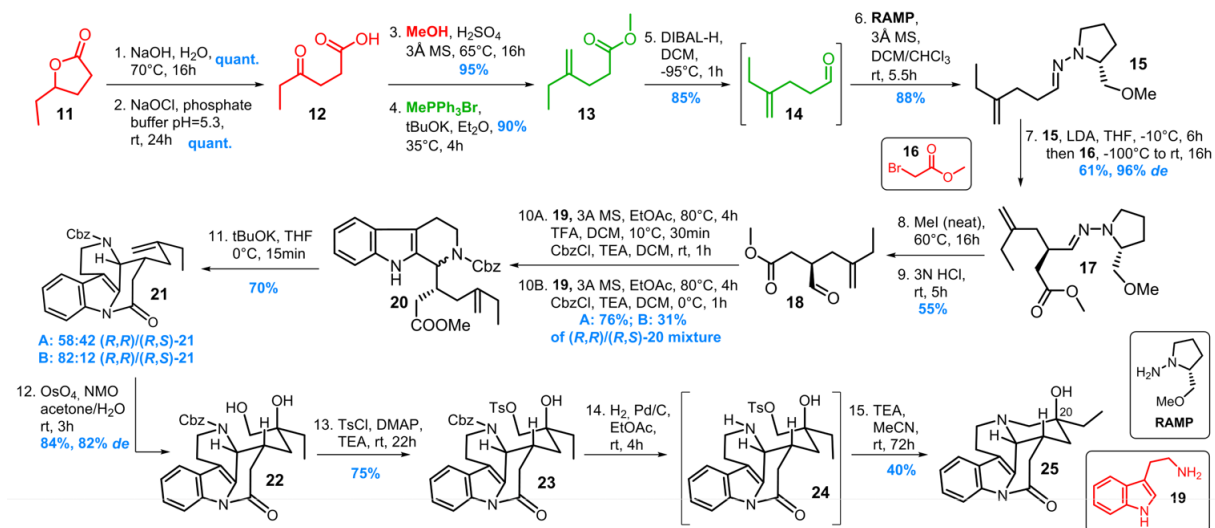
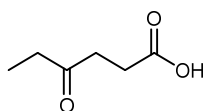


Figure S23. Scheme of Tacamonidine synthesis (same as in main-text **Figure 4**).



4-Oxohexanoic acid (**12**)

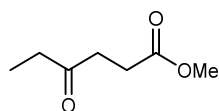
A round-bottom flask was charged with NaOH (3.8 g, 87.61 mmol) and distilled water (80 mL). After dissolution of NaOH, γ -hexalactone **11** (10.0 g, 87.61 mmol) was added via syringe and the reaction mixture was stirred at 70°C overnight (~16 hours). Then, water was removed *in vacuo* to obtain white solid (13.5 g), which was used in the next step without drying and further purification.

Solid obtained in the first step (13.5 g, 87.61 mmol) was dissolved in phosphate buffer (730 mL, pH = 5.3, see above for buffer preparation details). Then, while stirring vigorously, a 10% aqueous solution of NaOCl (134 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours. The reaction mixture was then divided into two equal portions and to each of them H₃PO₄ (85% in water) was added dropwise (while stirring) until pH = 3.6 was achieved. After acidification with H₃PO₄, each portion of reaction mixture was immediately extracted with AcOEt (4 x 250 mL). It is important to note that the extraction must be carried out immediately after acidification of the reaction mixture. Otherwise, under acidic conditions, acid **12** spontaneously cyclizes which results in decreasing the reaction yield and complicates the purification procedure. After extraction, combined organic phases were dried over anhydrous MgSO₄ and filtered. The solvent was removed *in vacuo* to obtain pure product **12** as white crystals (11.34 g, 100%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.64 (s, 1H), 2.75 (dd, J = 9.6, 3.9 Hz, 2H), 2.66 (dd, J = 9.8, 4.1 Hz, 2H), 2.50 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 1.10 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 209.3, 178.5, 36.3, 35.8, 27.8, 7.7.

HRMS: (m/z): calcd for C₆H₁₀O₃, [M+H]⁺, 130.0635; found 130.0630.



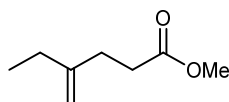
Methyl 4-oxohexanoate (SI-2)

The round-bottom flask was charged with 4-oxohexanoic acid **12** (11.97 g, 91.97 mmol), 3Å molecular sieves (2 g) and dry MeOH (62 mL). With vigorous stirring, H₂SO₄ (0.98 mL, 18.39 mmol) was added dropwise, and the flask was equipped with reflux condenser capped with a rubber septum. The system was then purged with nitrogen and the balloon with nitrogen was set at the top of the reflux condenser. The reaction was stirred overnight (~16 hrs.) at 65°C. After reaction completion (monitoring by TLC, developing stain: iodine), the reaction mixture was cooled down to room temperature and the molecular sieves were filtered off. Aqueous, saturated solution of NaHCO₃ (100 mL) was added to the filtrate and the aqueous phase was extracted with Et₂O (4x100 mL), dried over anhydrous MgSO₄ and filtered. Due to the volatility of the product, it was purified by flash column chromatography using low-boiling solvents (mobile phase: *n*-pentane:Et₂O, 3:1) which were later carefully removed *in vacuo* (500 mbar, 22°C) to obtain product **SI-2** as yellowish liquid (12.62 g, 95%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.70 (s, 3H), 2.75 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.62 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.50 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.10 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 209.3, 173.2, 51.7, 36.6, 35.8, 27.7, 7.7.

HRMS: (*m/z*): calcd for C₇H₁₂O₃Na, [M+Na]⁺, 167.0684; found 167.0678.



Methyl 4-methylenehexanoate (13)

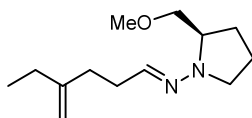
Procedure with *t*BuOK

The oven-dried Schlenk tube was charged with *t*BuOK (1.45 g, 12.95 mmol), the tube was tightly fitted with septum and the inert atmosphere was established. Dry Et₂O (10 mL) was added and the solution was stirred for 15-20 minutes at room temperature. In the meantime, the other oven-dried Schlenk tube was charged with Ph₃PMeBr (4.62 g, 12.95 mmol), the tube was tightly fitted with septum, argon atmosphere was established, and dry Et₂O (20 mL) was added. The solution of *t*BuOK in Et₂O was transferred to the Schlenk tube with Ph₃PMeBr via nitrogen-purged cannula – the reaction mixture immediately turned bright yellow. The reaction

mixture was stirred at room temperature for 2 hours and then methyl 4-oxohexanoate **SI-2** (0.912 g, 6.33 mmol) diluted with 2 mL of dry Et₂O was added. The reaction was stirred for another 4 hours at 35°C. Reaction progress was monitored by TLC (developing stain: iodine); after reaction completion, the reaction mixture was gently poured onto aqueous, saturated solution of NH₄Cl (80 mL), water phase was extracted with Et₂O (4x70 mL), combined organic phases were dried over MgSO₄ and filtered. Due to the volatility of the product, filtrate was slowly concentrated under reduced pressure (550 mbar, 22°C) and pre-purified by the flash column chromatography (pentane:Et₂O, 10:1 → pentane:Et₂O, 4:1). Fractions containing product were combined and carefully concentrated under reduced pressure to obtain 1.047 g solution of the product in Et₂O/*n*-pentane mixture. The exact quantity of obtained product was calculated based on the ¹H NMR spectra – 0.810 g product (90%) was obtained. Product was used in the next step without further purification.

*Procedure with *n*BuLi*

The oven-dried Schenk tube was charged with Ph₃PMeBr (6.90 g, 19.32 mmol) and tightly fitted with septum, and the inert atmosphere was established. Dry Et₂O (45 mL) was added, the solution was stirred for 20 minutes at room temperature and *n*BuLi (1.6 M in hexane, 12.07 mL, 19.32 mmol) was slowly added. While adding *n*BuLi, reaction mixture changed from colorless to bright yellow and then to orange. The reaction was stirred for 1 hour at room temperature and then methyl 4-oxohexanoate **SI-2** (1.83 g, 12.88 mmol) diluted with 2 mL of dry Et₂O was added. Immediately after adding 4-oxohexanoate, precipitation was observed and a thick solid formed. Meanwhile, the mixture changed its color to dark brown and then to light beige. The reaction was monitored using TLC (developing stain: iodine) and after 20 minutes of stirring at room temperature, no traces of starting material were observed. Reaction was quenched by addition of H₂O (25 mL) and aqueous, saturated solution of NH₄Cl (25 mL); water phase was extracted with Et₂O (3x50 mL), combined organic phases were dried over MgSO₄ and filtered. Due to the volatility of the product filtrate was slowly concentrated under reduced pressure (550 mbar, 22°C) and pre-purified by flash column chromatography (*n*-pentane:Et₂O = 10:1 → pentane:Et₂O = 4:1). Fractions containing product were carefully concentrated under reduced pressure to obtain 3.19 g solution of the product in Et₂O/pentane mixture. The exact quantity of obtained product was calculated based on the ¹H NMR spectra – 1.48 g of product **13** (81%) was obtained. Product was used in the next step without further purification.



(R)-N-(2-(methoxymethyl)pyrrolidin-1-yl)-4-methylenehexan-1-imine (15)

Reduction of methyl ester to aldehyde

The round-bottom flask was charged with methyl 4-methylenehexanoate **13** (1.41 g, 9.928 mmol) and DCM (22 mL) and argon atmosphere was established. The reaction mixture was cooled down to -100°C and DIBAL-H (1 M in DCM, 9.9 mL, 9.93 mmol) was added dropwise. The reaction was stirred at -100°C for 30 minutes, after which the reaction froze. The flask was put outside the bath and warmed with a heater. When reaction mixture became a liquid again, it was put back into a -100°C cooling bath and the reaction was carried at this temperature for another 30 minutes. Then, aqueous, saturated solution of NH_4Cl (13 mL) was added, the cooling bath was removed and the reaction was stirred for another 40 minutes. Another portion of aqueous, saturated solution of NH_4Cl (13 mL) was added and the aqueous phase was very gently extracted with CHCl_3 (4x25 mL) – otherwise, intensive shaking would lead to the formation of thick, inseparable emulsion. Combined organic phases were dried over MgSO_4 and filtered. Due to the volatility of the aldehyde **14**, the solvents were not removed and whole solution was used in the next step.

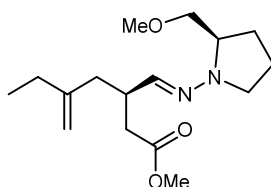
Hydrazone formation

To the solution of aldehyde **14** in DCM/ CHCl_3 from previous step, 3Å molecular sieves were added, inert atmosphere was established and RAMP (1.332 mL, 9.93 mmol) was added via syringe. The reaction mixture was stirred for 5.5 hours at room temperature and was monitored by TLC (product detection: UV, $\lambda = 254$ nm). After completion of the reaction, molecular sieves were filtered off and the solvents were removed *in vacuo*. The residue was then purified using flash column chromatography (hexane:AcOEt, 4:1) to yield 1.954 g (88%) of hydrazone **15** as a colorless liquid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.66 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.76 (s, 2H), 3.59 (dd, $J = 8.3, 3.0$ Hz, 1H), 3.52 – 3.26 (m, 6H), 2.74 (q, $J = 8.4$ Hz, 1H), 2.39 (m, 2H), 2.27 – 2.19 (m, 2H), 2.07 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.01 – 1.85 (m, 3H), 1.80 (d, 1H), 1.05 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 150.6, 138.5, 108.0, 104.3, 74.9, 63.5, 59.2, 50.5, 34.2, 31.4, 28.8, 26.6, 22.2, 12.4.

HRMS: (m/z): calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 225.1967; found 225.1960.



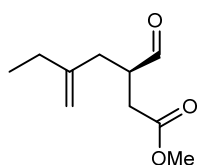
Methyl (*R*)-3-(((*R*)-2-(methoxymethyl)pyrrolidin-1-yl)imino)methyl)-5-methyleneheptanoate (17**)**

The oven-dried Schlenk tube was purged with argon and charged with dry THF (14 mL) and *i*Pr₂NH (0.806 mL, 5.75 mmol). The reaction mixture was cooled down to -70°C and *n*BuLi (1.6 M in hexane, 3.32 mL, 5.31 mmol) was added dropwise. The reaction was stirred at -70°C for 5 minutes and then it was moved to -10°C cooling bath. The mixture was stirred at -10°C for another 55 minutes and the solution of hydrazone **15** (0.993 g, 4.426 mmol) in dry THF (7 mL) was added – the reaction turned yellow. The reaction mixture was stirred at -10°C for another 6 hours. Then, it was cooled down to -100°C and methyl bromoacetate **16** (1.257 mL, 13.28 mmol) was added dropwise – the reaction turned orange. The mixture was allowed to warm to room temperature overnight. Next day, the solvents were removed *in vacuo* and the residue was purified by the flash column chromatography (hexane:AcOEt, 8:1 → hexane:AcOEt, 4:1) to yield 0.806 g (61%, 96.43% *de*) of compound **17** as orange oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.57 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 4.82 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 4.77 (s, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.57 (dd, *J* = 9.0, 3.4 Hz, 1H), 3.45 – 3.26 (m, 6H), 3.03 – 2.91 (m, 1H), 2.71 (dd, *J* = 16.5, 8.2 Hz, 1H), 2.53 (dd, *J* = 15.6, 8.3 Hz, 1H), 2.42 (dd, *J* = 15.6, 5.7 Hz, 1H), 2.27 (dd, *J* = 14.0, 7.3 Hz, 1H), 2.15 (dd, *J* = 14.1, 7.9 Hz, 1H), 2.07 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.99 – 1.75 (m, 4H), 1.05 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.3, 148.5, 138.9, 110.4, 74.6, 63.3, 59.2, 51.3, 49.8, 40.5, 37.2, 36.6, 28.4, 26.6, 22.0, 12.2.

HRMS: (*m/z*): calcd for C₁₆H₂₉N₂O₃ [M+H]⁺, 297.2178; found 297.2171.



Methyl (*R*)-3-formyl-5-methyleneheptanoate (18**)**

A round-bottom flask was charged with compound **17** (1.16 g, 3.917 mmol) and methyl iodide (7.5 mL). The reaction was stirred overnight (~16 hrs.) at 60 °C. Then, methyl iodide was

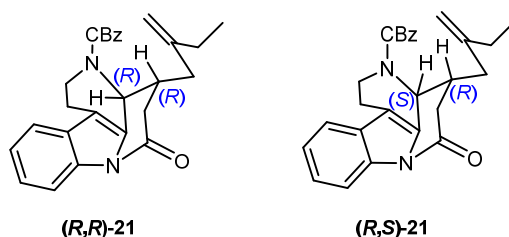
removed under vacuum. Brown oil (containing salt and trace amounts of methyl iodide) was then hydrolyzed using HCl (3N, 32.8 mL) and simultaneously extracted with petroleum ether* (160 mL). The two-phase reaction mixture was vigorously stirred for 30 minutes and then phases were separated. Another portion of petroleum ether (80 mL) was added to the aqueous phase and the mixture was stirred for 15 minutes. Then, the phases were separated again. The procedure was repeated 25 times, until the traces of product could not be detected in the extracting solution using TLC (developing stain: cerium-molybdate stain). Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and the solvents removed *in vacuo*. The remaining oil was purified by the flash column chromatography (*n*-pentane:Et₂O, 5:1) to yield 0.398 g (55%) of aldehyde **18** as yellow oil.

*It is important to note that changing extraction solvent to more polar one – etc. DCM – results in extracting residues of RAMP auxiliary, from which the aldehyde **18** is inseparable.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.77 (s, 1H), 4.91 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.07 – 2.98 (m, 1H), 2.69 (dd, *J* = 16.9, 8.1 Hz, 1H), 2.55 (dd, *J* = 14.5, 6.3 Hz, 1H), 2.46 (dd, *J* = 16.9, 5.0 Hz, 1H), 2.16 (dd, *J* = 14.5, 8.7 Hz, 1H), 2.07 (dd, *J* = 14.6, 7.1 Hz, 2H), 1.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 202.6, 172.3, 146.8, 111.4, 51.8, 45.6, 35.3, 32.6, 28.2, 12.1.

HRMS: (*m/z*): calcd for C₁₀H₁₆O₃Na [M+Na]⁺, 207.0997; found 207.0996.



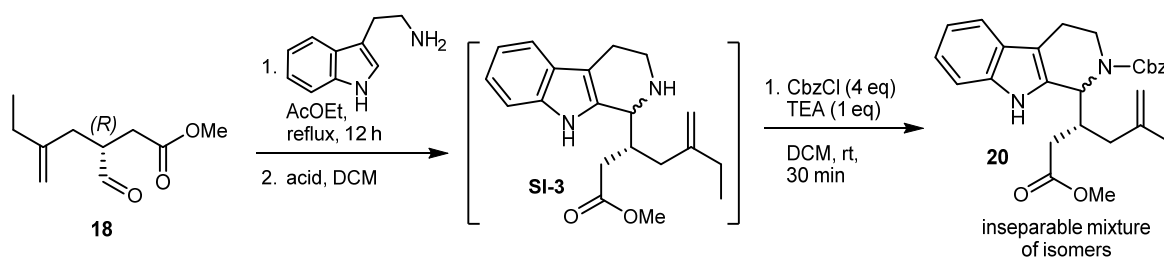
Benzyl (3a*R*,4*R*)-4-(2-methylenebutyl)-6-oxo-1,2,3a,4,5,6-hexahydro-3*H*-indol[3,2,1-*de*][1,5]naphthyridine-3-carboxylate ((*R,R*)-21)

Benzyl (3a*S*,4*R*)-4-(2-methylenebutyl)-6-oxo-1,2,3a,4,5,6-hexahydro-3*H*-indol[3,2,1-*de*][1,5]naphthyridine-3-carboxylate ((*R,S*)-21)

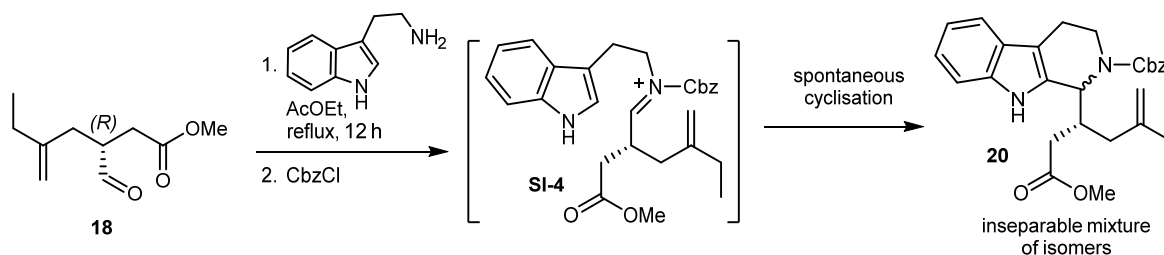
Pictet-Spengler reaction

In the first step of the Pictet-Spengler reaction, aldehyde **18** reacts with tryptamine to form imine. Imine can be then treated with acid to form product **SI-3** (*Cyclisation-protection procedure*, **Figure S24a**) or it can be directly treated with CbzCl to form activated imine **SI-4**, which undergoes spontaneous cyclisation (*Protection-cyclisation*, **Figure S24b**). In both procedures, an inseparable mixture of isomers (*R,R*)-**20** and (*R,S*)-**20** is formed. In the next step, after ring-closing acylation, isomers (*R,R*)-**21** and (*R,S*)-**21** can be efficiently separated by flash column chromatography.

a. Cyclisation-protection procedure



b. Protection-cyclisation procedure



c. Ring-closing acylation

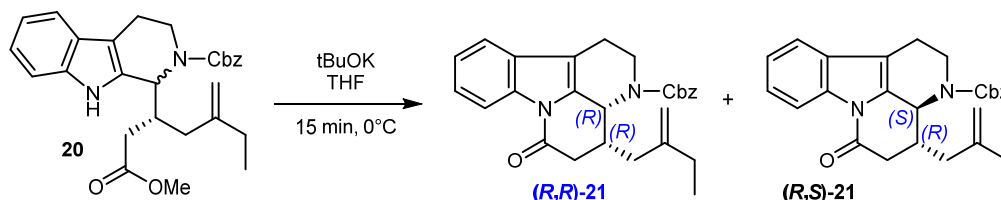


Figure S24. Pictet-Spengler reaction performed via cyclisation-protection (a) or protection-cyclisation (b) procedure, and the follow-up ring-closing acylation (c).

Cyclisation-protection procedure:

A round-bottom flask was charged with tryptamine **19** (0.086 g, 0.543 mmol), aldehyde **18** (0.100 g, 0.543 mmol), 3Å molecular sieves (0.300 g) and dry AcOEt (2 mL). The flask was equipped with reflux condenser capped with a rubber septum, the system was then purged with nitrogen and the balloon with nitrogen was set at the top of the reflux condenser. The reaction was stirred for 4 hours at 77 °C. Then, molecular sieves were filtered off and AcOEt was removed *in vacuo*. The residue was dissolved in dry DCM (2 mL), inert atmosphere was established, the reaction mixture was cooled down to 10°C and TFA (0.135 mL, 1.357 mmol) was added dropwise – the mixture turned green. The mixture was stirred for 30 minutes at 10°C (monitored by TLC, detection of product: UV, $\lambda = 254$ nm and $\lambda = 365$ nm) and quenched with aqueous saturated solution of NaHCO₃ (2 mL). Aqueous phase was extracted with DCM (3x15 mL), combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and the solvents were removed *in vacuo*. The crude product was used in the next step without further purification*.

*Purification by flash column chromatography (AcOEt as mobile phase) results in spontaneous formation of a five-member lactam ring (**Figure S25**).

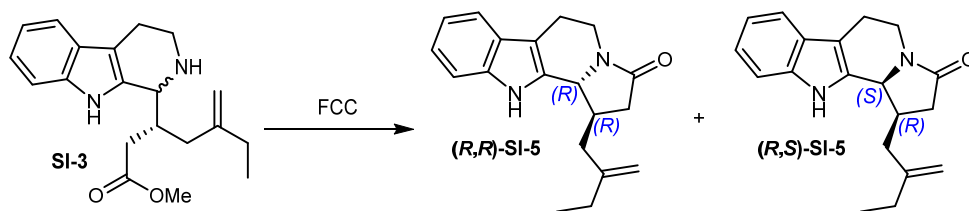


Figure S25. Spontaneous formation of five-member lactam rings as byproducts of the Pictet-Spengler reaction.

Cyclisation-protection procedure - CBz protection

The residue from the first step was dissolved in dry DCM (2 mL), inert atmosphere was established and the reaction mixture was cooled down to 0°C. CBzCl (0.330 mL, 2.172 mmol) and TEA (0.075 mL, 0.543 mmol) were added subsequently and the reaction was stirred at room temperature for 1 hour (monitored by TLC, detection of product: UV, $\lambda = 254$ nm and $\lambda = 365$ nm). The reaction was quenched with water (10 mL), aqueous phase was extracted with DCM (3x15 mL). Combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered, and the solvents were removed *in vacuo*. The crude residue was pre-purified using the flash column chromatography (hexane:AcOEt, 5:1) to yield 0.191 g (76%) inseparable mixture of isomers **(R,R)-20** and **(R,S)-20** as pale yellow solid. Obtained solid was used in the next step without further purification.

Cyclisation-protection procedure - ring-closing acylation

The mixture of isomers from the previous step (0.191 g, ~0.414 mmol) was dissolved in dry THF (4 mL) and inert atmosphere was established. The reaction mixture was cooled down to 0°C and a solution of *t*BuOK (0.046 g, 0.414 mmol) in THF (3 mL) was added dropwise – the mixture turned bright yellow. The mixture was stirred for 15 minutes (monitored by TLC, detection of product: UV, $\lambda = 254$ nm and $\lambda = 365$ nm). After completion of the reaction, silica gel was added to the reaction mixture and the solvents were removed *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (hexane:AcOEt, 10:1 → hexane:AcOEt, 3:1) afforded 0.0718 g of **(R,R)-21** (31% over 4 steps) and 0.051 g of **(R,S)-21** (22% over 4 steps).

Protection-cyclisation procedure:

A round-bottom flask was charged with tryptamine **19** (0.044 g, 0.274 mmol), aldehyde **18** (0.050 g, 0.274 mmol), 3Å molecular sieves (0.150 g) and dry AcOEt (1 mL). The flask was equipped with reflux condenser capped with a rubber septum, the system was then purged with nitrogen and the balloon with nitrogen was set at the top of the reflux condenser. The reaction was stirred for 4 hours at 77°C. Then, molecular sieves were filtered off and AcOEt was removed *in vacuo*. The residue was dissolved in dry DCM (1 mL), inert atmosphere was established, the reaction mixture was cooled down to 0°C and CBzCl (0.167 mL, 1.096 mmol) in DCM (1 mL) was added dropwise. The mixture was stirred for 1 hour at room temperature. It was then quenched with water (10 mL). Aqueous phase was extracted with DCM (3x15 mL), combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered, and the solvents were removed *in vacuo*. The crude residue was pre-purified using the flash column chromatography (hexane:AcOEt, 5:1) to yield 0.039 g (31%) inseparable mixture of isomers **(R,R)-20** and **(R,S)-20** as pale yellow solid. Obtained solid was used in the next step without further purification.

Protection-cyclisation procedure - ring-closing acylation

The mixture of isomers from previous step (0.039 g, ~0.08 mmol) was dissolved in dry THF (1 mL) and inert atmosphere was established. The reaction mixture was cooled down to 0 °C and a solution of *t*BuOK (0.01 g, 0.08 mmol) in THF (2 mL) was added dropwise – the mixture turned bright yellow. The mixture was stirred for 15 minutes (monitored by TLC, detection of product: UV, $\lambda = 254$ nm and $\lambda = 365$ nm). After completion of the reaction, silica gel was added to the reaction mixture and the solvents were removed *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (hexane:AcOEt, 10:1 → hexane:AcOEt, 3:1) afforded 0.0197 g of **(R,R)-21** (17% over 3 steps) and 0.0048 g of **(R,S)-21** (4% over 3 steps).

Compound (R,R)-21

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.43 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.49 (m, 2H), 7.46 – 7.32 (m, 14H), 5.32 (s, 2H), 5.26 (d, *J* = 11.6 Hz, 4H), 4.82 (s, 2H), 4.67 (d, *J* = 11.2 Hz, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.08 – 2.94 (m, 4H), 2.85 (d, *J* = 2.5 Hz, 4H), 2.81 (s, 2H), 2.78 – 2.70 (m, 2H), 2.15 (dd, *J* = 13.9, 3.1 Hz, 2H), 1.98 – 1.81 (m, 4H), 1.61 (t, *J* = 12.9 Hz, 3H), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.0, 155.8, 147.1, 136.4, 134.9, 131.2, 128.9, 128.64, 128.3, 128.1, 124.8, 124.1, 118.1, 116.5, 116.2, 111.2, 67.6, 52.5, 42.7, 36.8, 34.1, 28.2, 21.5, 12.1.

HRMS: (*m/z*): calcd for C₂₇H₂₈N₂O₃Na [M+Na]⁺, 451.1998; found 451.1989.

Compound (R,S)-21

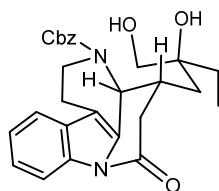
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.37 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.51 – 7.29 (m, 8H), 5.28 (s, 2H), 5.07 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.83 – 4.48 (m, 2H), 2.94 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H), 2.71 (s, 2H), 2.50 (s, 2H), 2.35 (m, 1H), 2.05 (m, 3H), 1.02 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.7, 156.8, 147.4, 136.4, 134.8, 133.6, 129.4, 128.6, 128.3, 128.0, 124.7, 124.2, 118.2, 116.2, 114.9, 110.5, 67.9, 54.4, 41.3, 39.5, 38.4, 28.4, 22.2, 12.2.

HRMS: (*m/z*): calcd for C₂₇H₂₈N₂O₃Na [M+Na]⁺, 451.2178; found 451.2161

Optimization of Pictet-Spengler reaction.

Cyclisation-protection procedure				
Nr	Acid	Temp. [°C]	Total yield ((R,R) and (R,S)-21 mixture)	Products (R,R)-26 : (R,S)-21
1	TFA (2.5 eq)	10	<u>53%</u>	<u>58 : 42</u>
2	TFA (2.5 eq)	5	32 %	62 : 38
3	TFA (2.5 eq)	0	46 %	50 : 50
4	TFA (1.75 eq)	0	34 %	48 : 52
5	TFA (1.3 eq)	0	31 %	32 : 68
Protection-cyclisation procedure				
6	none	25	42 %	45 : 55
7	none	0	20 %	82 : 18
8	none	-40	24 %	55 : 45



Benzyl (3a*R*,4*R*)-4-((*S*)-2-hydroxy-2-(hydroxymethyl)butyl)-6-oxo-1,2,3a,4,5,6-hexahydro-3*H*-indol[3,2,1-*de*][1,5]naphthyridine-3-carboxylate (22**)**

Procedure with AD-mix α

A round-bottom flask was charged with compound (***R,R***-**21**) (0.145 g, 0.341 mmol), AD-mix α (0.450 g), *t*-BuOH (1.3 mL) and H₂O (1.3 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 days, and then Na₂SO₃ (2.6 g) was added and the reaction was stirred for another 1.5 hours. Silica gel was added to the mixture, the mixture was then evaporated to dryness and purified by flash column chromatography (hexane:AcOEt, 2:1 \rightarrow 100% AcOEt) to yield mixture of diastereoisomers **22** (0.037 g, 23%, 65%_{BRSM}, 81% *de*).

Procedure with AD-mix β

Procedure with AD-mix β was performed analogously to the procedure with AD-mix α . Mixture of diastereoisomers **22** was obtained with 51% *de*.

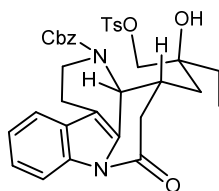
Procedure with OsO₄

Compound (***R,R***-**21**) (0.0545 g, 0.127 mmol) was dissolved in acetone (0.6 mL), then OsO₄ (0.450 g, 0.0039 mmol), NMO (0.023 g, 0.191 mmol) and H₂O (0.4 mL) were added. The inert atmosphere was established, the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours, and then Na₂SO₃ (1.0 g) was added and the reaction was stirred for another hour. Solvents were evaporated to dryness and crude product was then purified by flash column chromatography (hexane:AcOEt, 2:1 \rightarrow 100% AcOEt) to yield mixture of diastereoisomers **22** (0.0495 g, 84%, 82%*de*).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.45 – 8.39 (m, 1H), 7.50 – 7.31 (m, 8H), 5.27 (s, 2H), 5.10 (d, 1H), 4.64 (d, 1H), 3.31 (dd, 3H), 3.10 (d, 3H), 2.95 (d, 1H), 2.84 (d, 1H), 2.74 (d, 1H), 1.43 (dd, 2H), 1.12 (dd, 1H), 0.75 (dt, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.6, 156.0, 136.4, 134.9, 131.2, 128.8, 128.6, 128.4, 128.4, 128.3, 124.8, 124.1, 118.1, 116.5, 74.3, 67.7, 66.6, 53.1, 42.8, 39.8, 32.7, 30.1, 28.3, 21.3, 7.6.

HRMS: (*m/z*): calcd for C₂₇H₃₀N₂O₅Na [M+Na]⁺, 485.2052; found 485.2037.



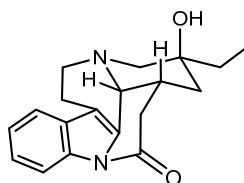
Benzyl (3a*R*,4*R*)-4-((*S*)-2-hydroxy-2-((tosyloxy)methyl)butyl)-6-oxo-1,2,3a,4,5,6-hexahydro-3*H*-indol[3,2,1-*de*][1,5]naphthyridine-3-carboxylate (23**)**

To a round-bottom flask mixture **22** (0.036 g, 0.079 mmol) was added and inert atmosphere was established. DCM (0.2 mL) and solution of DMAP (0.002 g, 0.0157 mmol) and TsCl (0.030, 0.158 mmol) in DCM (0.5 mL) were added sequentially. TEA (0.0330 mL, 0.237 mmol) was added dropwise via syringe and the reaction mixture was stirred at room temperature for 22 hours. Crude reaction mixture was then purified by flash column chromatography (hexane:AcOEt, 2:1 → hexane:AcOEt, 1:1 → 100% AcOEt) to yield mixture of diastereoisomers **23** (0.0367 g, 75%, 99%_{BRSM}) as an orange solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (d, 1H), 7.73 (dd, 2H), 7.50 – 7.29 (m, 9H), 7.26 (d, 1H), 5.27 (d, 2H), 5.08 (s, 1H), 4.64 (d, 1H), 3.87 – 3.78 (m, 1H), 3.78 – 3.60 (m, 1H), 3.11 (dd, 3H), 2.92 (s, 1H), 2.80 (s, 1H), 2.70 (s, 1H), 2.43 (d, 3H), 1.45 (d, 2H), 1.12 – 0.86 (m, 2H), 0.67 (dt, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.3, 167.2, 156.0, 155.9, 145.1, 136.4, 136.2, 134.83, 132.4, 132.2, 131.0, 129.9, 128.8, 128.6, 128.6, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 124.9, 124.1, 124.1, 118.1, 118.1, 116.5, 116.4, 73.9, 73.7, 73.1, 72.6, 67.9, 67.8, 53.0, 52.9, 42.8, 42.7, 39.6, 38.9, 32.9, 31.3, 30.3, 27.9, 21.6, 21.3, 7.8, 7.4.

HRMS: (*m/z*): calcd for C₃₄H₃₆N₂O₇NaS [M+Na]⁺, 639.2141; found 639.2134



(*R,R,S*)-Tacamonidine (25)

CBz removal

The round-bottom flask was charged with mixture of diastereoisomers **23** (0.0769 g, 0.124 mmol), the flask was equipped with a rubber septum and inert atmosphere was established. Then, the septum was removed, Pd/C (0.155 g) and dry AcOEt (4.5 mL) were added sequentially. The reaction mixture was then purged with hydrogen for 5 minutes and was stirred under hydrogen for 4 hours at room temperature. After completion of the reaction (monitoring by TLC), Pd/C was filtered off on a Büchner funnel. The filtrate was concentrated under reduced pressure and used directly in the next step without further purification.

Ring-closing alkylation

The round-bottom flask was charged with crude mixture **24** from the previous step, inert atmosphere was established, and MeCN (3.5 mL) and TEA (0.431 mL, 3.1 mmol) were added sequentially. The reaction was stirred at room temperature for 3 days and purified by flash column chromatography (AcOEt:MeOH, 10:1) to yield (*R,R,S*)-Tacamonidine **25** (0.015 g, 40%) as a white powder. Spectroscopic and physical data matched the reported literature³⁶.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.39 (dd, *J* = 7.0, 1.2 Hz, 1H), 7.48 – 7.42 (m, 1H), 7.38 – 7.28 (m, 2H), 4.42 – 4.34 (m, 1H), 3.42 (ddd, *J* = 14.0, 11.6, 5.8 Hz, 1H), 3.29 (dd, *J* = 14.0, 6.3 Hz, 1H), 3.05 (dd, *J* = 17.1, 5.2 Hz, 1H), 2.85 (m, 2H), 2.65 (dd, *J* = 17.1, 2.2 Hz, 1H), 2.57 (ddd, *J* = 16.9, 5.6, 2.5 Hz, 1H), 2.43 (dd, *J* = 11.2, 2.1 Hz, 1H), 2.32 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 1.69 – 1.64 (m, 1H), 1.39 – 1.33 (m, 2H), 0.85 (m, 4H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.2, 134.5, 130.5, 129.7, 124.5, 124.0, 118.1, 116.3, 112.8, 69.8, 53.7, 52.8, 50.4, 38.8, 35.8, 32.5, 30.0, 16.8, 6.8.

HRMS: (*m/z*): calcd for C₁₉H₂₃N₂O₂ [M+H]⁺, 311.1760; found 311.1749.

UV (MeCN) λ_{max}(Abs) 198.00 (1.6052), 240.67 (0.8804), 268.33 (0.4656), 294.33 (0.2123) nm

IR (dry film) ν_{max} 3391, 2925, 1702, 1451, 1381, 1327, 1133, 1100, 1026, 750, 505, 440 cm⁻¹

[α]_D²⁵ (c 0.12, CHCl₃) +62.8

S3.6. Alternative route of obtaining aldehyde 14.

As compounds **SI-2** and **13** are volatile, alternative route of obtaining aldehyde **14** (**Figure S26**) was also developed. It includes the use of benzyl ester instead of methyl one, which facilitates purification of intermediates.

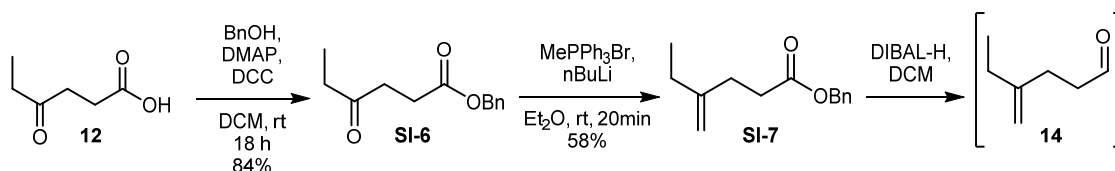
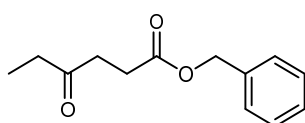


Figure S26. Alternative route of obtaining aldehyde **14**.



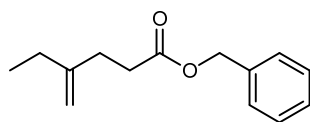
Benzyl 4-oxohexanoate (**SI-6**)

The round-bottom flask was charged with 4-oxohexanoic acid **12** (3.21 g, 24.65 mmol), DMAP (0.602 g, 4.93 mmol) and DCM (50 mL). The flask was capped with a rubber septum, the inert atmosphere was established and the reaction mixture was cooled down to 0°C. Then, the flask was opened, DCC (6.103 g, 29.58 mmol) was added, and inert atmosphere was established again. Benzyl alcohol (5.10 mL, 49.30 mmol) was added dropwise, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature, and then it was stirred for 18 hours. In the course of the reaction thick, brown sludge was formed. The sludge was filtered off on the Büchner funnel with a Celite pad and washed with DCM. The filtrate was concentrated under reduced pressure and was purified by the flash column chromatography (hexane:AcOEt → 7:1) to yield product **SI-6** (4.57 g, 84%) as yellowish oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45 – 7.30 (m, 5H), 5.14 (s, 2H), 2.76 (dd, *J* = 9.8, 3.9 Hz, 2H), 2.67 (dd, *J* = 9.6, 3.8 Hz, 2H), 2.49 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.09 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 209.3, 172.7, 135.9, 128.5, 128.2, 66.5, 36.6, 35.9, 28.1, 7.8.

HRMS: (*m/z*): calcd for C₁₃H₁₆O₃, [M+H]⁺, 220.1099; found 220.1092.



Benzyl 4-methylenehexanoate (SI-7)

The oven-dried Schlenk tube was charged with Ph_3PMeBr (9.29 g, 25.88 mmol) and tightly fitted with septum, and inert atmosphere was established. Dry Et_2O (70 mL) was added, the solution was stirred for 20 minutes at room temperature and $n\text{BuLi}$ (1.6 M in hexane, 15.55 mL, 24.89 mmol) was added slowly – while adding $n\text{BuLi}$, the reaction mixture changed from colorless to bright yellow and then, orange. The reaction was stirred for 1 hour at room temperature and then benzyl 4-oxohexanoate **SI-6** (4.38 g, 19.91 mmol) diluted with 2 mL of dry Et_2O was added. Immediately after adding 4-oxohexanoate, precipitation was observed, a thick solid was formed, and the reaction mixture changed color to dark brown and then to light beige. The reaction progress was monitored using TLC (developing stain: iodine) and after 20 minutes of stirring at room temperature, no traces of starting material were observed. Reaction was quenched by addition of aqueous, saturated solution of NH_4Cl (80 mL), water phase was extracted with Et_2O (3x70 mL). Combined organic phases were dried over MgSO_4 and filtered. The filtrate was slowly concentrated under reduced pressure (550 mbar, 22°C) and pre-purified by the flash column chromatography (pentane: Et_2O = 10:1 \rightarrow pentane: Et_2O = 4:1). Fractions containing product were combined and carefully concentrated under reduced pressure to obtain solution of the product in Et_2O /pentane mixture. The quantity of the obtained product was calculated based on the ^1H NMR spectra – 2.53 g product (58%) was obtained. Product was then reduced with DIBAL (analogically to the procedure of obtaining methyl 4-methylenehexanoate **14** described earlier) without further purification.

S3.7. Determination of diastereomeric excess after alkylation reaction.

Enantiomeric excess of the alkylation product was measured by comparison of product (*R,R*)-**17** obtained by a standard procedure (Figure S27a) with the mixture of products (*R,R*)-**17** and (*S,R*)-**17**. Product (*S,R*)-**17** was obtained according to the following procedure (Figure S27b).

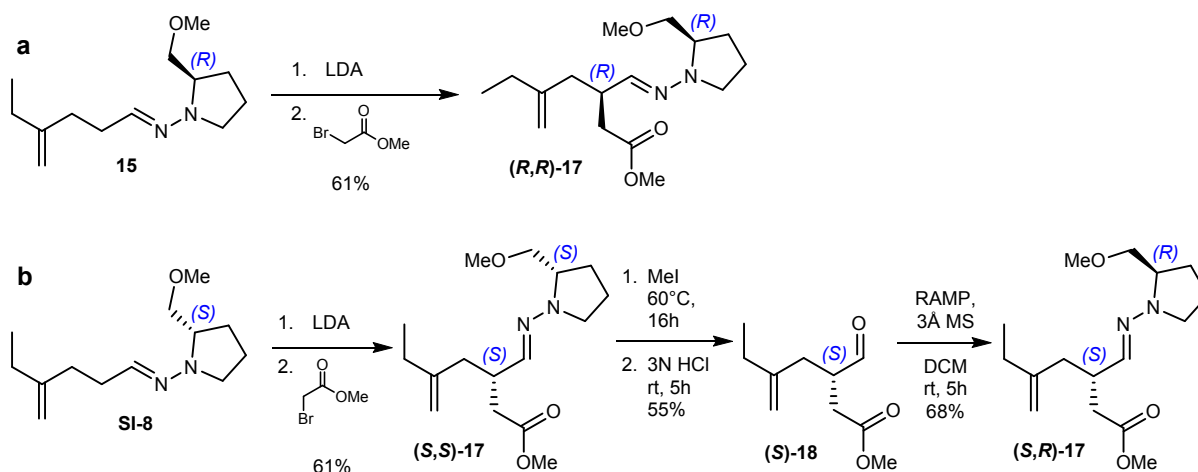
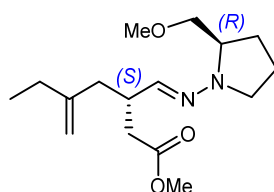


Figure S27. Synthesis of compounds: **a**) (*R,R*)-**17** and **b**) (*S,R*)-**17**.

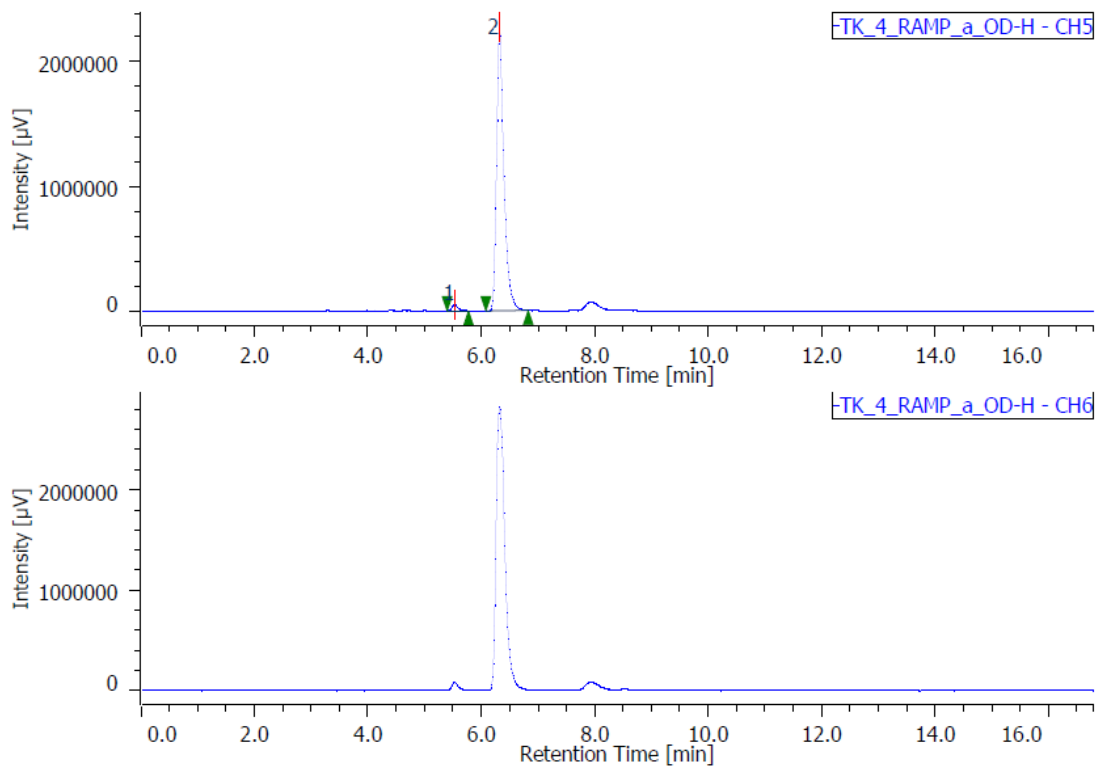


Methyl (*S*)-3-(((*R*)-2-(methoxymethyl)pyrrolidine-1-yl)imino)methyl)-5-methyleneheptanoate ((*S,R*)-**17**)

To the solution of aldehyde (*S*)-**18** (0.0753 g, 0.409 mmol) (obtained analogically to the aldehyde **18** described in S2.5) in DCM (1.5 mL) 3Å molecular sieves were added, inert atmosphere was established and RAMP (0.055 mL, 0.409 mmol) was added via syringe. The reaction mixture was stirred for 16 hours at room and monitored by TLC (detection of product: UV, $\lambda = 254$ nm). After completion of the reaction, molecular sieves were filtered off and the solvents were removed *in vacuo*. The residue was then purified by the flash column chromatography (hexane:AcOEt, 10:1 \rightarrow hexane:AcOEt, 7:1) to yield 0.0819 g (68%) of (*S,R*)-**17** as a colorless oil.

TK_4_RAMP_a_OD-H-CH1

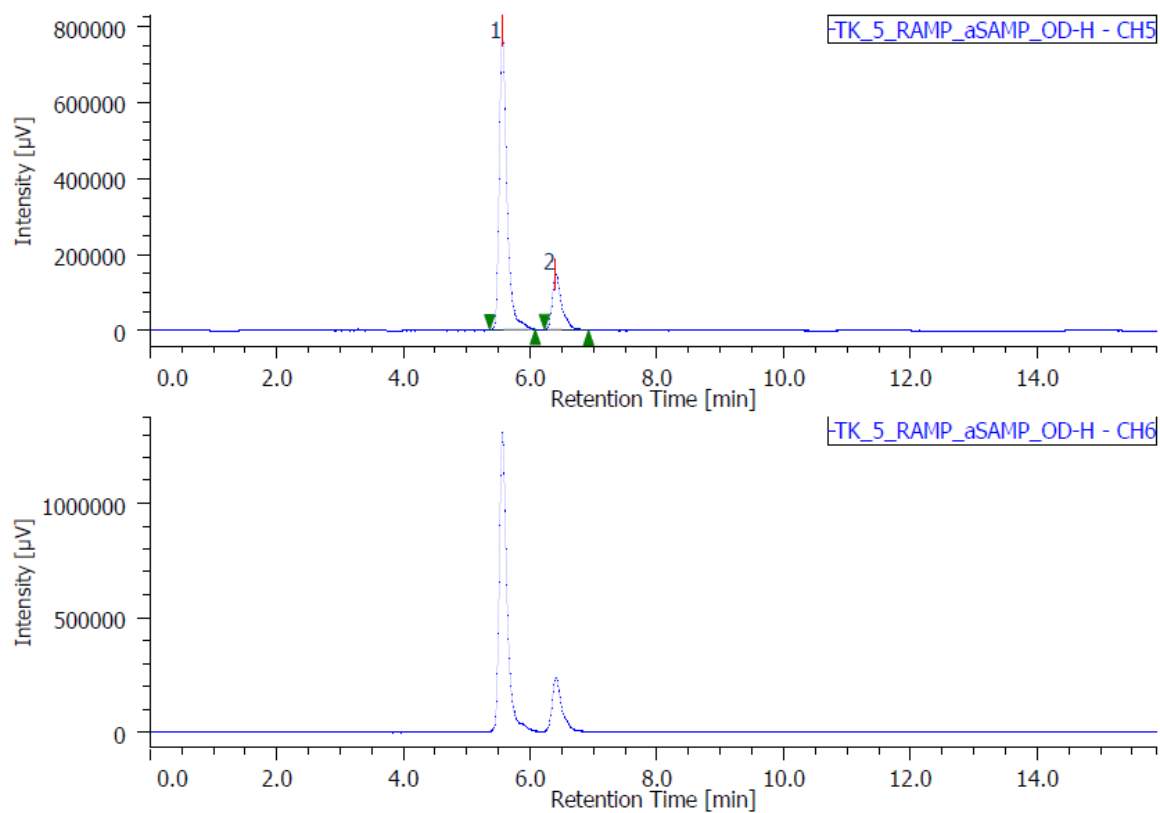
Chromatogram



#	Peak Name	CH	tR [min]	Area [µV·sec]	Height [µV]	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
1	Unknown	5	5.533	370571	47193	1.785	2.037	N/A	12342	3.745	1.317	
2	Unknown	5	6.320	20389798	2269572	98.215	97.963	N/A	12967	N/A	1.468	

Figure S28. Chromatogram of compound (*R,R*)-**17** (column: OD-H Daicel Chiralcel, mobile phase: 2% *i*PrOH + 98% hexane, wavelength: 230nm, flow rate: 1.0ml/min).

Chromatogram



#	Peak Name	CH	tR [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{sec}$]	Height [μV]	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
1	Unknown	5	5.560	6610629	786119	81.366	84.373	N/A	12002	3.745	1.463	
2	Unknown	5	6.400	1513969	145605	18.634	15.627	N/A	10756	N/A	1.577	

Figure S29. Chromatogram of compound (S,R)-17 (column: OD-H Daicel Chiralcel, mobile phase: 2% *i*PrOH + 98% hexane, wavelength: 230nm, flow rate: 1.0 ml/min).

Chromatogram

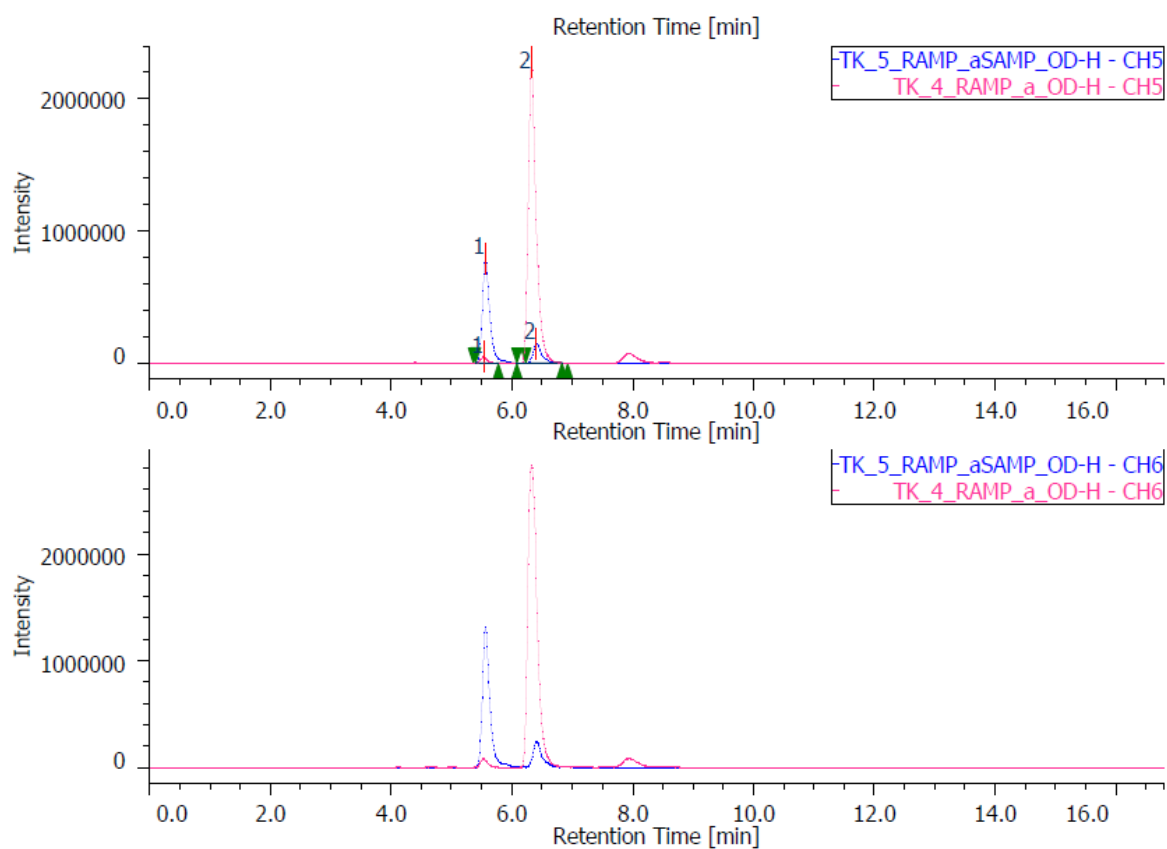


Figure S30. Comparison of chromatograms for compounds *(R,R)*-17 (red) and *(S,R)*-17 (blue).

S3.8. Determination of diastereomeric excess after dihydroxylation reaction.

Diastereomeric excess of compound (*R,R,S*)-**22** was determined by performing dihydroxylation procedures using chiral ligands (both AD-mix α and AD-mix β) and in non-chiral conditions using OsO₄ (see Section S3.5. for procedure details). Chromatograms (Figures S31-S34) show that in all cases compound (*R,R,S*)-**22** is obtained in excess.

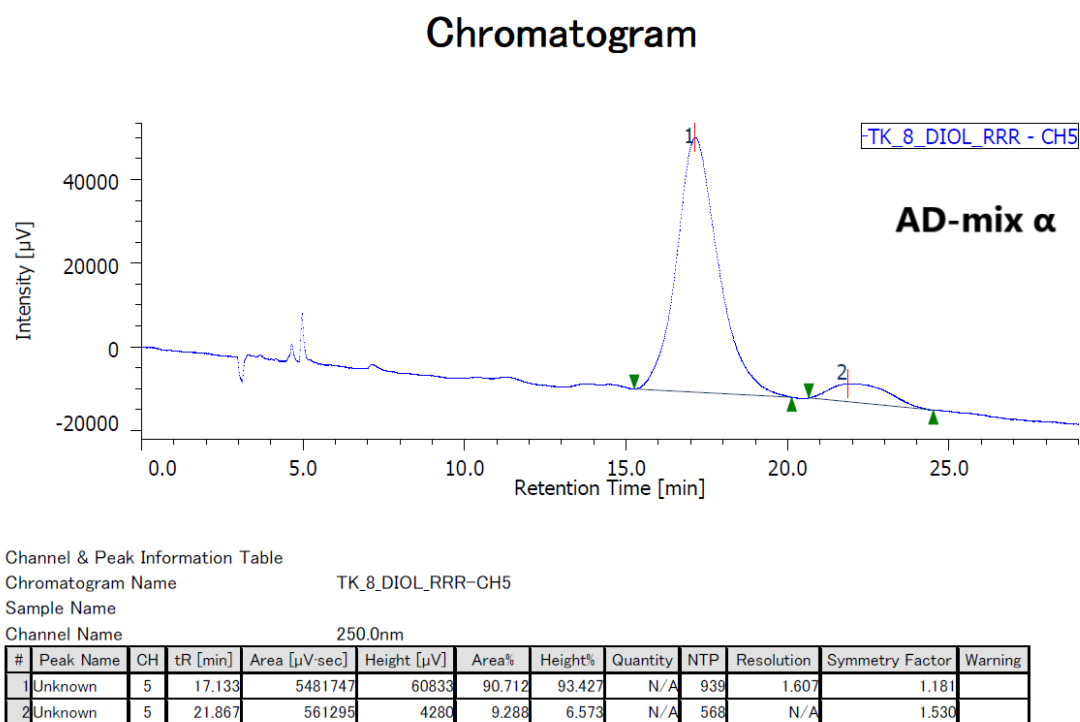
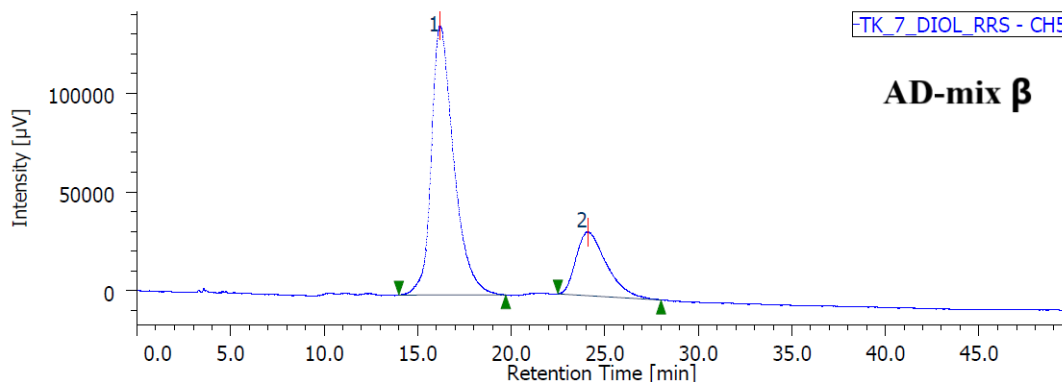


Figure S31. Chromatogram of mixture **22** after reaction with AD-mix α (column: OD-H Daicel Chiralcel, mobile phase: 20% *i*PrOH + 80% hexane, wavelength: 250nm, flow rate: 1.0 ml/min).

Chromatogram



Channel & Peak Information Table

Chromatogram Name TK_7_DIOL_RRS-CH5

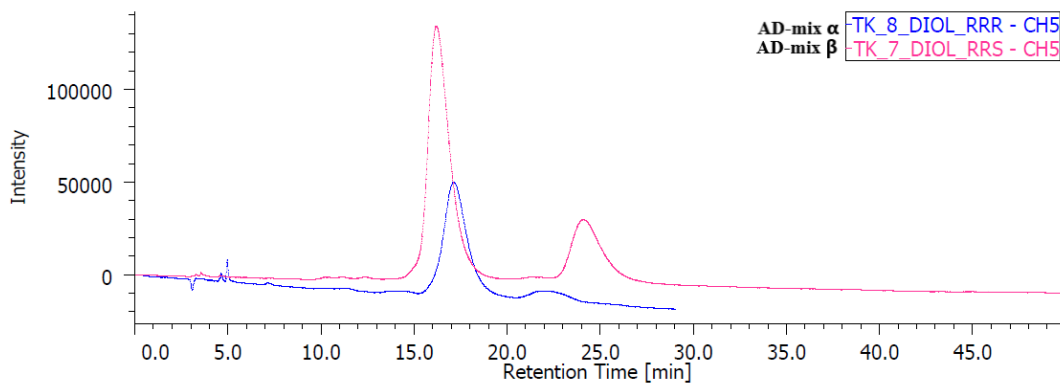
Sample Name

Channel Name 250.0nm

#	Peak Name	CH	tR [min]	Area [µV-sec]	Height [µV]	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
1	Unknown	5	16.200	11359677	136191	75.693	80.870	N/A	986	3.170	1.341	
2	Unknown	5	24.093	3647831	32217	24.307	19.130	N/A	1082	N/A	1.502	

Figure S32. Chromatogram of mixture **22** after reaction with AD-mix β (column: OD-H Daicel Chiralcel, mobile phase: 20% *i*PrOH + 80% hexane, wavelength: 250nm, flow rate: 1.0 ml/min).

Chromatogram



Channel & Peak Information Table

Chromatogram Name TK_8_DIOL_RRR-CH5

Sample Name

Channel Name 250.0nm

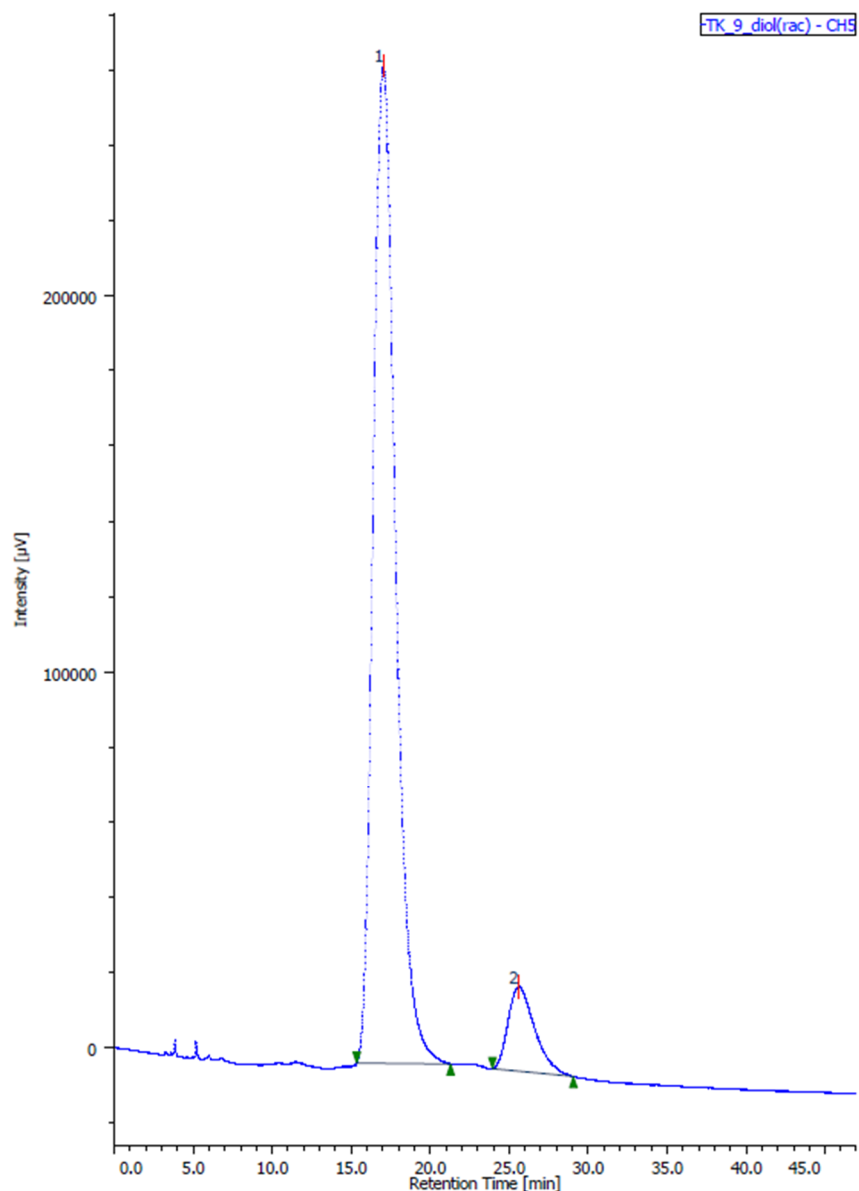
Chromatogram Name TK_7_DIOL_RRS-CH5

Sample Name

Channel Name 250.0nm

Figure S33. Comparison of chromatograms for mixture **22** after reaction with AD-mix α and AD-mix β .

Chromatogram



Channel & Peak Information Table

Chromatogram Name TK_9_diol(rac)-CH5

Sample Name

Channel Name 250.0nm

#	Peak Name	CH	tR [min]	Area [µV·sec]	Height [µV]	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
1	Unknown	5	17.027	26223156	265461	90.859	92.206	N/A	706	3.038	1.297	
2	Unknown	5	25.560	2638097	22440	9.141	7.794	N/A	1109	N/A	1.481	

Figure S34. Chromatogram of mixture **22** after reaction with OsO₄ (column: OD-H Daicel Chiralcel, mobile phase: 20% *i*PrOH + 80% hexane, wavelength: 250nm, flow rate: 1.0 ml/min).

S3.9. Additional notes on the stereoselective Pictet-Spengler reaction.

Although catalytic asymmetric Pictet-Spengler reaction is well demonstrated, many literature studies^{41, S22-S24} do not include examples in which a chiral center is already present in the starting material. On the other hand, there are multiple examples of natural-product or medicinal-chemistry syntheses in which outcomes of Pictet-Spengler depend on the stereodirecting effect of the scaffolds and stereocenters present^{S25-S28}. Although such a stereodirecting effect was observed in our synthesis, we also performed additional experiments using external chirality sources. First, we tried Hiemstra's methodology^{S24}, which uses *N*-sulfenyl tryptamine and a chiral BINOL catalyst. Using the model aldehyde in **Figure S35a**, we adapted the methodology by reversing the equivalent ratio of the reagents – in the original paper, the authors used a fivefold excess of the aldehyde over tryptamine, which would not be a desirable approach in our synthesis in which aldehyde substrate is made in 7 steps. Although this model reaction worked under such adapted conditions, the experiment with the “real” aldehyde **14** did not yield any product and only unreacted starting material and decomposition products were observed (**Figure S35b**).

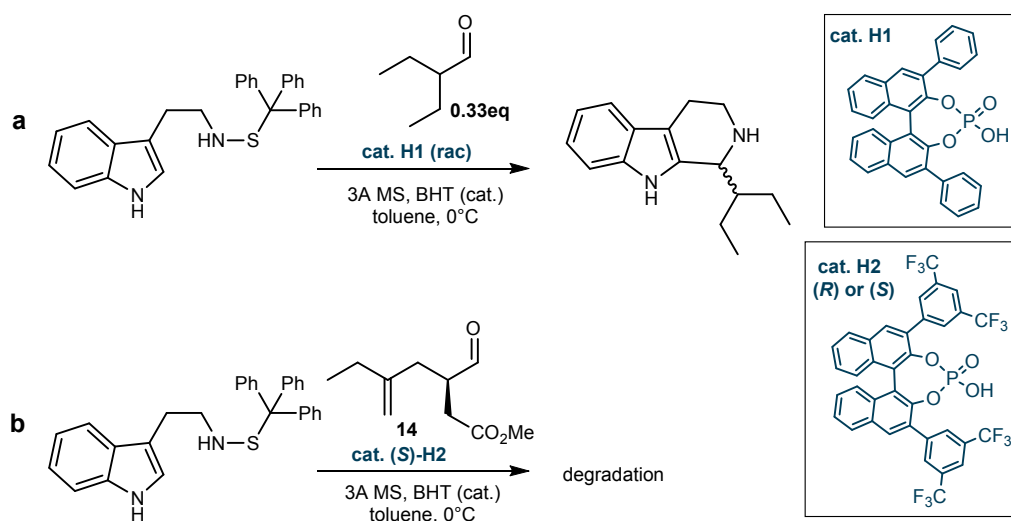


Figure S35. Application of Hiemstra's methodology^{S24} to the Pictet-Spengler reaction in the synthesis of *(R,R,S)*-tacamonidine using a model aldehyde (panel a) and aldehyde **14** (panel b) – see text for details.

We also tested the approach with a chiral auxiliary using the Koomen's procedure⁴¹. In the original procedure, the reaction was carried out at -78 °C, although when we applied these conditions to aldehyde **14** and tryptamine with chiral auxiliary (*p*-tolylsulfenyltryptamine **S1**, the same as in the original paper), no reaction was observed – we only retrieved aldehyde **14**. When temperature was increased to -60 °C and reaction

was allowed to proceed for 3 days, we obtained a mixture of diastereoisomers **SI-8** (**Figure S36**) in ~ 20% yield (low yield might be explained by the degradation of *p*-tolylsulfanyltryptamine, which was also reported in Koomen's original paper upon temperature increase). The LC-MS analysis revealed, that one of the diastereoisomers was obtained in only slight excess (ratio of diastereoisomers was ~ 59 : 41 with the excess of undesired (*R,S*)-**SI-8** diastereoisomer). Interestingly, when auxiliaries of both chiralities were tested, (*R,S*)-**SI-8** diastereoisomer was obtained in excess in both cases (when the opposite chiral auxiliary was used, the ratio of diastereoisomers was ~ 73 : 27). These observations point to and emphasize the stereodirecting effect of the scaffold– i.e., the stereocenter present at the alpha position of the aldehyde **14** has a greater influence on the emerging stereocenter than the stereocenter present in the chiral auxiliary.

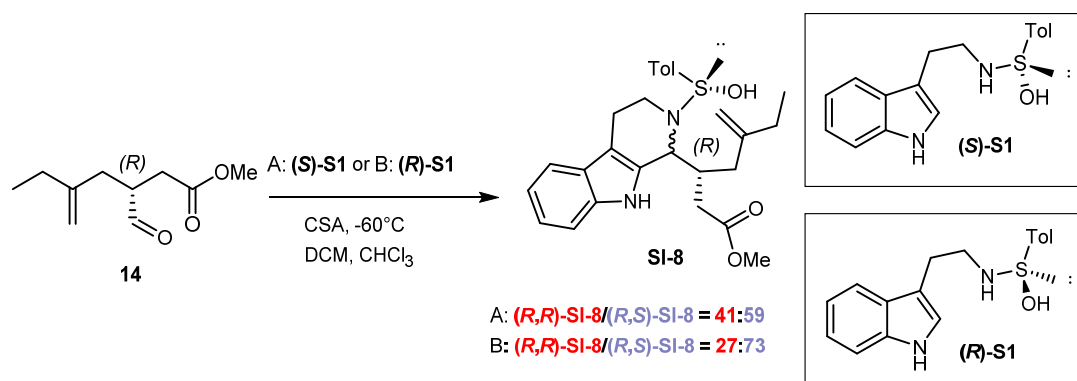


Figure S36. Application of Koomen's methodology^{S4} to the Pictet-Spengler reaction in the synthesis of (*R,R,S*)-tacamonidine. Tryptamine with both (*S*)- and (*R*)- *p*-tolylsulfanyltryptamine auxiliary was used – see text for details.

We note that the above results prompted us not to use Jacobsen's methodology (given that a covalently-bound chiral auxiliary was not able to “overcome” stereodirecting effect of the scaffold, we assumed that a coordinating catalyst would be even less likely to do so).

S3.10. Raw spectroscopic data.

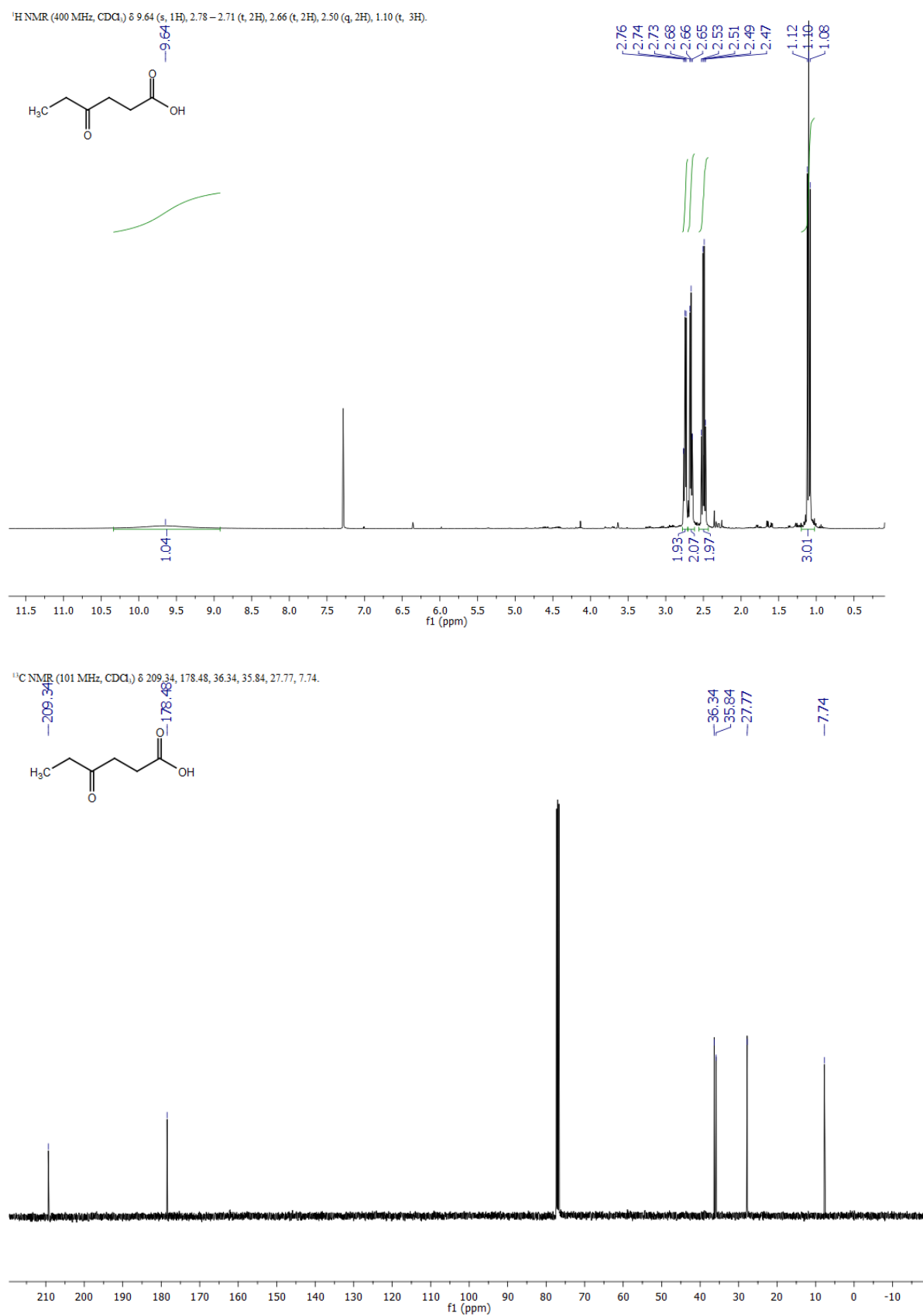


Figure S37. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound **12** (CDCl₃).

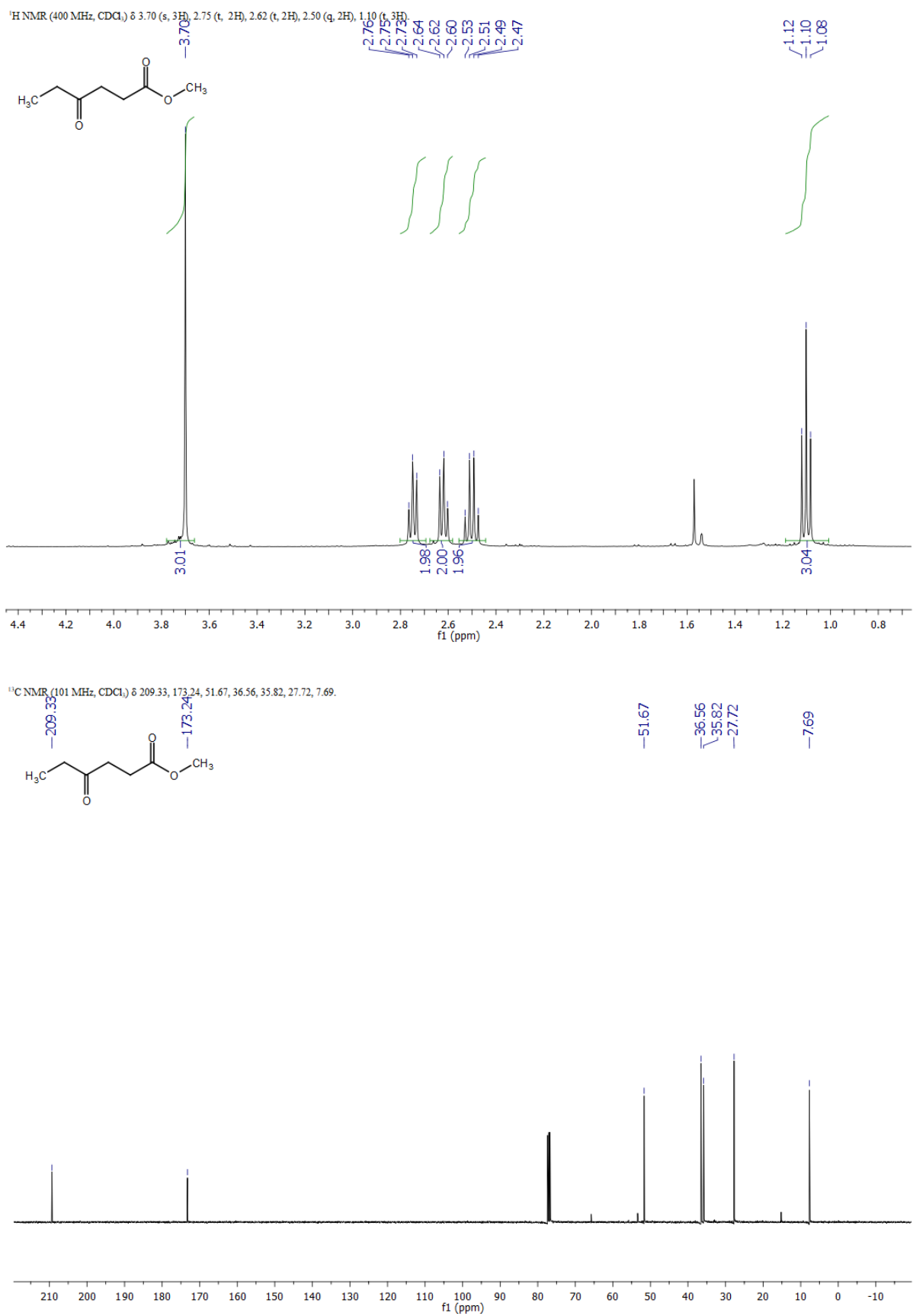


Figure S38. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound SI-2 (CDCl₃).

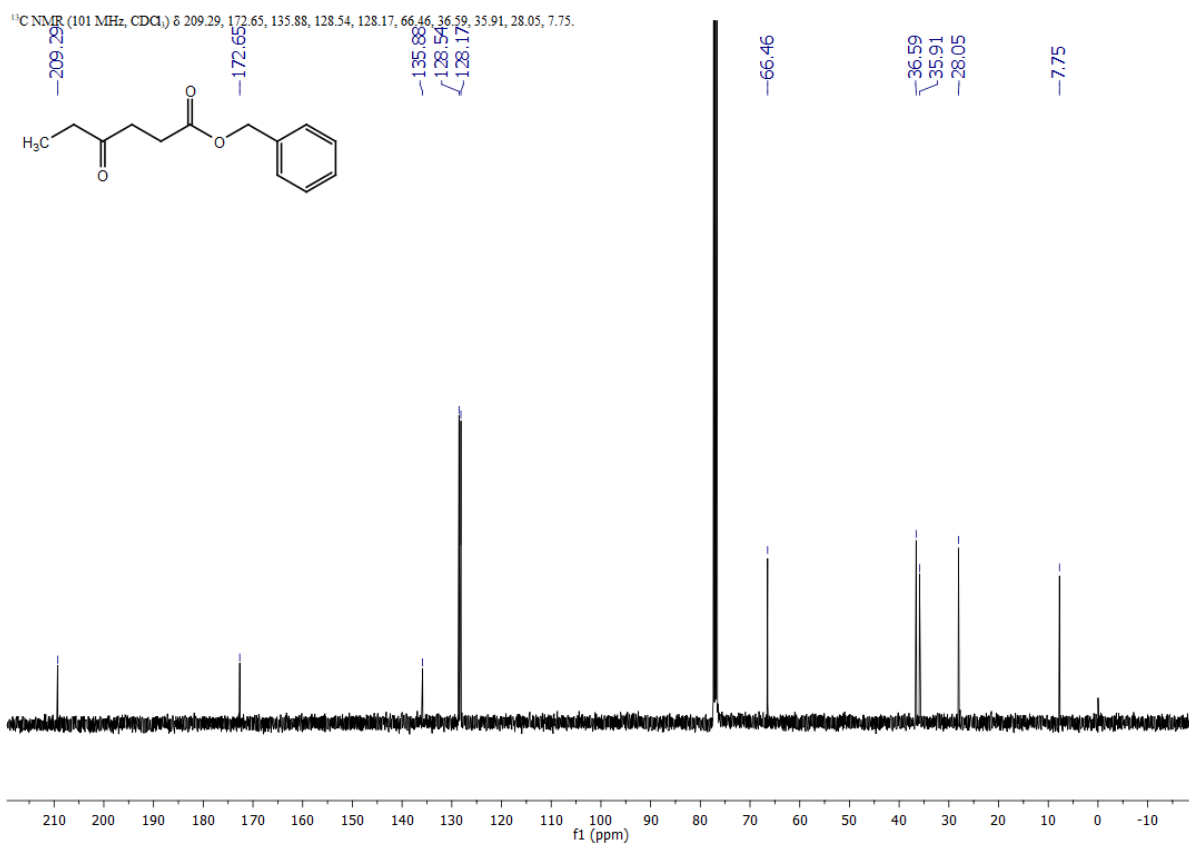
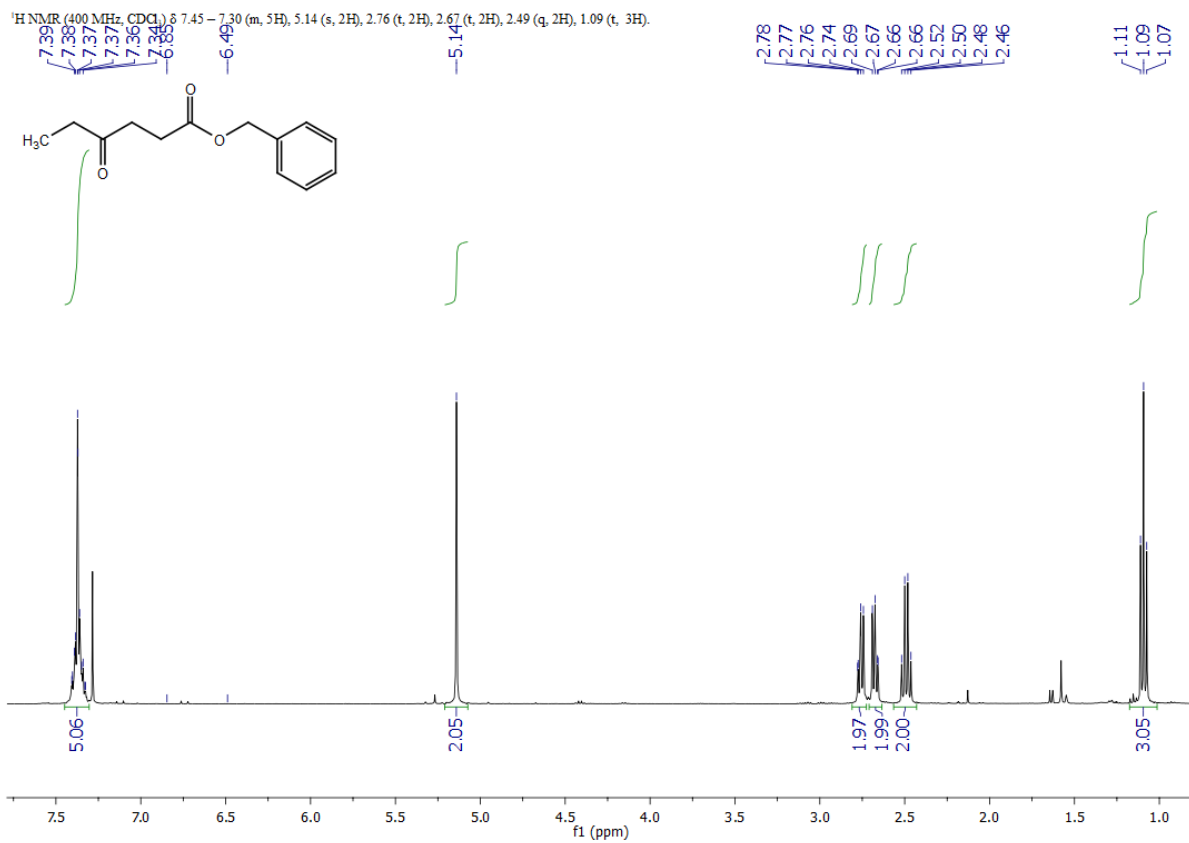


Figure S39. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound SI-6 (CDCl₃).

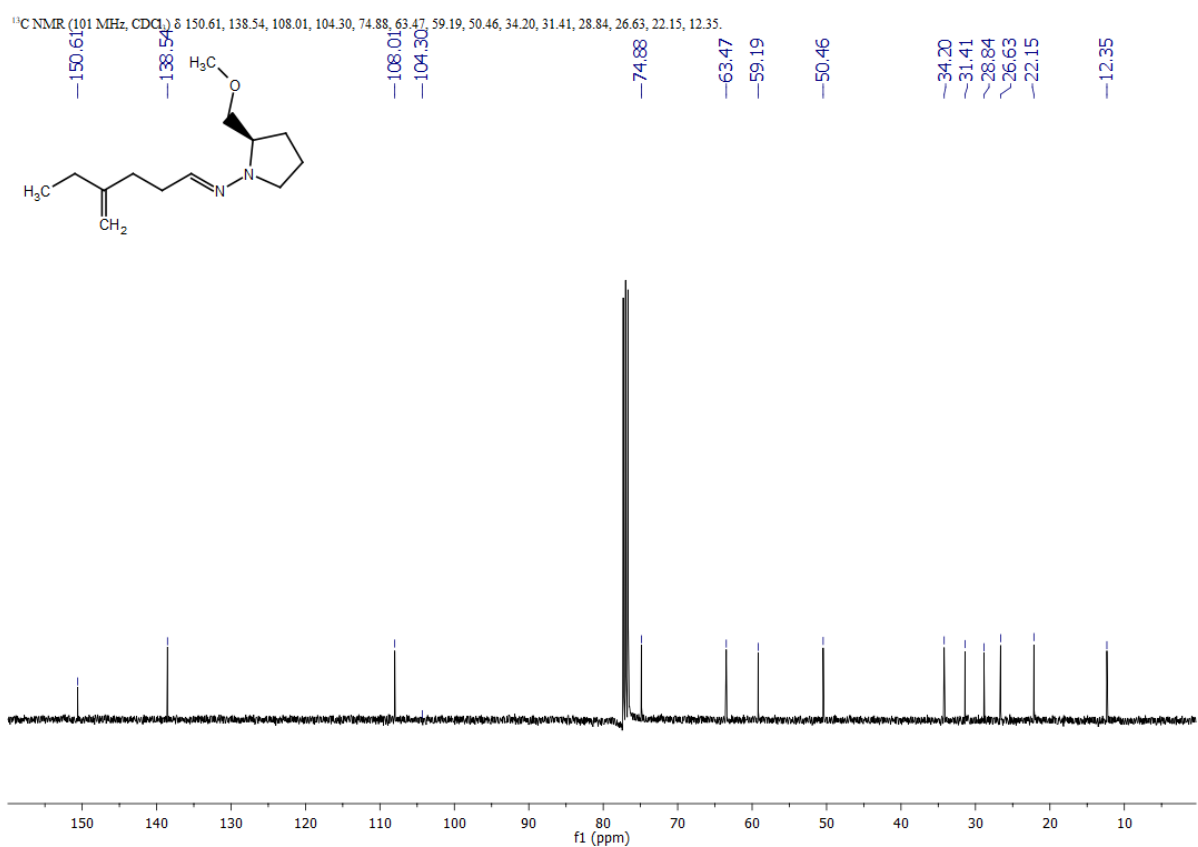
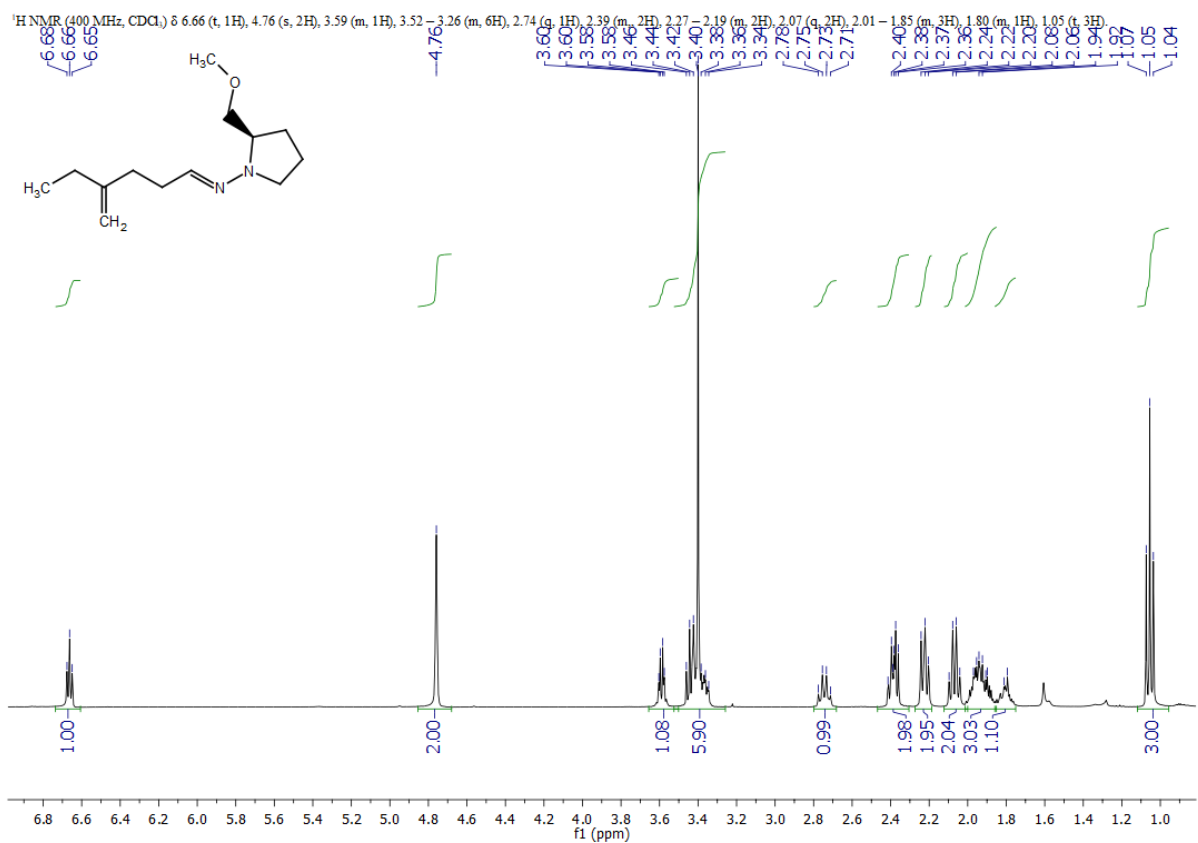


Figure S40. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound **15** (CDCl₃).

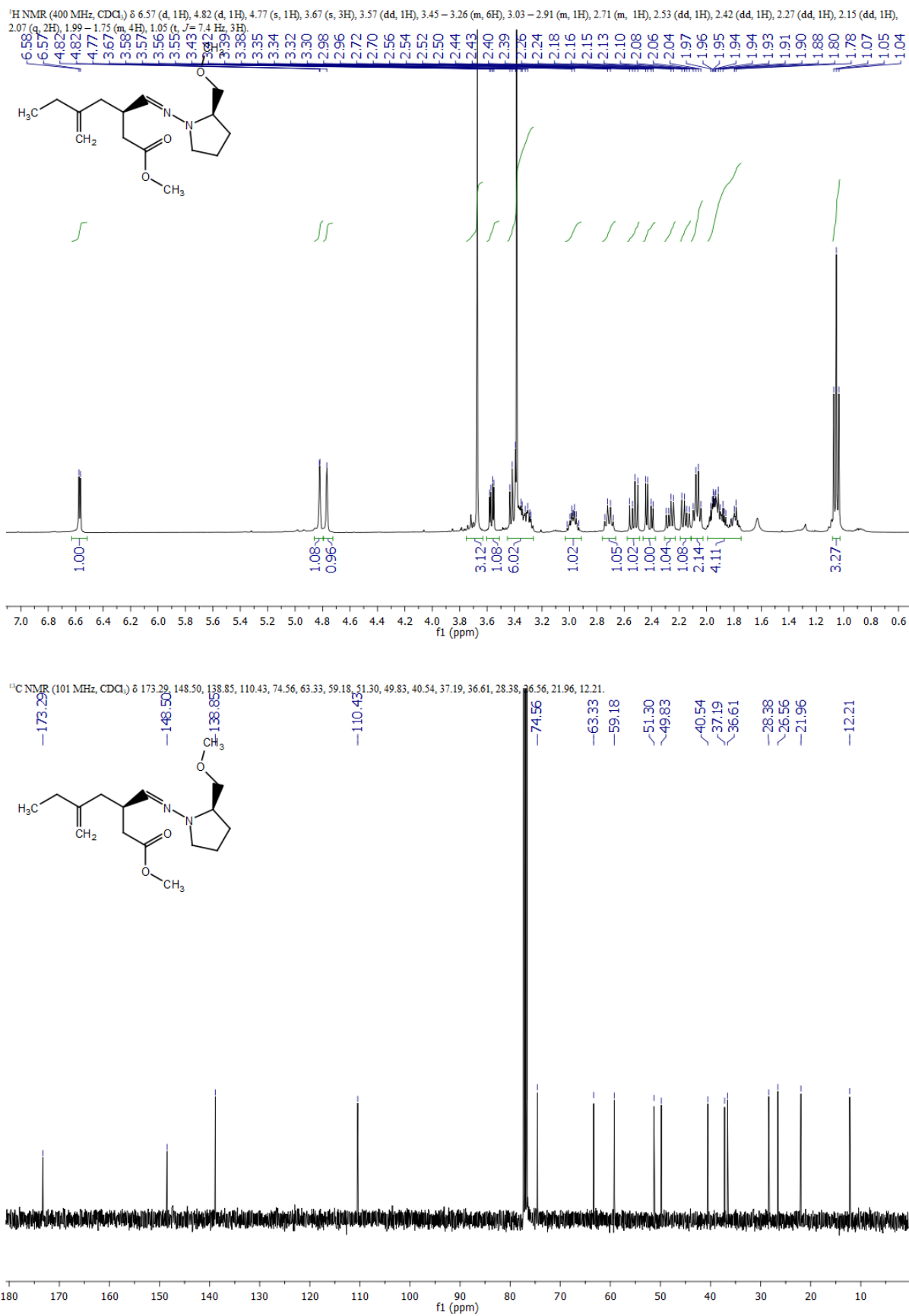
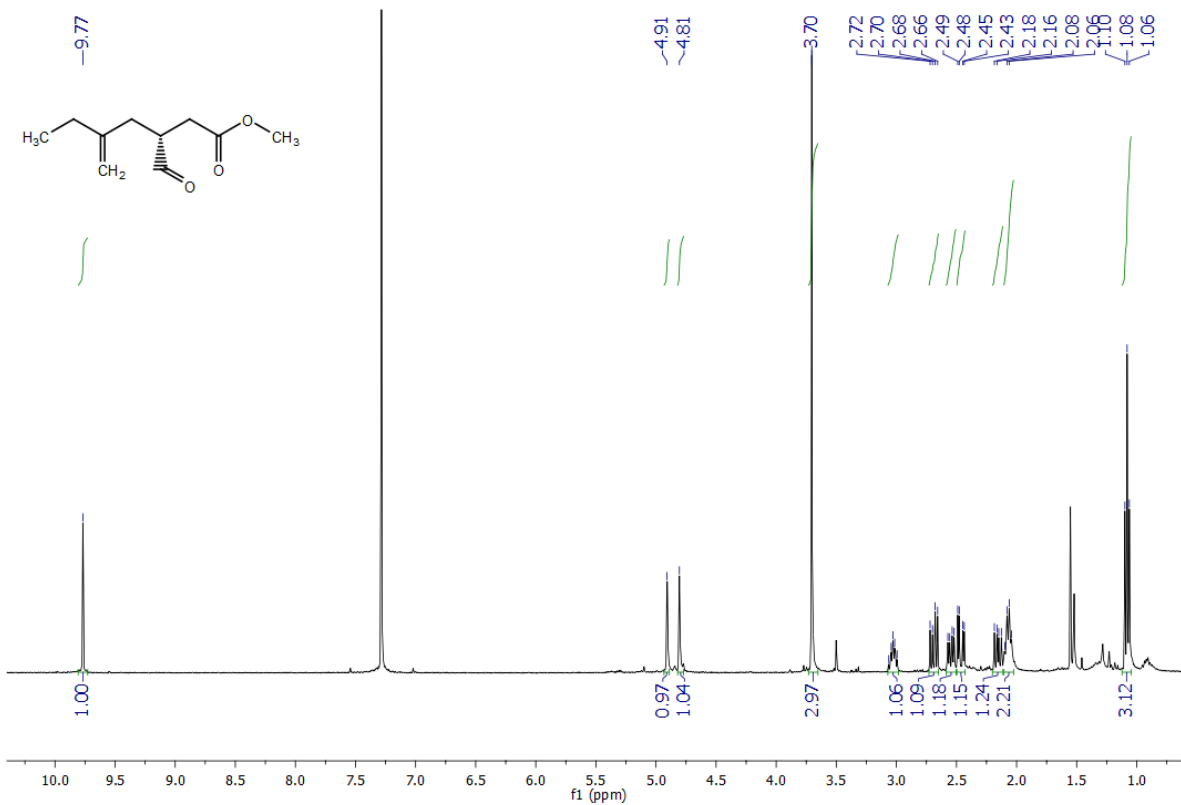


Figure S41. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound 17 (CDCl₃).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.77 (s, 1H), 4.91 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.07–2.98 (m, 1H), 2.69 (dd, 1H), 2.55 (dd, 1H), 2.46 (dd Hz, 1H), 2.16 (dd, 1H), 2.07 (bq, 2H), 1.08 (t, 3H).



¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 202.55, 172.30, 146.82, 111.35, 51.75, 45.60, 35.31, 32.58, 28.23, 12.08.

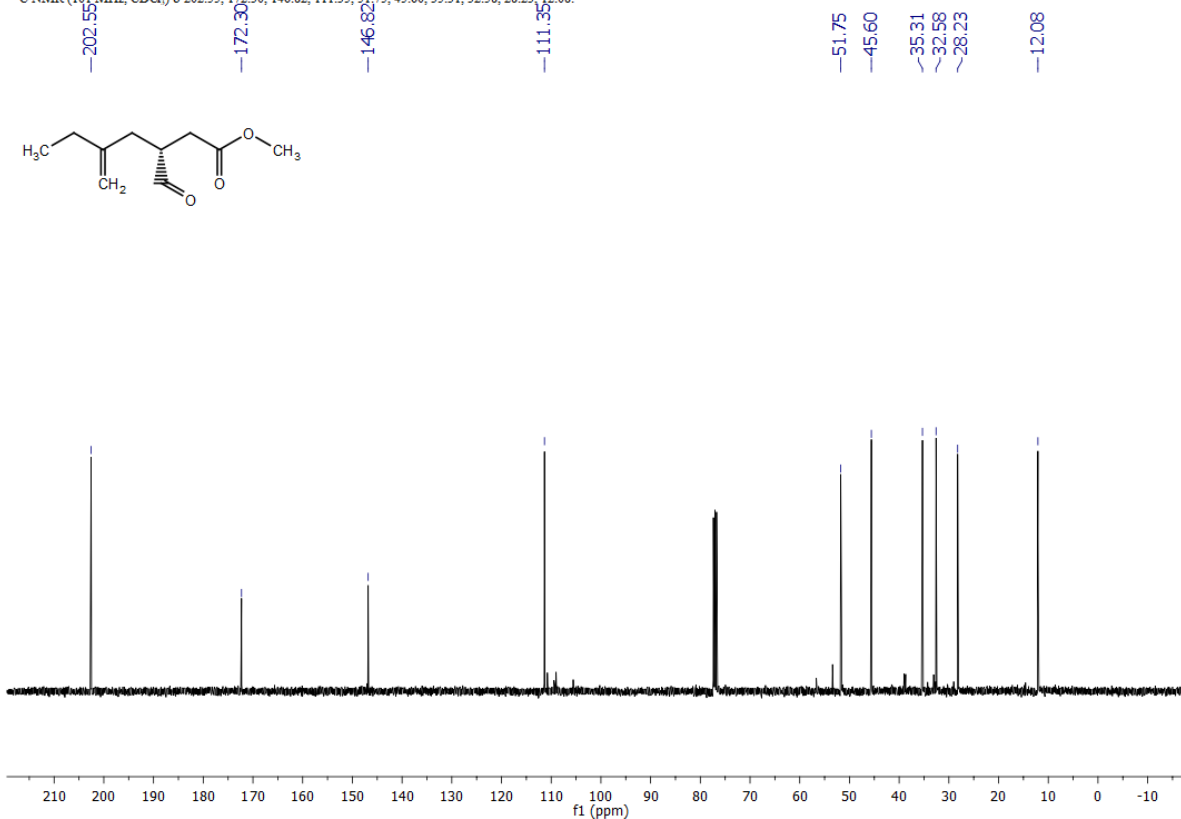


Figure S42. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound **18** (CDCl₃).

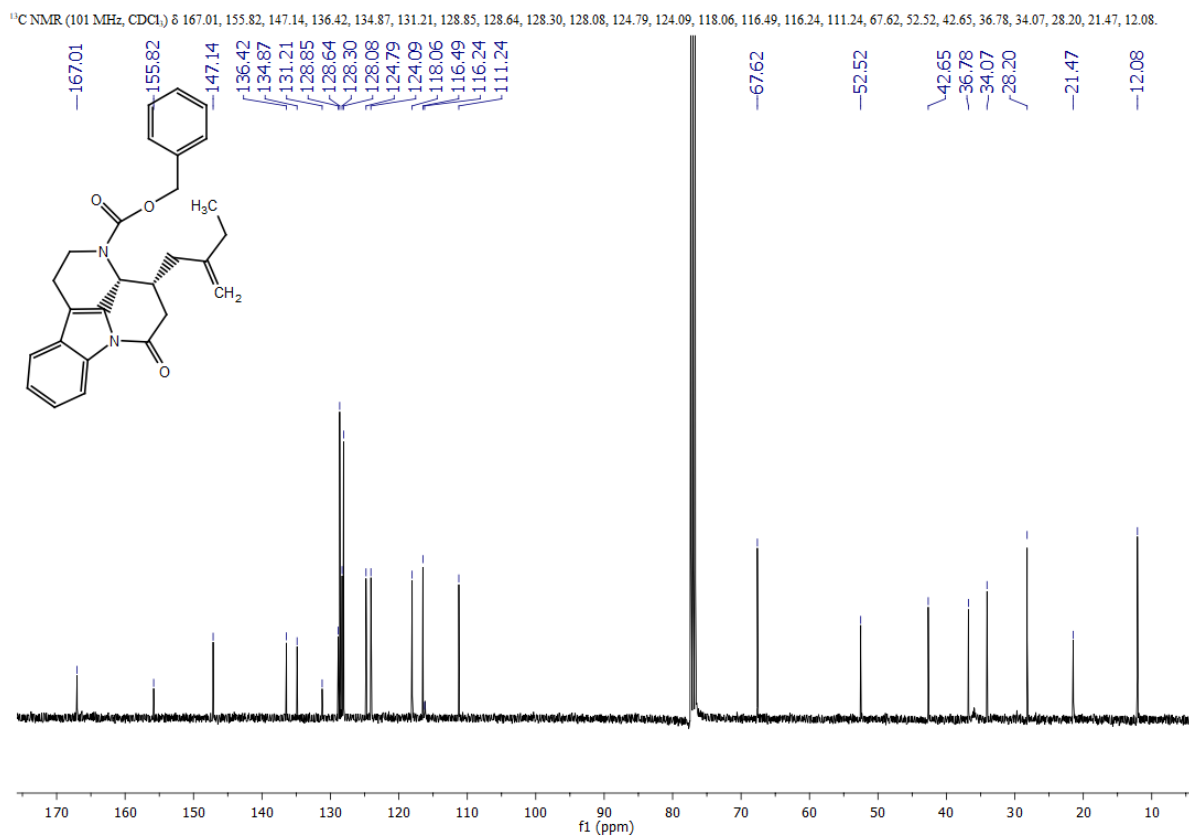
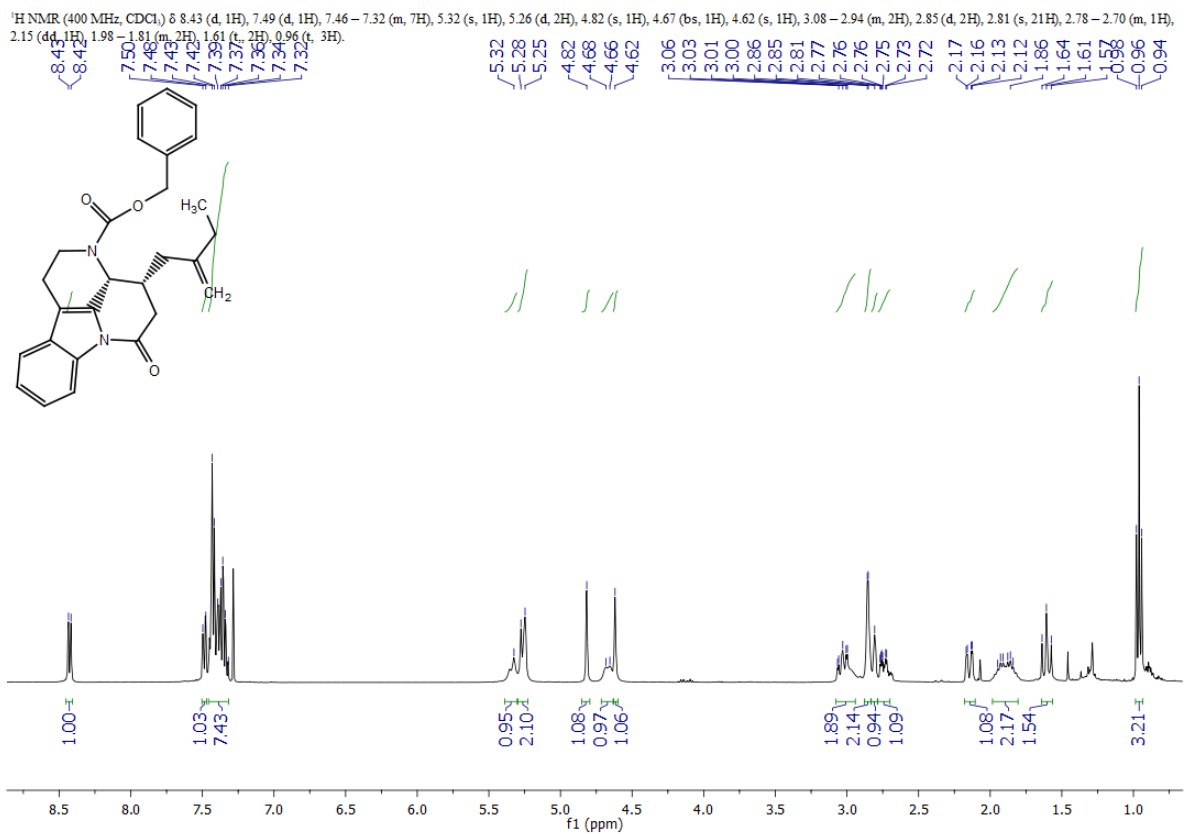


Figure S43. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound **(R,R)-21** (CDCl₃).

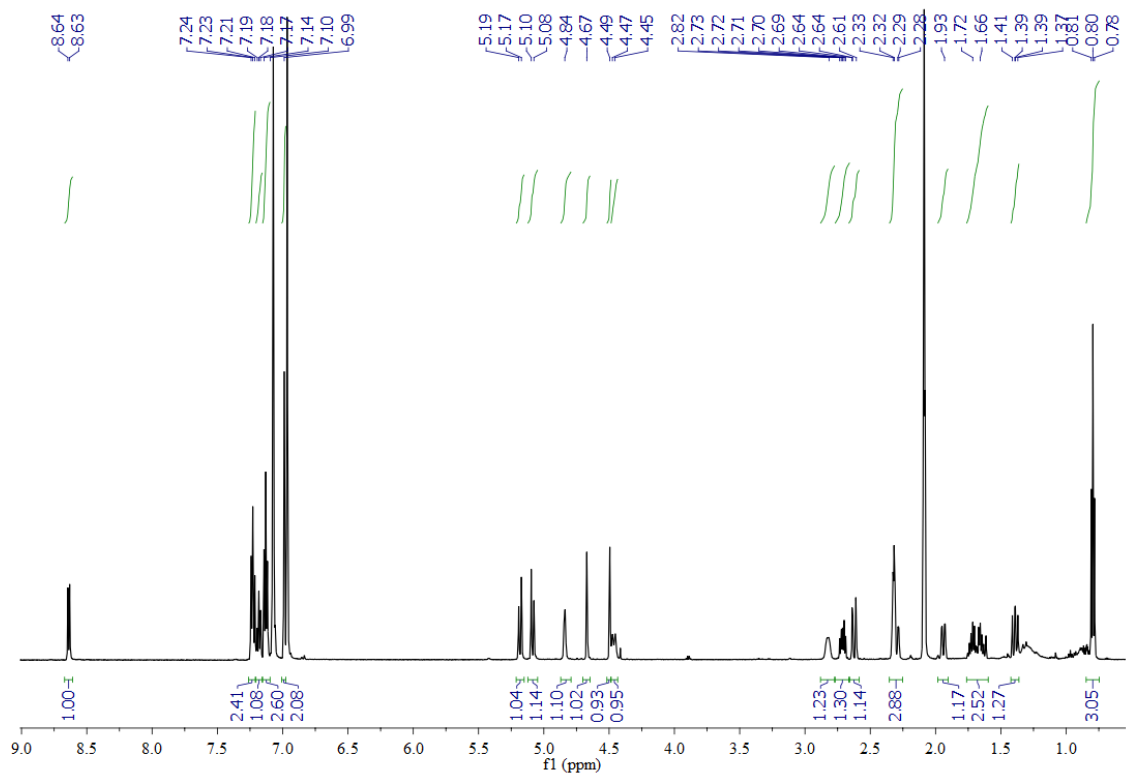


Figure S44. ¹H NMR spectrum of compound (R,R)-21 (*d*-toluene, 70 °C).

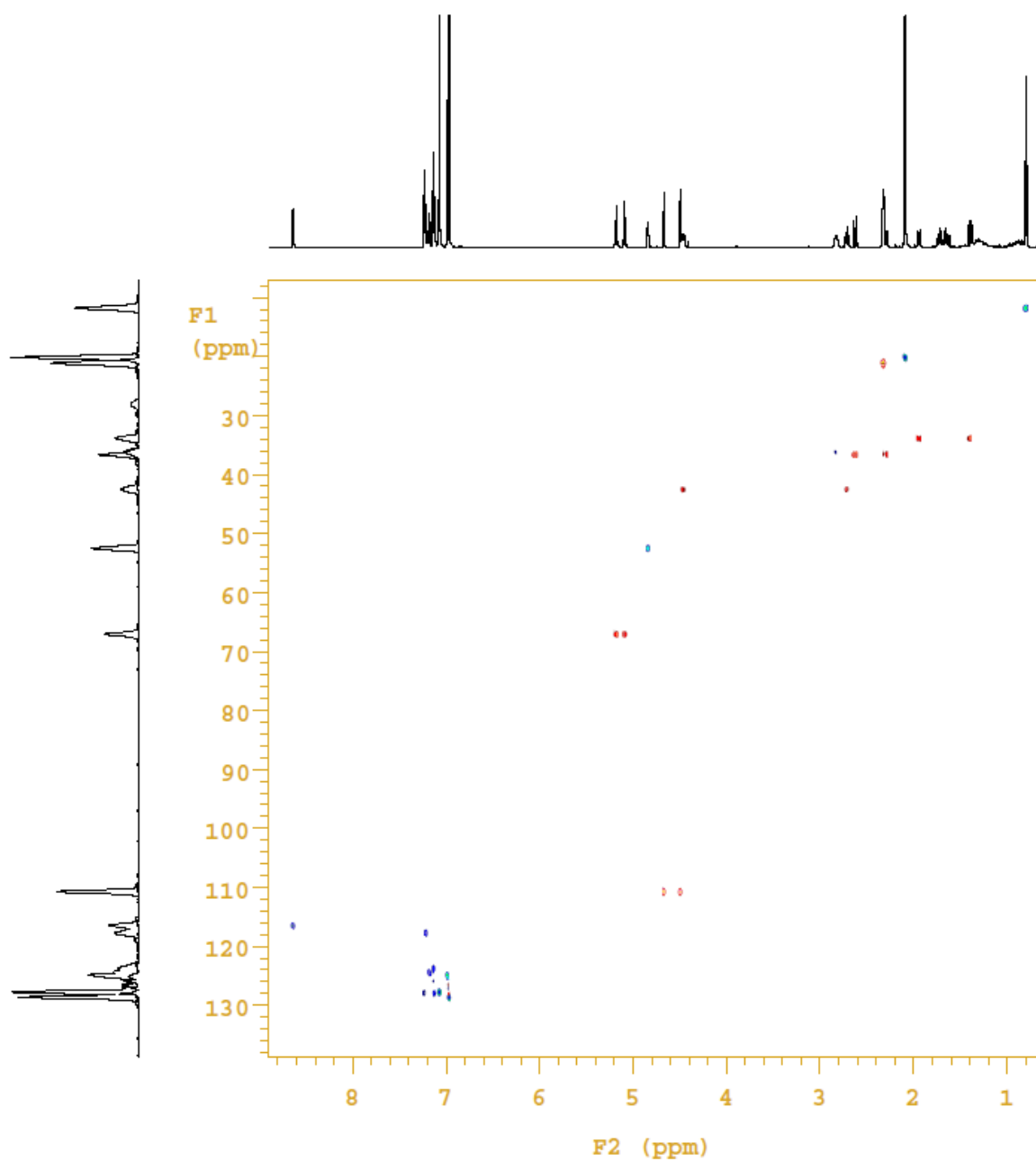


Figure S46. HSQCAD of (*R,R*)-21 (*d*-toluene, 70 °C, ¹³C internal projection).

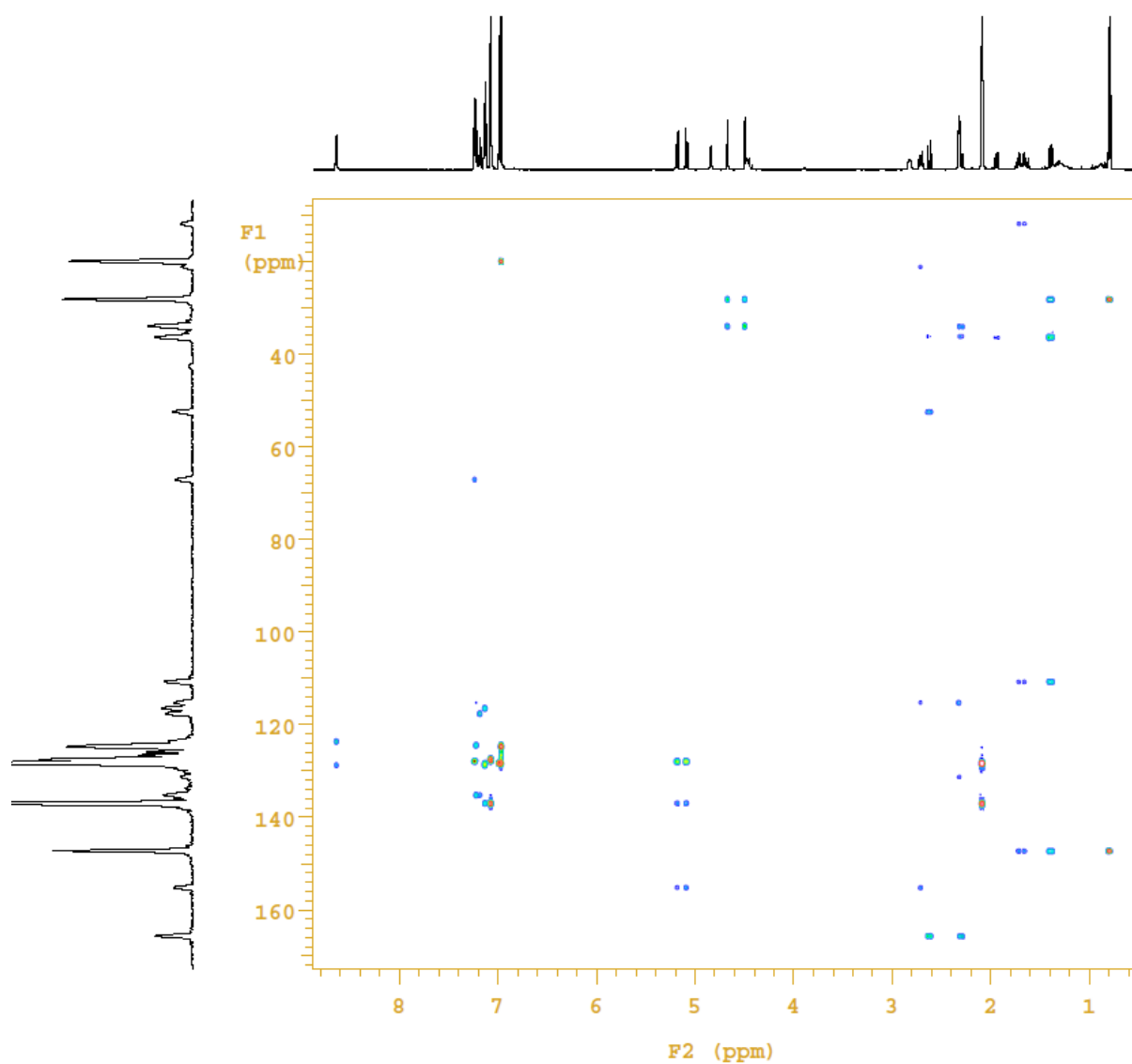


Figure S47. HMBCAD of *(R,R)*-21 (*d*-toluene, 70 °C, ^{13}C internal projection).

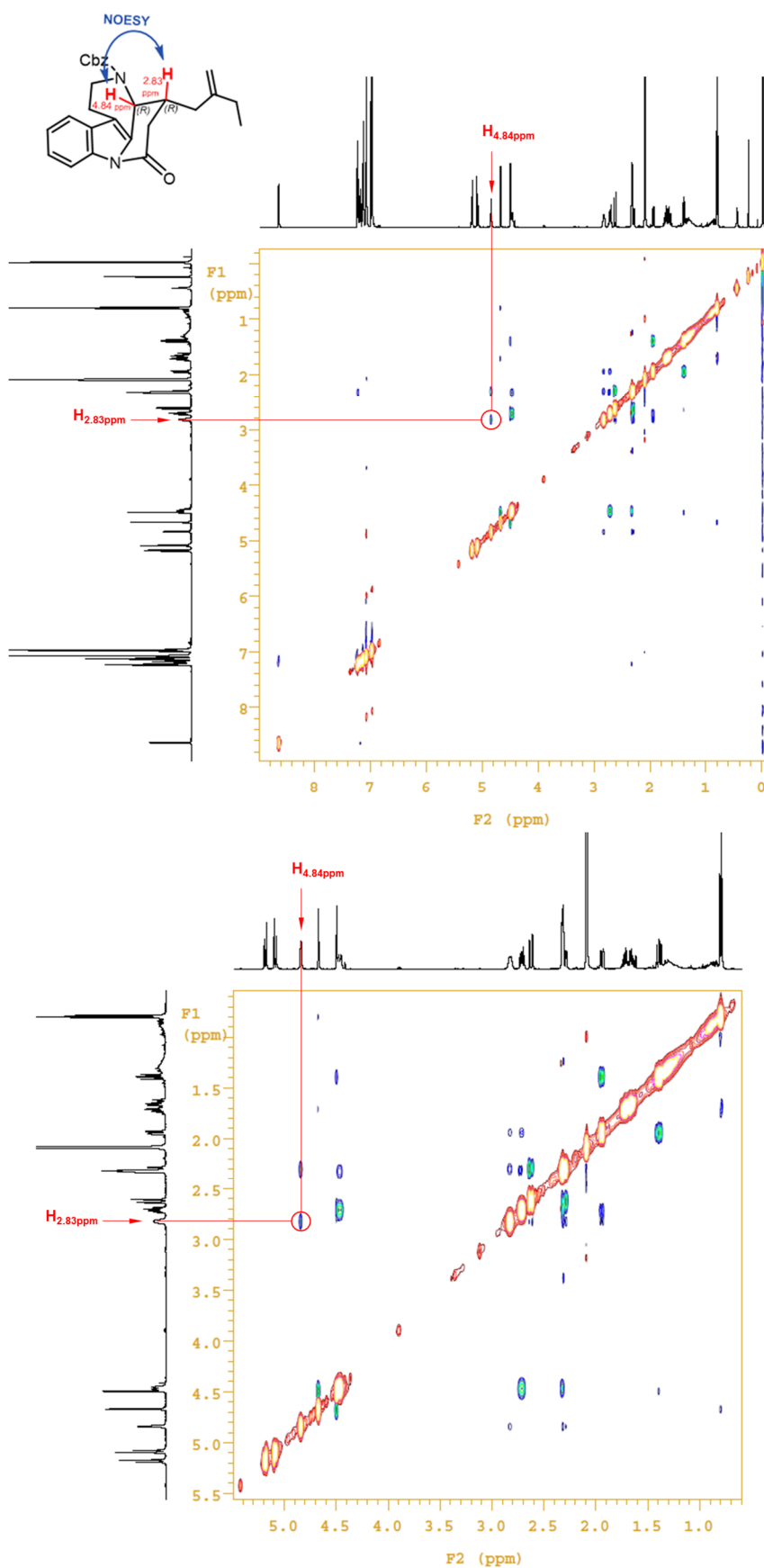


Figure S48. 2D NOESY spectrum of compound **(R,R)-21** (*d*-toluene, 70 °C).

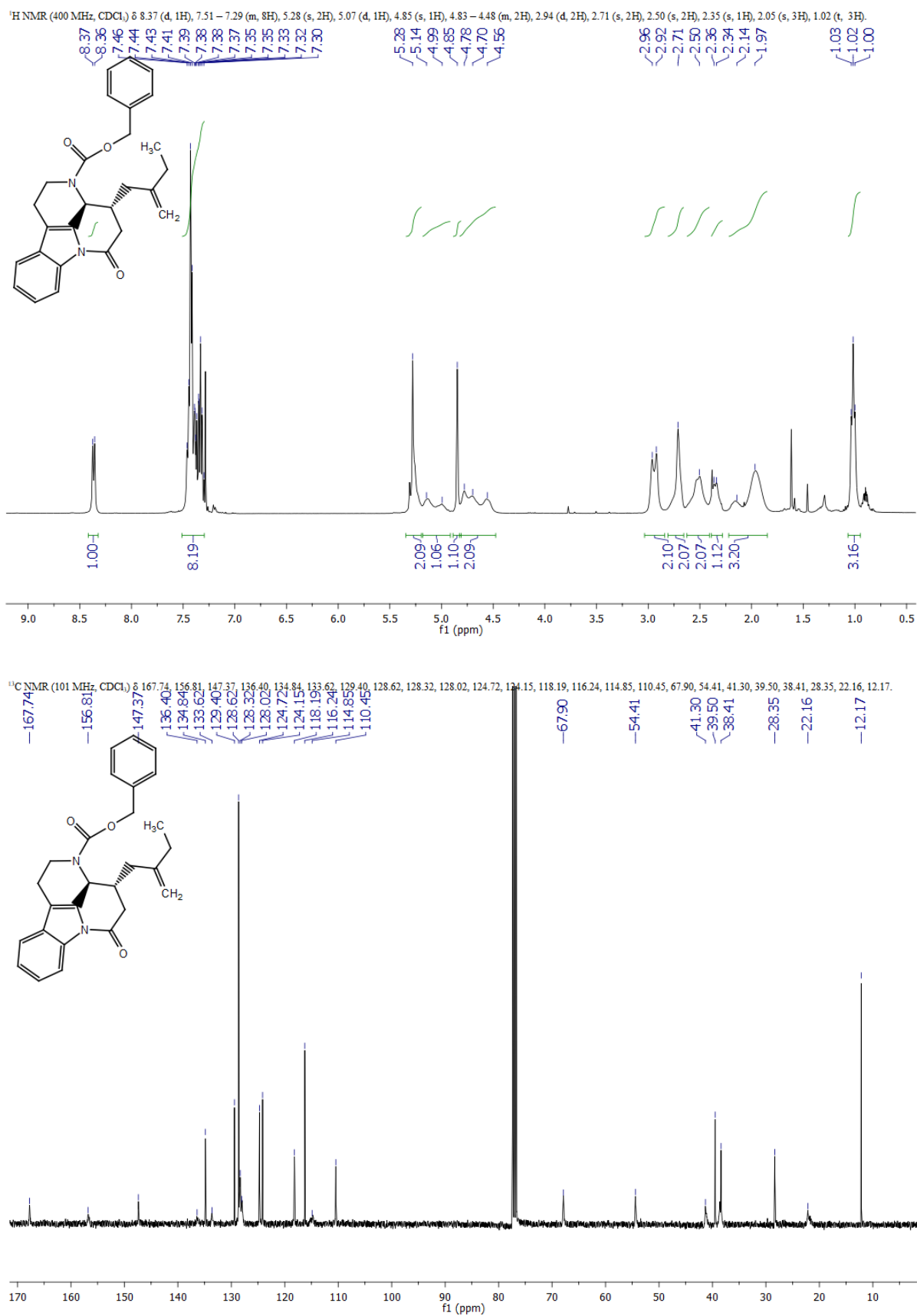
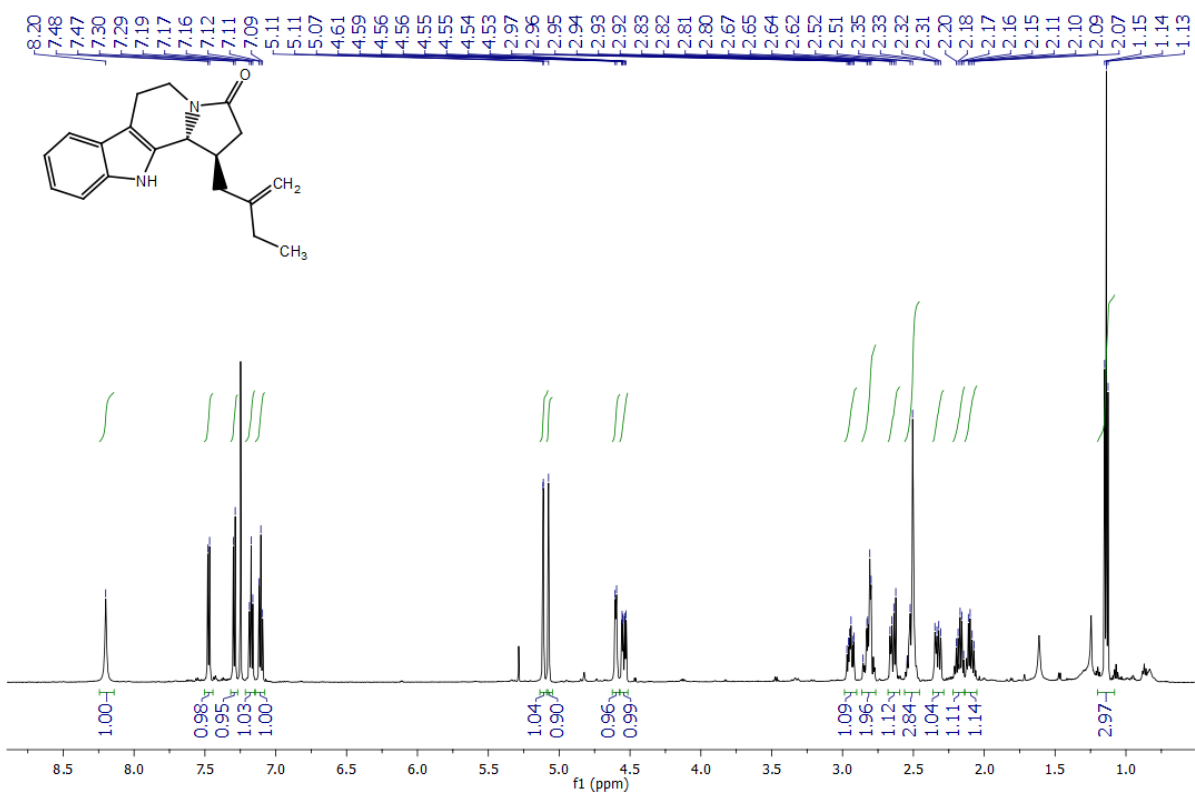


Figure S49. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound (*R,S*)-**21** (CDCl₃).

¹H NMR (600 MHz, cdcl₃) δ 8.20 (s, 1H), 7.47 (d, 1H), 7.29 (d, 1H), 7.17 (t, 1H), 7.11 (t, 1H), 5.11 (d, 1H), 5.07 (s, 1H), 4.60 (d, 1H), 4.57–4.51 (m, 1H), 2.99–2.90 (m, 1H), 2.86–2.77 (m, 2H), 2.64 (dd, 1H), 2.56–2.46 (m, 3H), 2.33 (dd, 1H), 2.17 (dt, 1H), 2.09 (dd, 1H), 1.14 (t, 3H).



¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.13, 150.61, 135.99, 132.32, 126.74, 122.26, 119.84, 118.44, 111.48, 110.92, 108.78, 60.50, 42.44, 38.76, 38.72, 37.62, 28.22, 21.17, 12.01.

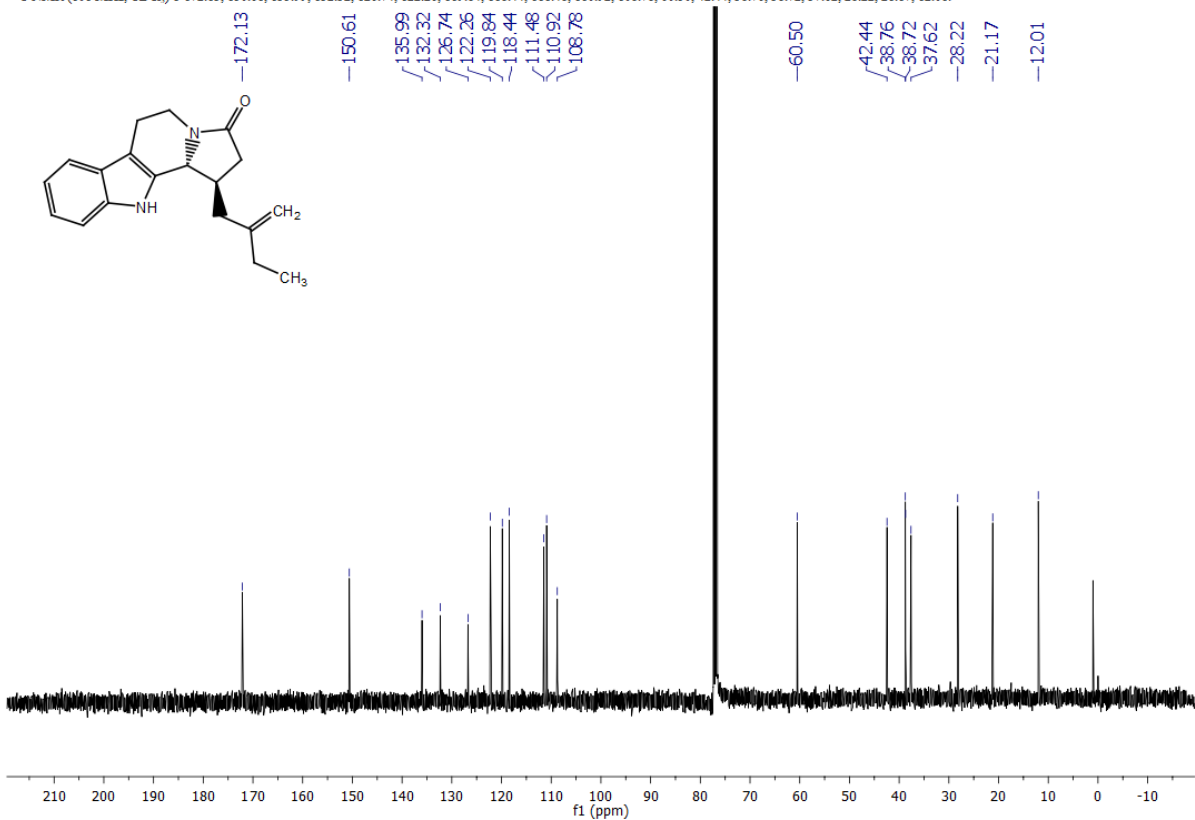


Figure S50. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound (R,R)-SI-5 (CDCl₃).

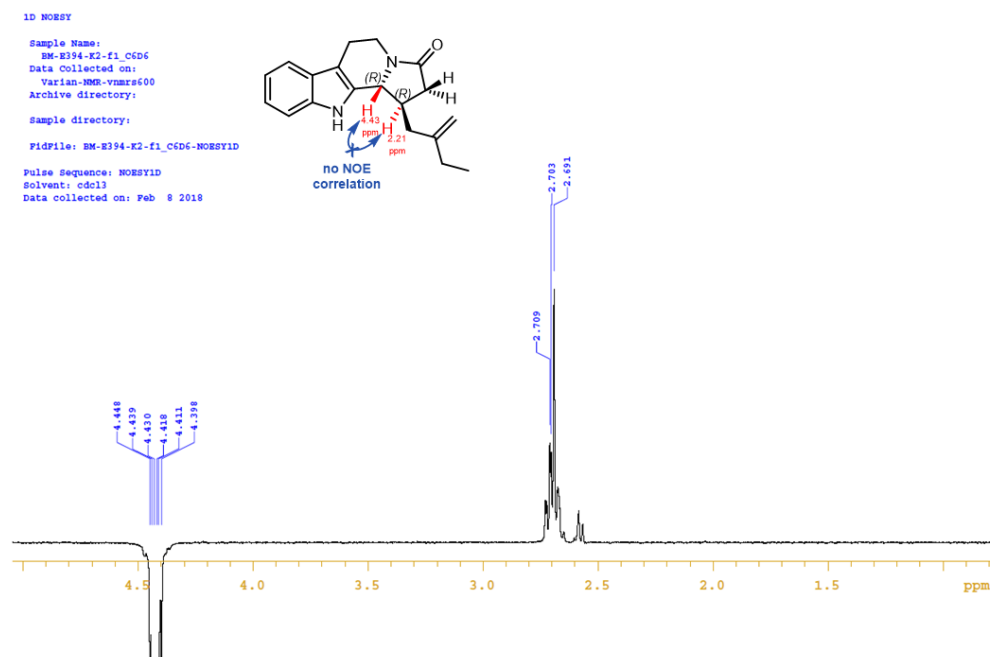
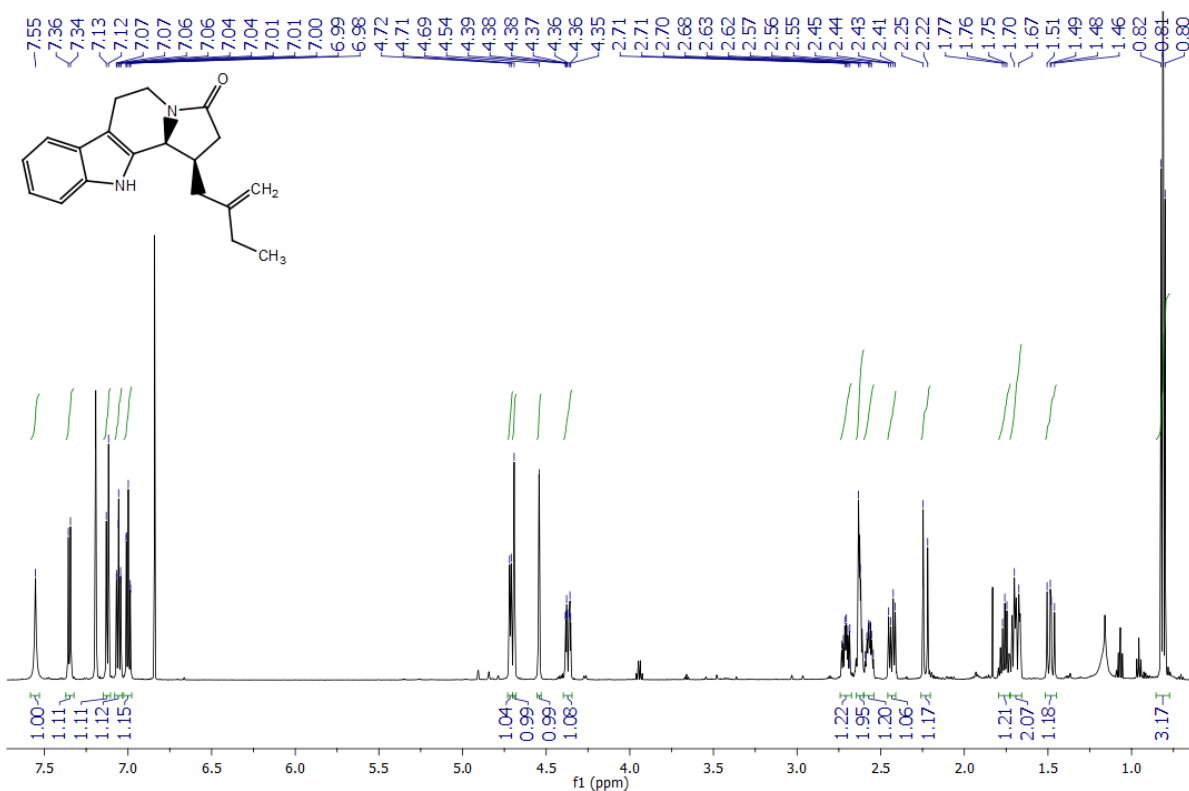


Figure S51. NOE spectrum of compound (*R,R*)-SI-5 (CDCl₃). There is no NOE correlation between the protons marked red.

¹H NMR (600 MHz, cdcl₃) δ 7.55 (s, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.12 (d, 1H), 7.08 – 7.04 (m, 1H), 7.03 – 6.98 (m, 1H), 4.71 (d, 1H), 4.69 (s, 1H), 4.54 (s, 1H), 4.40 – 4.35 (m, 1H), 2.74 – 2.67 (m, 1H), 2.63 (d, 2H), 2.57 (dt, 1H), 2.43 (dd, 1H), 2.23 (d, 1H), 1.80 – 1.73 (m, 1H), 1.69 (d, 2H), 1.48 (dd, 1H), 0.81 (t, 3H).



¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.89, 148.16, 136.48, 129.89, 126.86, 122.33, 119.90, 118.39, 110.96, 110.86, 110.35, 57.92, 37.70, 37.24, 35.58, 34.31, 28.83, 21.13, 12.22.

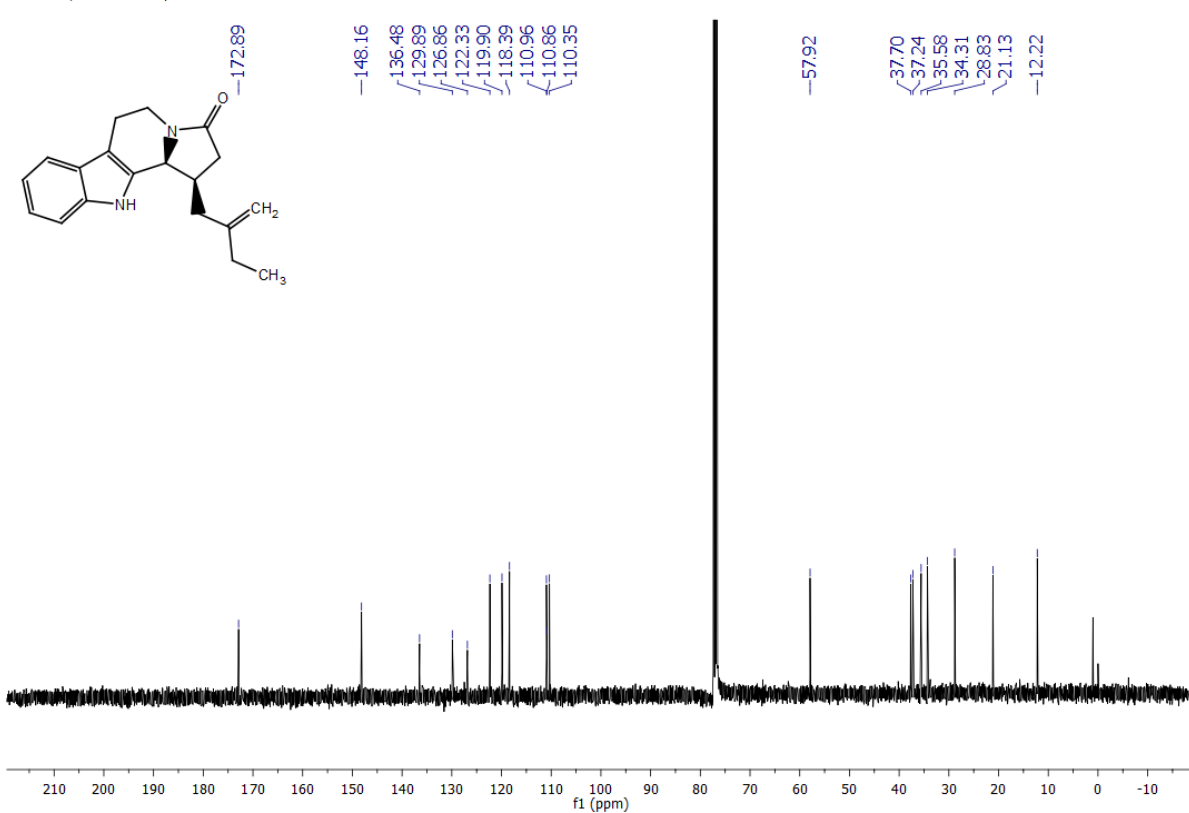


Figure S52. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound (R,S)-SI-5 (CDCl₃).

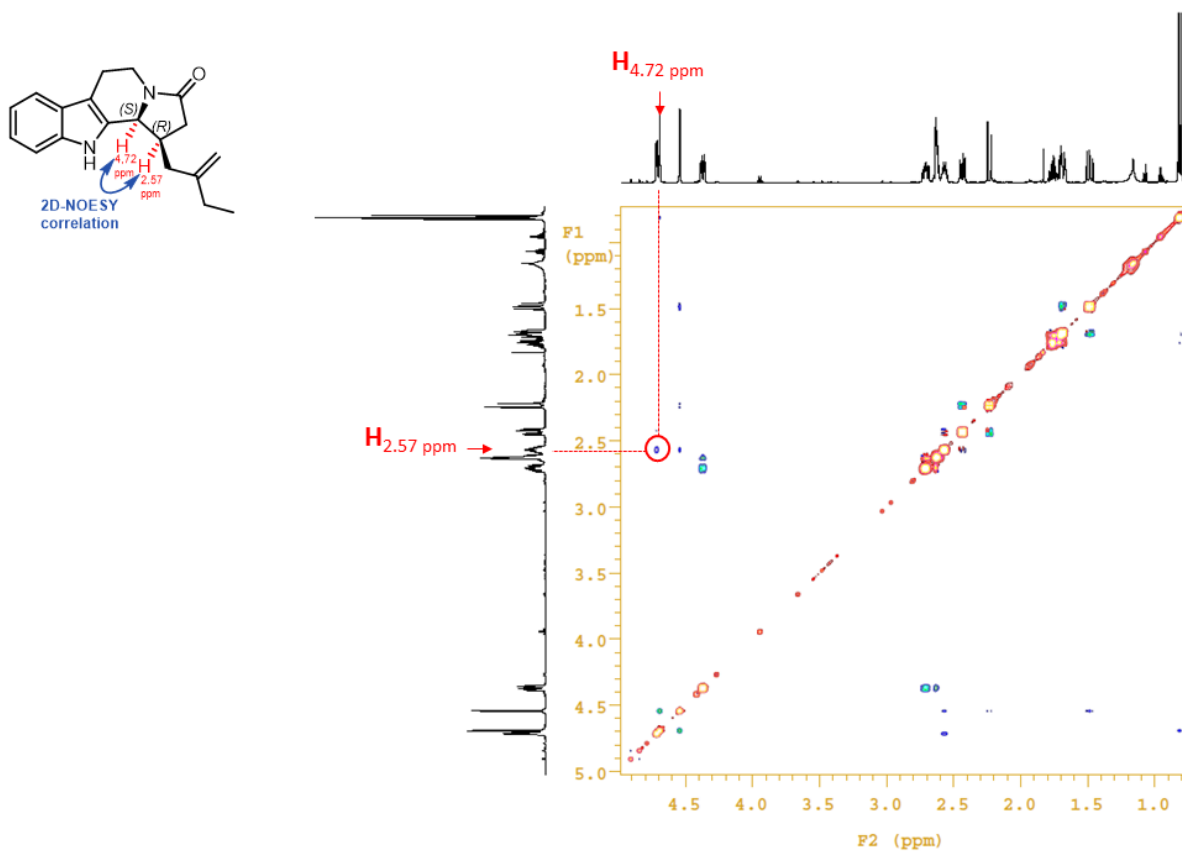
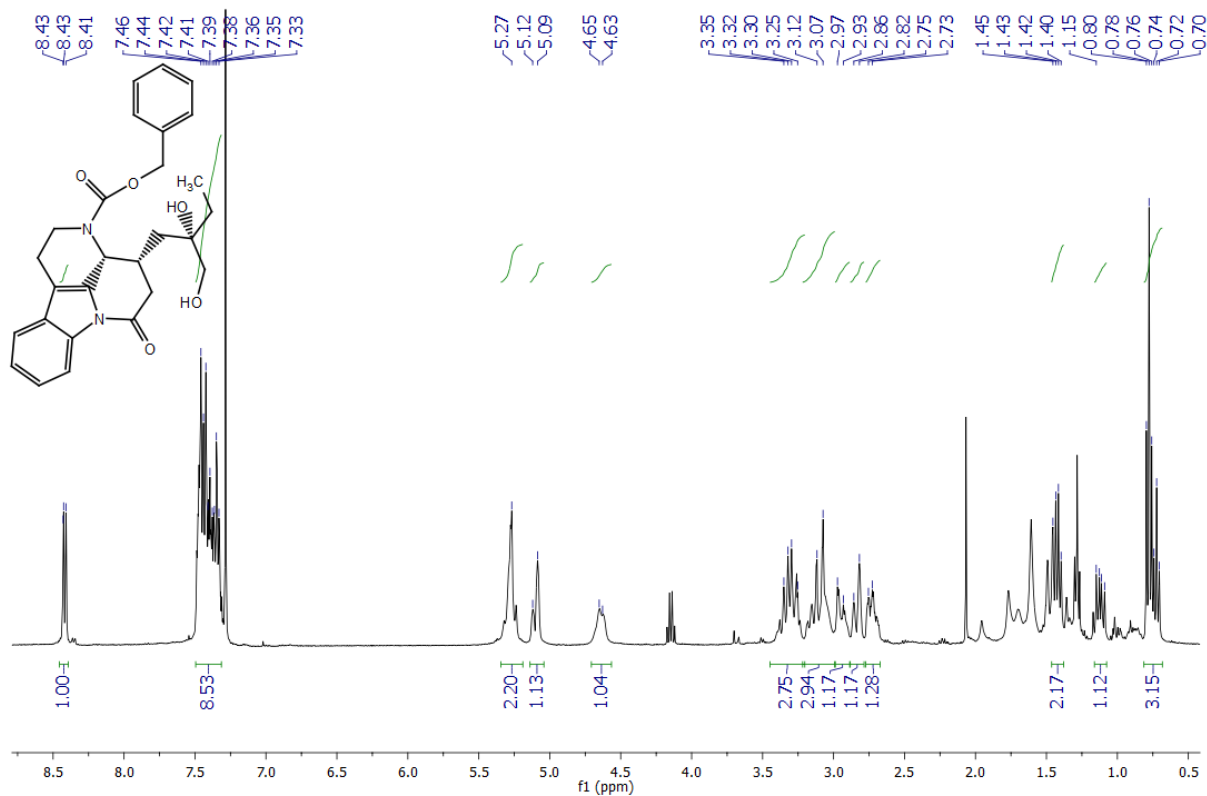


Figure S53. 2D-NOESY spectrum of compound (*R,S*)-SI-5 (CDCl₃).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.45–8.39 (m, 1H), 7.50–7.31 (m, 8H), 5.27 (s, 2H), 5.10 (d, 1H), 4.64 (d, 1H), 3.31 (dd, 3H), 3.10 (d, 3H), 2.95 (d, 1H), 2.84 (d, 1H), 2.74 (d, 1H), 1.43 (dd, 2H), 1.12 (dd, 1H), 0.75 (dt, 3H).



^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 167.56, 156.03, 136.42, 134.86, 131.23, 128.77, 128.64, 128.41, 128.36, 128.32, 124.84, 124.08, 118.09, 116.50, 74.34, 67.66, 66.58, 53.12, 42.81, 39.76, 32.70, 30.07, 28.25, 21.29, 7.61.

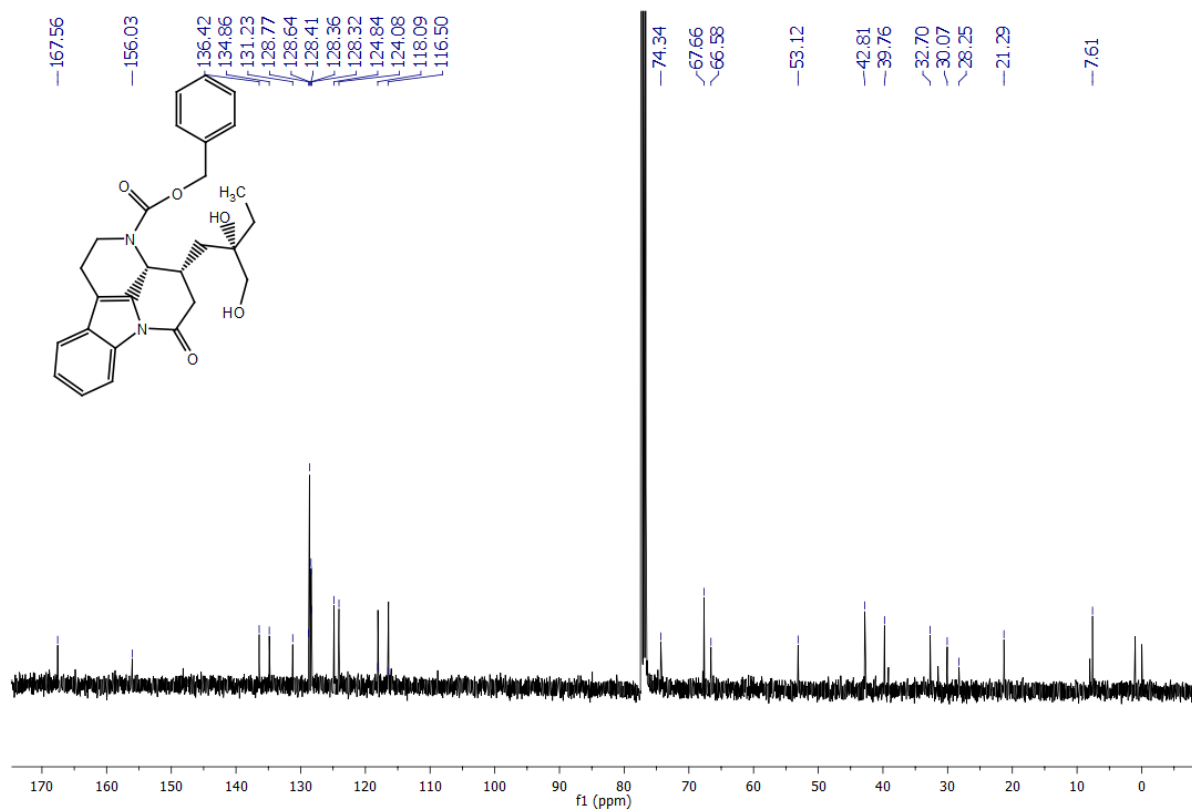
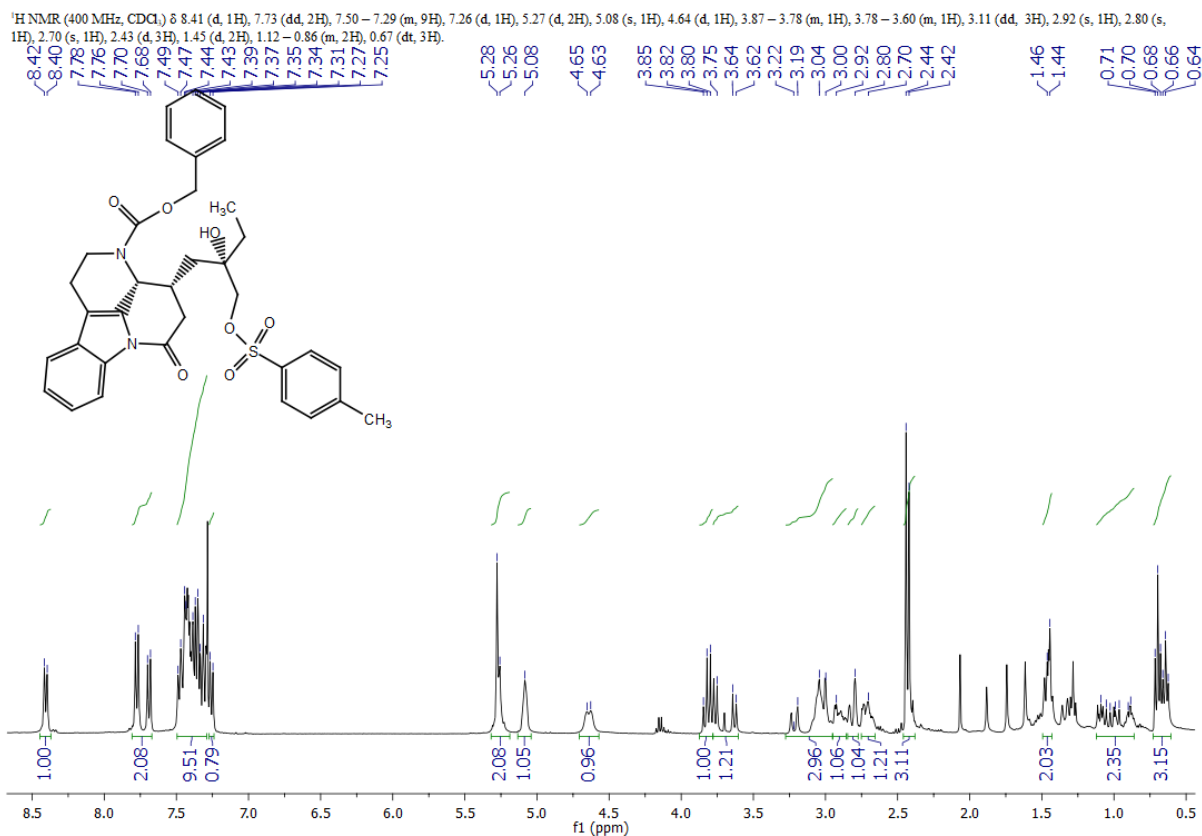


Figure S54. ^1H NMR (top) and ^{13}C NMR (bottom) spectra of compounds **22** (CDCl_3).



¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.25, 167.17, 155.95, 155.85, 145.10, 136.37, 136.20, 134.83, 132.44, 132.23, 130.97, 129.93, 128.79, 128.64, 128.63, 128.39, 128.31, 128.29, 128.24, 127.98, 127.90, 124.87, 124.12, 124.09, 118.11, 118.07, 116.46, 116.42, 73.89, 73.70, 73.11, 72.62, 67.87, 67.75, 52.95, 52.85, 42.78, 42.71, 39.60, 38.89, 32.91, 31.34, 30.33, 27.93, 21.64, 21.32, 7.83, 7.40.

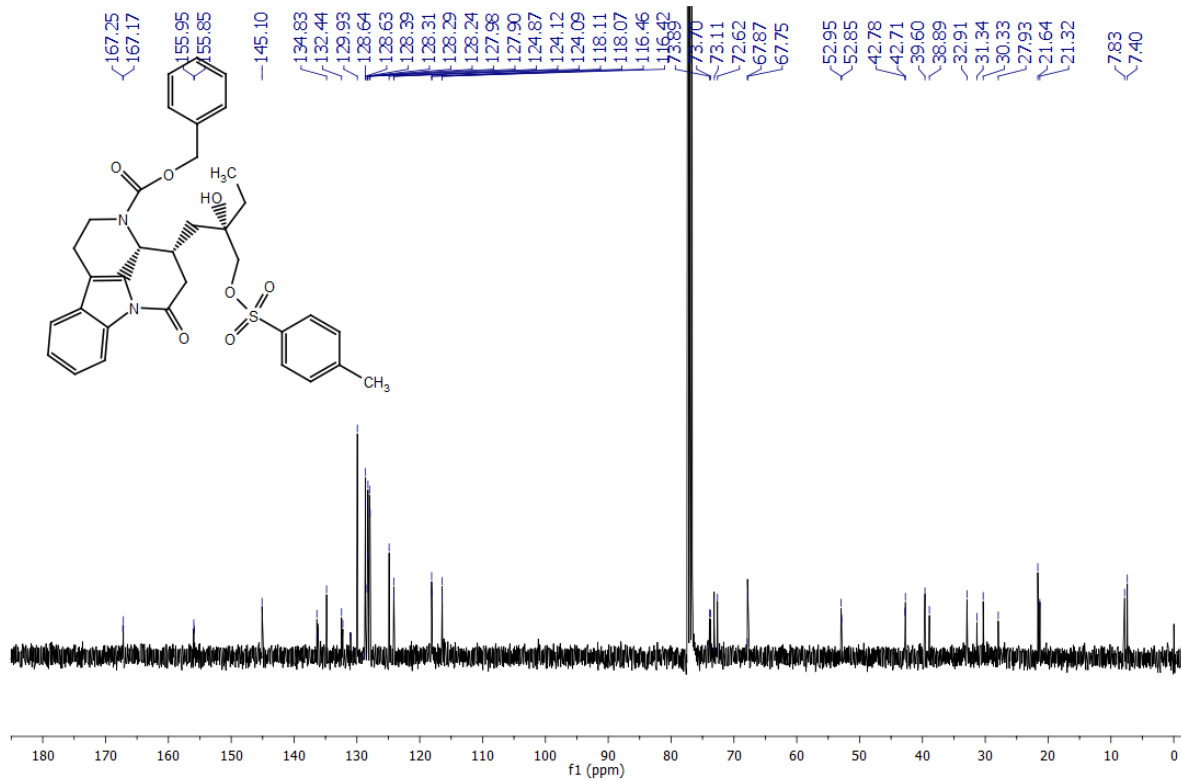


Figure S55. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compounds **23** (CDCl₃).

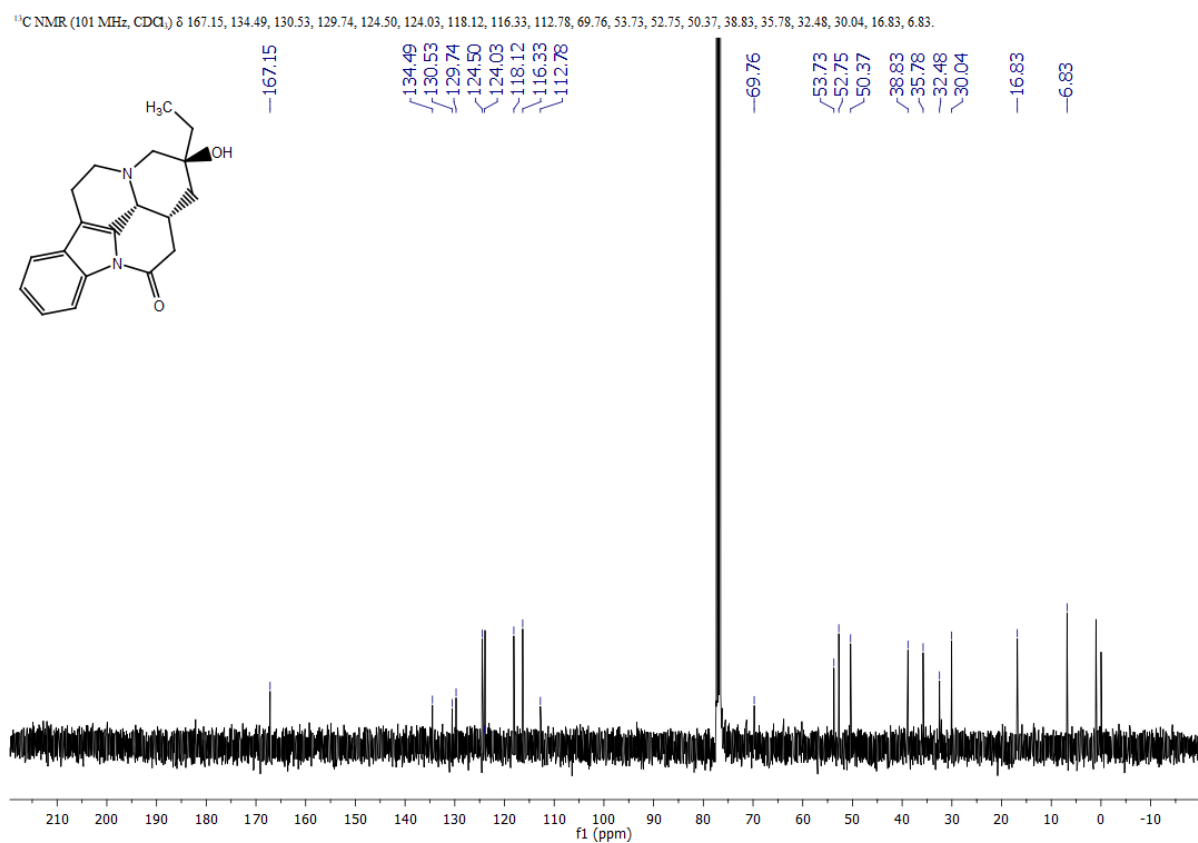
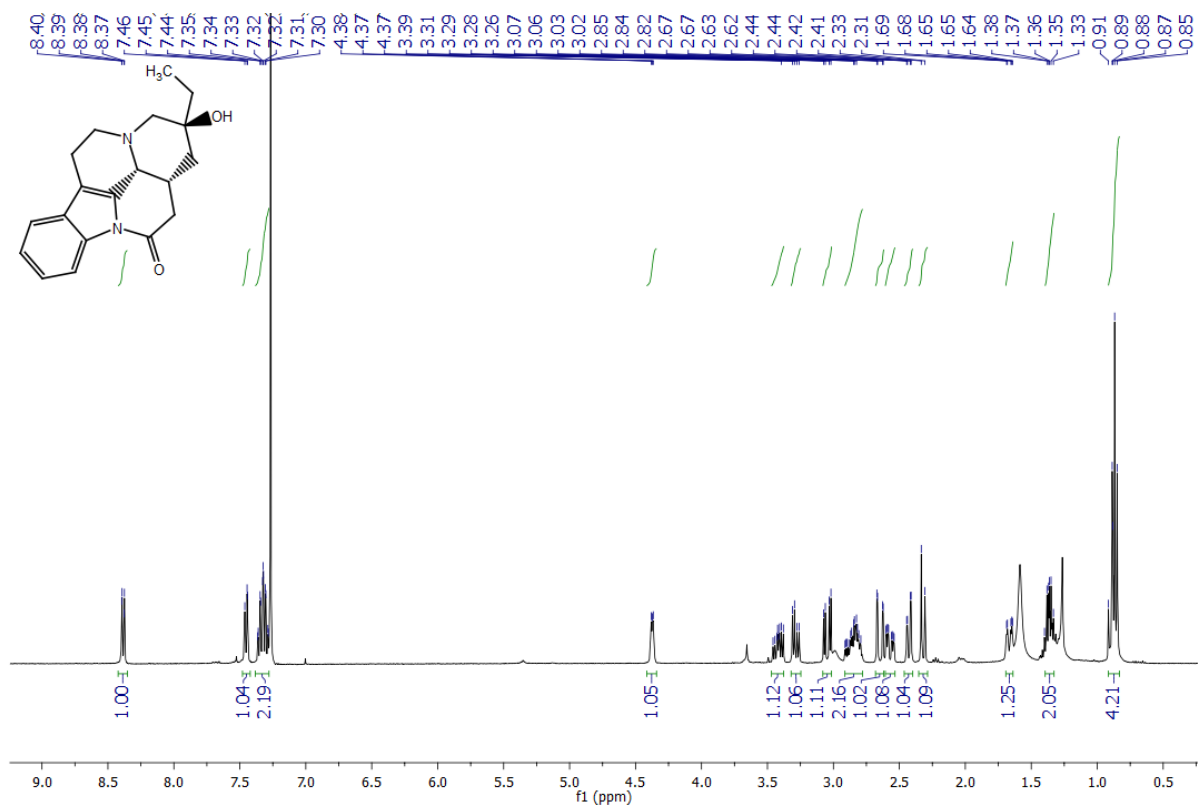


Figure S56. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of (R,R,S)-Tacamonidine **25** (CDCl₃).

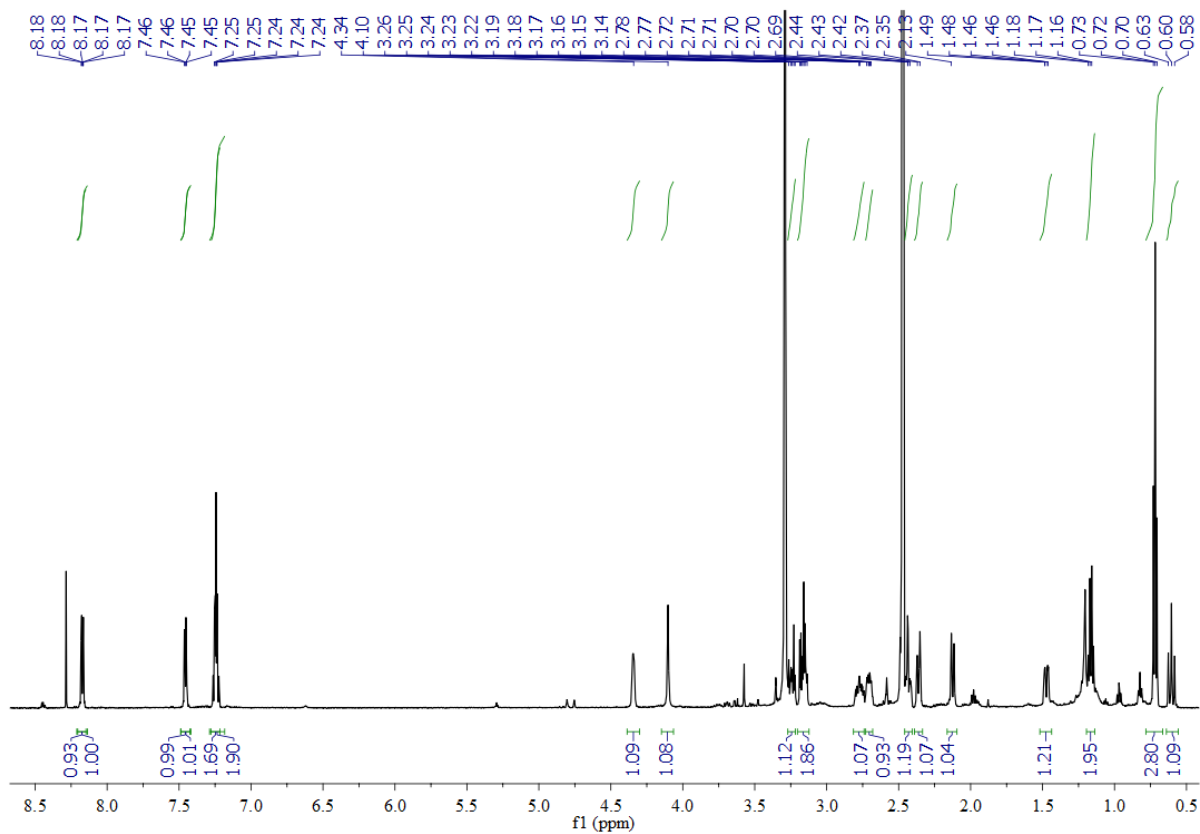


Figure S57. ^1H NMR spectra of (*R,R,S*)-Tacamonidine **25** (*d*-DMSO).

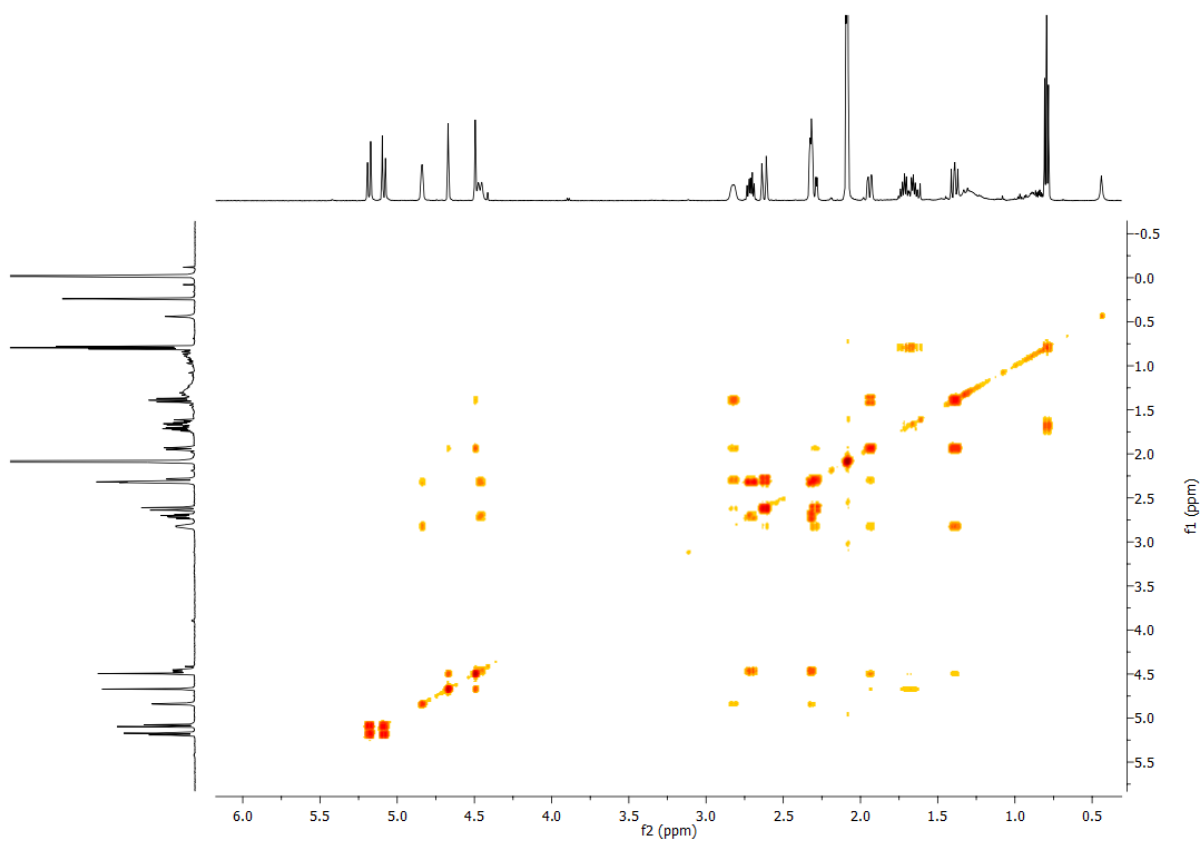


Figure S58. COSY of (*R,R,S*)-Tacamonidine **25** (*d*-DMSO).

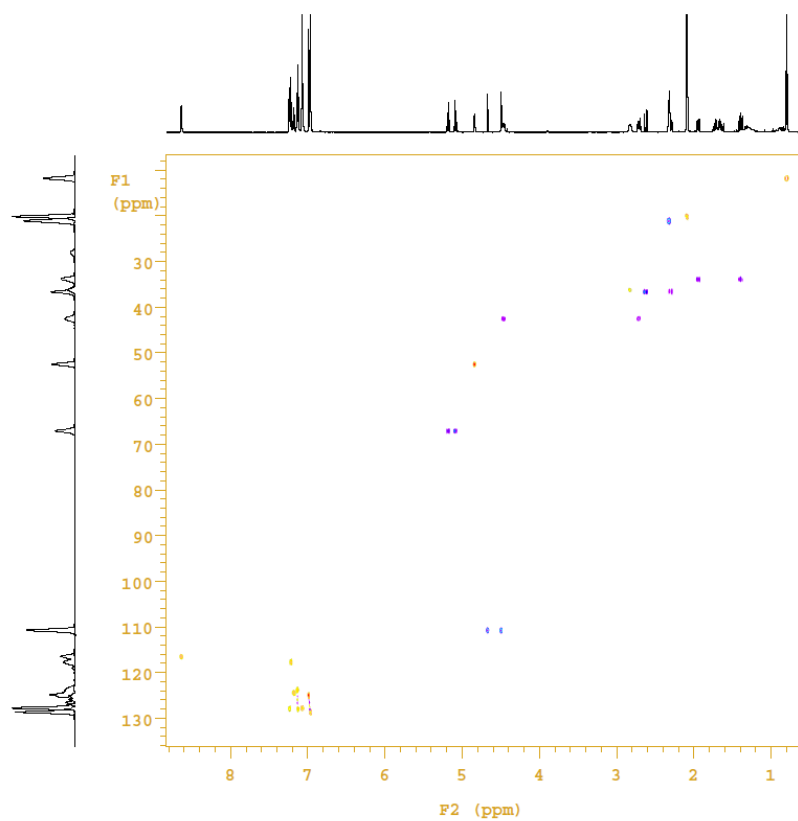


Figure S59. HSQCAD of (*R,R,S*)-Tacamonidine **25** (*d*-DMSO, ^{13}C internal projection).

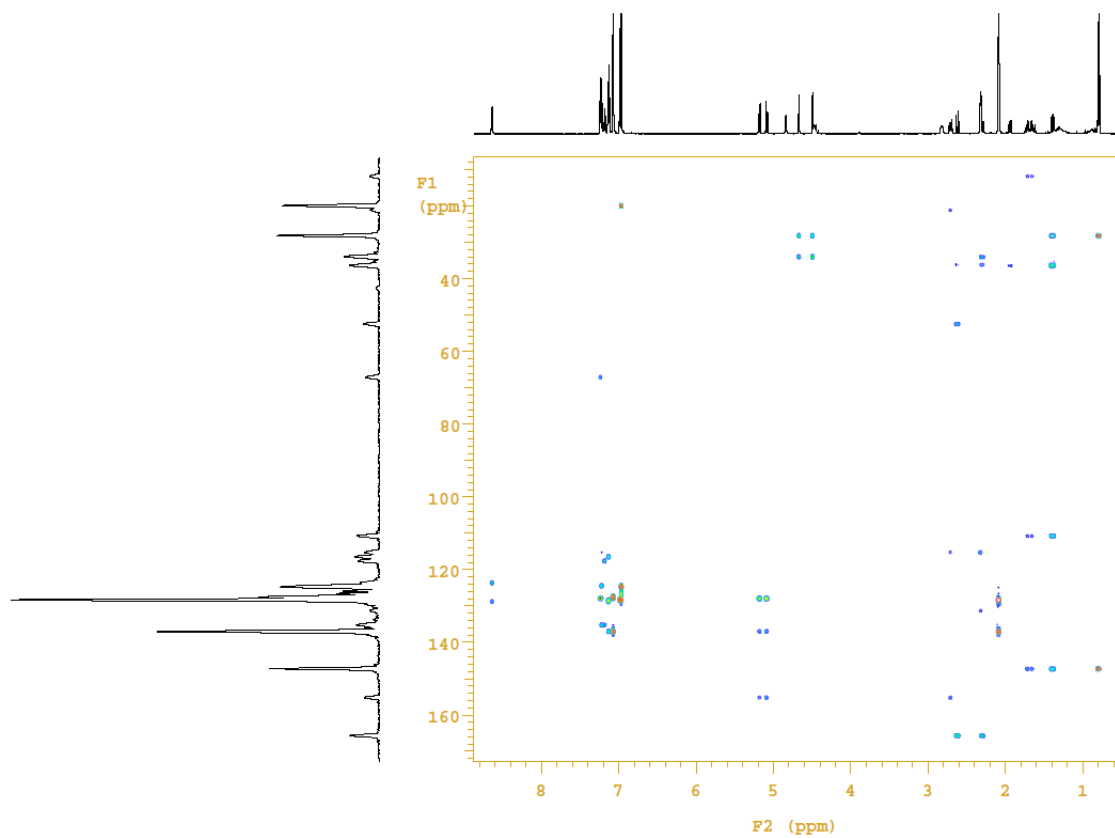


Figure S60. HMBCAD of (*R,R,S*)-Tacamonidine **25** (*d*-DMSO, ^{13}C internal projection).

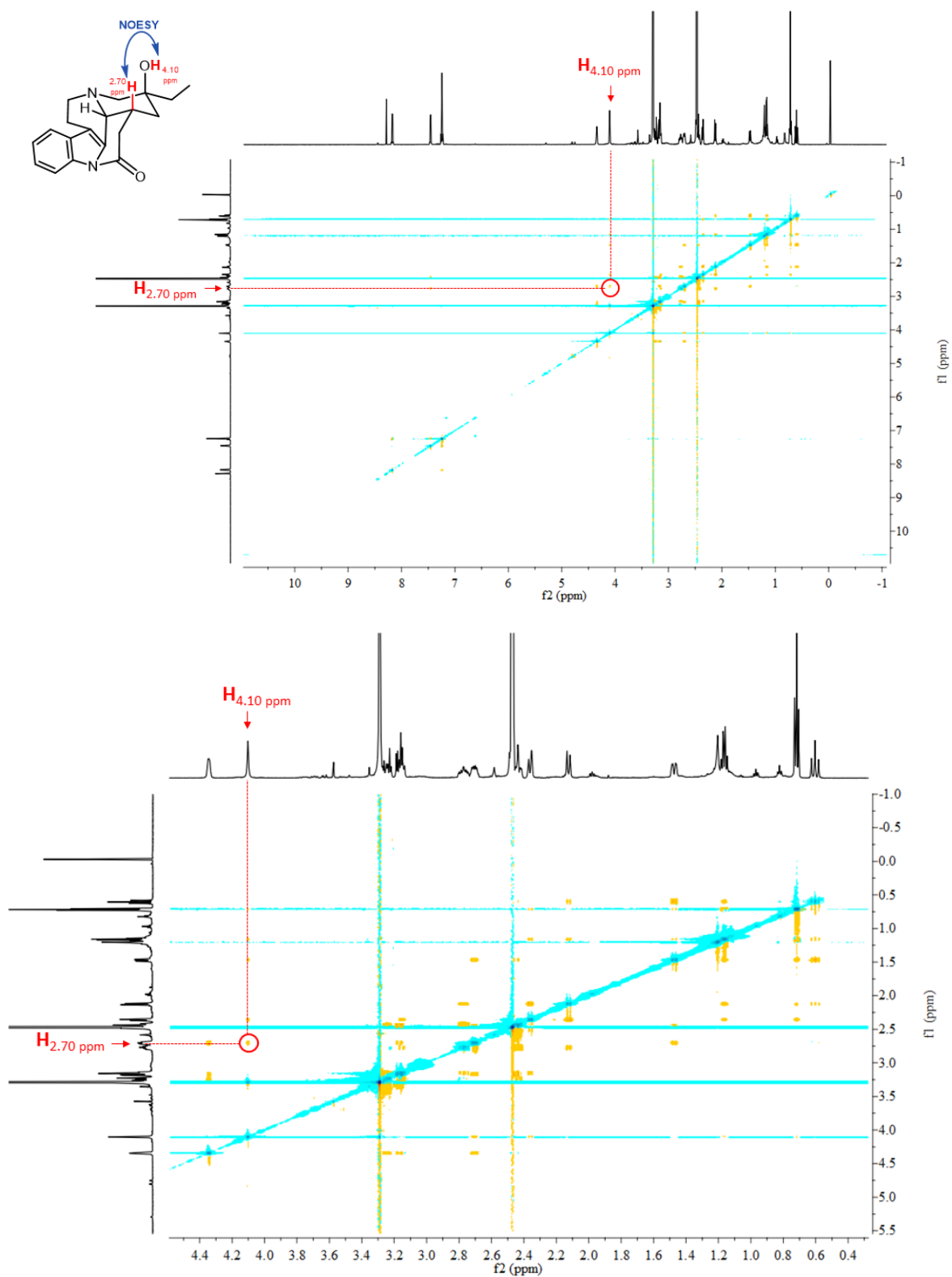


Figure S61. 2D-NOESY of *(R,R,S)*-Tacamonidine **25** (*d*-DMSO); the coupling between -OH group and proton H_{2.70}ppm is circled.

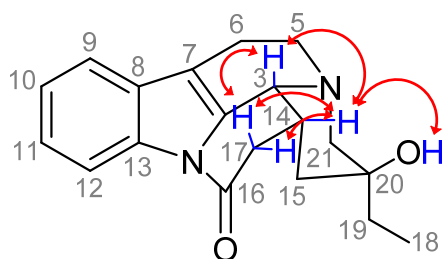


Figure S62. Selected NOE's of (*R,R,S*)-Tacamonidine **25** (*d*-DMSO); the coupling between -OH group and corrected proton H_{2.7ppm} is circled. The atom numbering and structure conformation follows the one proposed in³⁶.

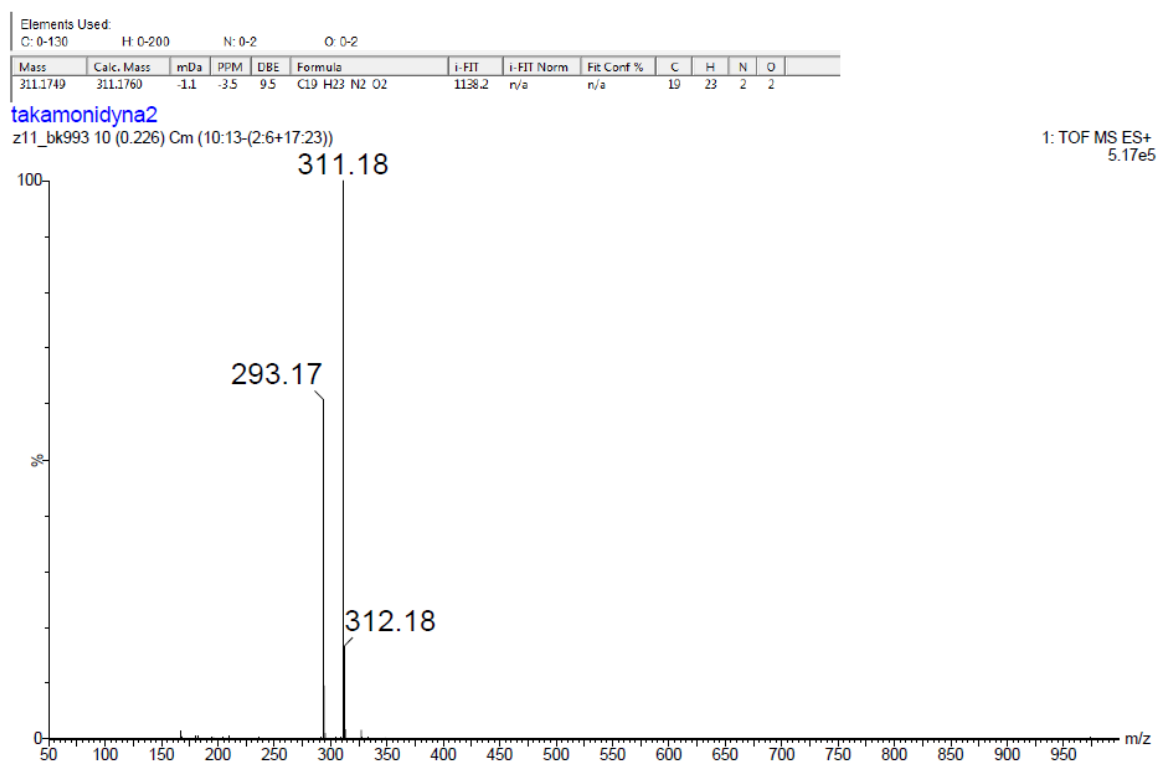


Figure S63. MS spectrum of (*R,R,S*)-Tacamonidine **25**.

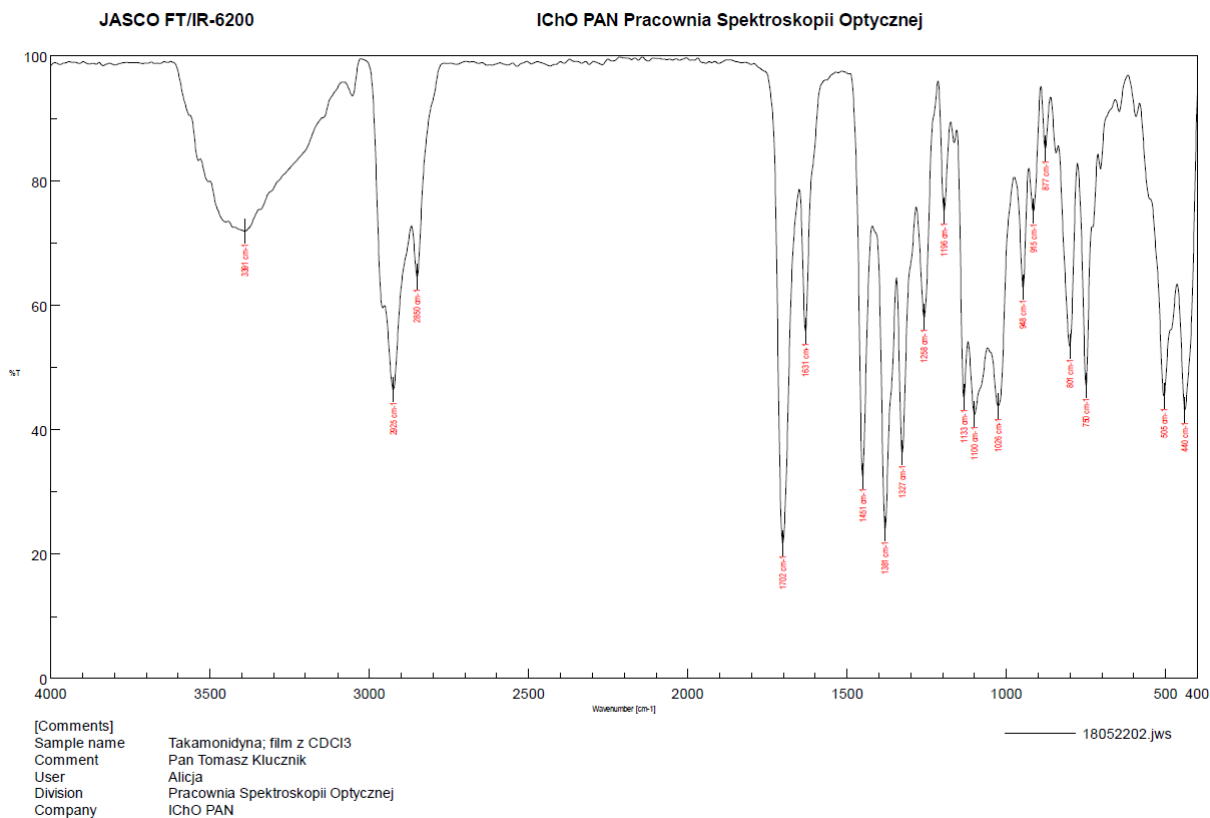


Figure S64. IR spectrum (dry film) of (*R,R,S*)-Tacamonidine **25**.

2018-05-29 10:30:51 Page 1 of 1

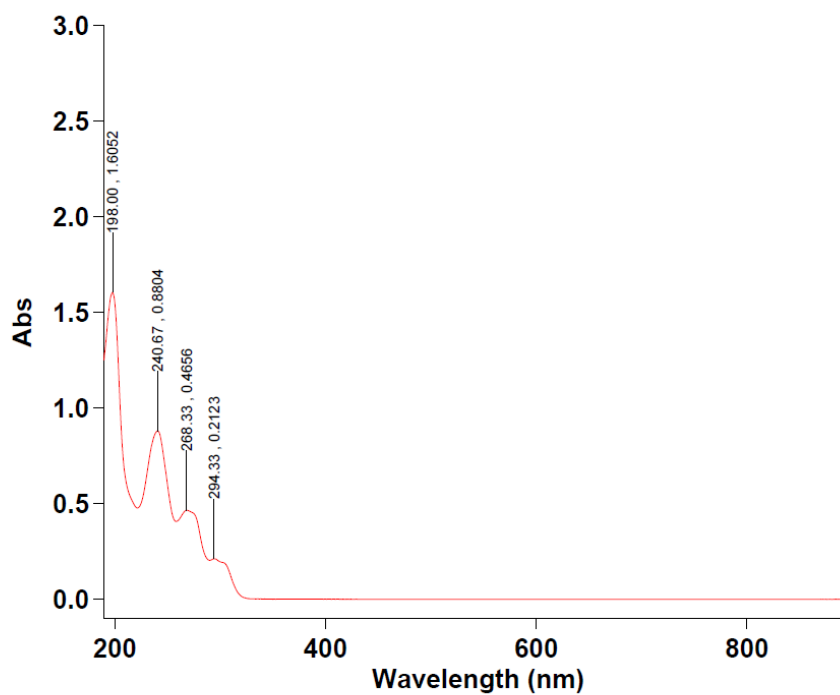


Figure S65. UV-VIS spectrum (MeCN) of (*R,R,S*)-Tacamonidine **25**.

Number of data 5

Optical Rotation

Average 0.0377 deg

S.D. 0.0015 deg

R.S.D. 4.0266 %

Specific O.R.

Average 62.8000

S.D. 2.5287

Figure S66. Optical rotation measurement of (*R,R,S*)-Tacamonidine **25**: $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ (c 0.12, CHCl_3) +62.8.

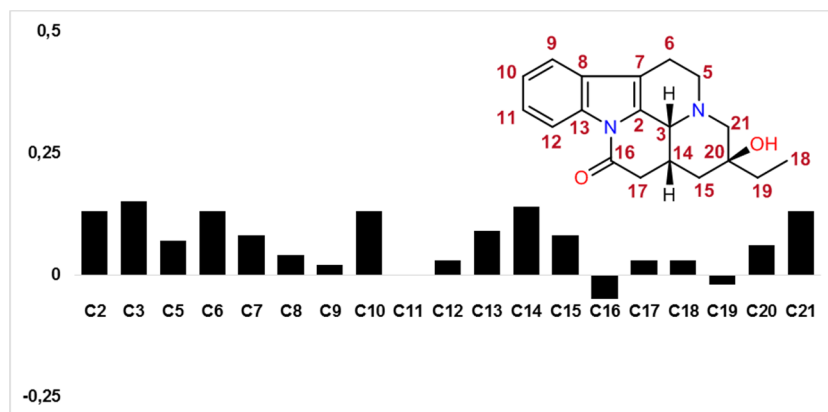


Figure S67. Difference between the chemical shifts of the carbon atoms of natural³⁶ and prepared Tacamonidine **25** (CDCl₃). The x-axis represents the carbon number while y-axis represents the difference of $\delta^{13}\text{C}$ in ppm between natural Tacamonidine (δT_N) and **25**, $\Delta(\delta_{25} - \delta T_N)$. The atom numbering and peak assignment follows the one proposed in ³⁶. All peaks of obtained **25** are within ± 0.15 ppm of natural Tacamonidine.

Atom number	δ Isolated Tacamonidine ³⁶	δ Prepared Tacamonidine (CDCl ₃)	δ Prepared Tacamonidine (<i>d</i> -DMSO)
3	4.36 dt (6.1, 2)	4.42 – 4.34 m	4.35 s
5	3.28 dd (14.2, 6.4)	3.42 ddd (14.0, 11.6, 5.8)	3.24 m
	3.41 (14.2, 11.7, 5.5)	3.29 dd (14.0, 6.3)	3.16 m
6	2.86 m	2.85 m	2.45
	2.56 ddd (16.9, 5.5, 2.5)	2.57 ddd (16.9, 5.6, 2.5 Hz)	2.77 m
9	7.45 dd (6.8, 1.5)	7.48 – 7.42 m	7.46 dd
10	7.30 td (7.3, 1.5)	7.38 – 7.28 m	7.22 - 7.27 m
11	7.34 td (7.3, 1.5)		
12	8.38 dd (7.1, 1.5)	8.39 dd (7.0, 1.2)	8.17 m
14	2.83 m	2.85 (17.1, 2.2)	2.70 m
15	0.87 t (13.2)	0.85 m	0.6 t
	1.66 ddd (13.2, 4.6, 2)	1.69 – 1.64 m	1.48 dd
17	2.20* dd (17.2, 2.2)	2.65 ddd (16.9, 5.6, 2.5)	2.45 m
	3.04 dd (17.2, 5.4)	3.05 dd (17.1, 5.2)	3.17
18	0.86 t (7.6)	0.84 m	0.72 t
19	1.36 m	1.39 – 1.33 m	1.15 q
	1.36 m	1.39 – 1.33 m	
21	2.31 d (11.2)	2.32 d (11.2)	2.11 d
	2.42 dd (11.2, 2)	2.43 dd (11.2, 2.1)	2.36 d

Figure S68. Comparison of chemical shifts of the proton atoms of natural and prepared (*R,R,S*)-Tacamonidine **25**. The atom numbering and peak assignment follows the one proposed in ³⁶.

* The chemical shift of one of the protons 17 (2.20 ppm) listed in main text of ref ³⁶ does not correspond with the raw spectrum provided in the Supplementary Information to this very same paper – according to that raw ¹H NMR spectrum the authors provide in their SI, this proton has a shift around 2.6 – 2.7 ppm, as in our experiments.

S3.11. Possible adaptations of Chematica's Tacamonidine strategy to other members of alkaloid families of Eburnamines, Vincamines and Tacamans.

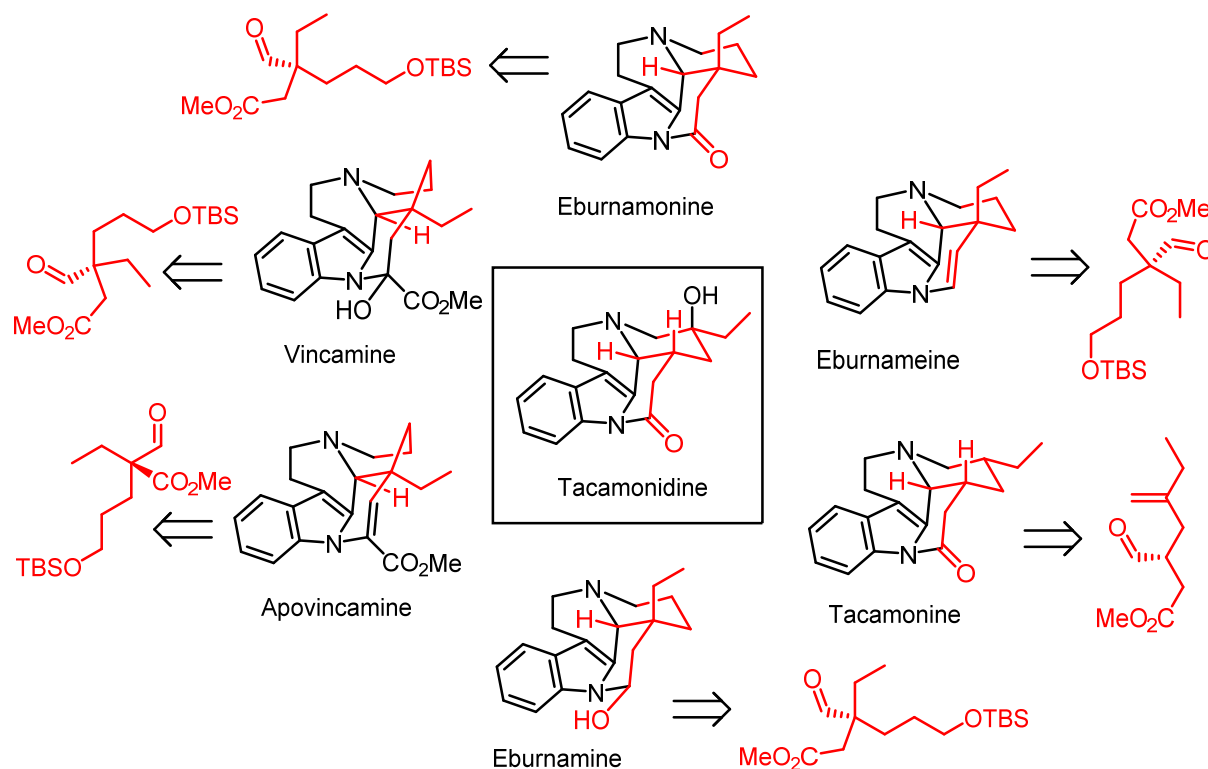


Figure S69. Adaptations of the strategy applied to the Tacamonidine to other members of alkaloid families of Eburnamines, Vincamines and Tacamans. Flexibility of Chematica's strategy derives from the broad spectrum of the easily accessible (via Enders methodology^{S29}) aldehydes with tertiary or quaternary stereocenters. After installation of the first stereocenter, another one is formed during the Pictet-Spengler reaction with tryptamine. Independent stereocenter formation opens access to all stereoisomers.

S3.12. Alternative syntheses of Tacamonidine proposed by Chematica.

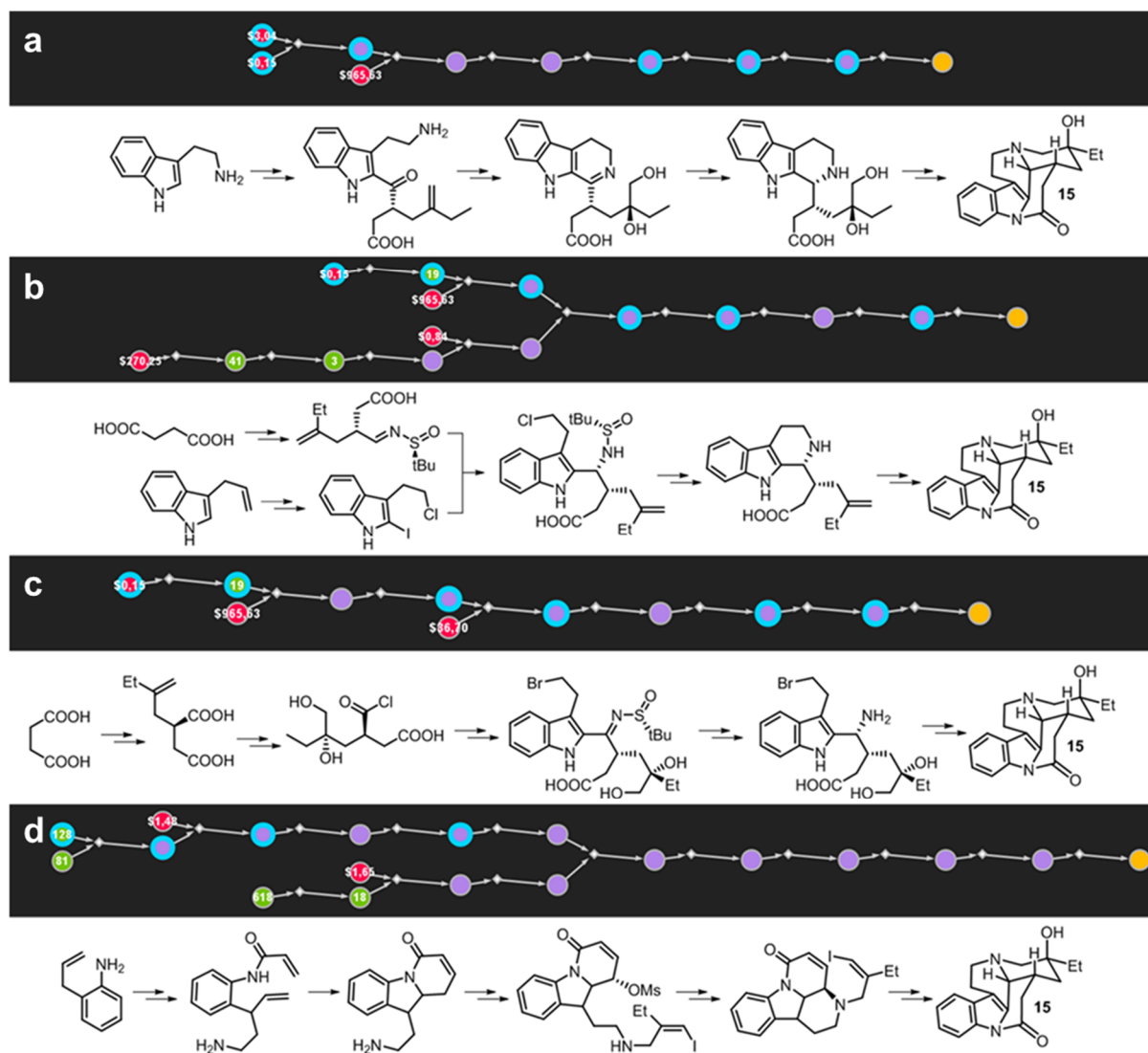


Figure S70. Illustration of diverse syntheses. Examples of alternative syntheses of Tacamonidine found by Chematica upon constraining the searches to avoid the Pictet-Spengler cyclization. In this exercise, the program was allowed to run overnight. Color coding of the nodes is the same as in the main-text **Figure 3**. For pathway details, see screenshots in **Figures S72-S74**. For instance, the synthetic plan for tacamonidine in panel **a** (and **Figure S71**) commences with Friedel-Crafts acylation of tryptamine, followed by chiral hydrazine-controlled alkylation of the ketone^{S30}, Sharpless' dihydroxylation,^{S31} and reduction of the cyclic imine^{S32} setting all stereocenters for the molecule (subsequent steps assemble the remaining rings). The alternative syntheses in panels **b**, **c** and **Figures S72**, **S73**, respectively, rely on

chiral amine formation (controlled by Ellman's sulfonamide) *via* addition^{S33} of an organometallic reagent derived from 2-iodoindole or reduction^{S34} of acyclic ketimine. We note that in **b**, indole addition to chiral sulfinylimine requires the formation of a dianion^{S35}, or introduction of *N*-protecting group^{S33,S34}. In both plans, remaining stereocenters are formed *via* alkylation of an enolate controlled by an Evans-type auxiliary (see^{S36,S37} for a similar application of this methodology) and Sharpless' asymmetric dihydroxylation. Finally, in the pathway in panel **d** (and **Figure S74**) starting from 2-allylaniline, the 6-5-6 ring system is achieved in a single step *via* a copper-catalyzed carboamination of the alkene (see^{S38} for the applicability of this reaction to similar scaffolds). This route's key step is an intramolecular conjugate addition^{S39,S40}, followed by late-stage indoline and alkene oxidations (see **Figures S75, S76** for further details and discussion concerning conformational effects).

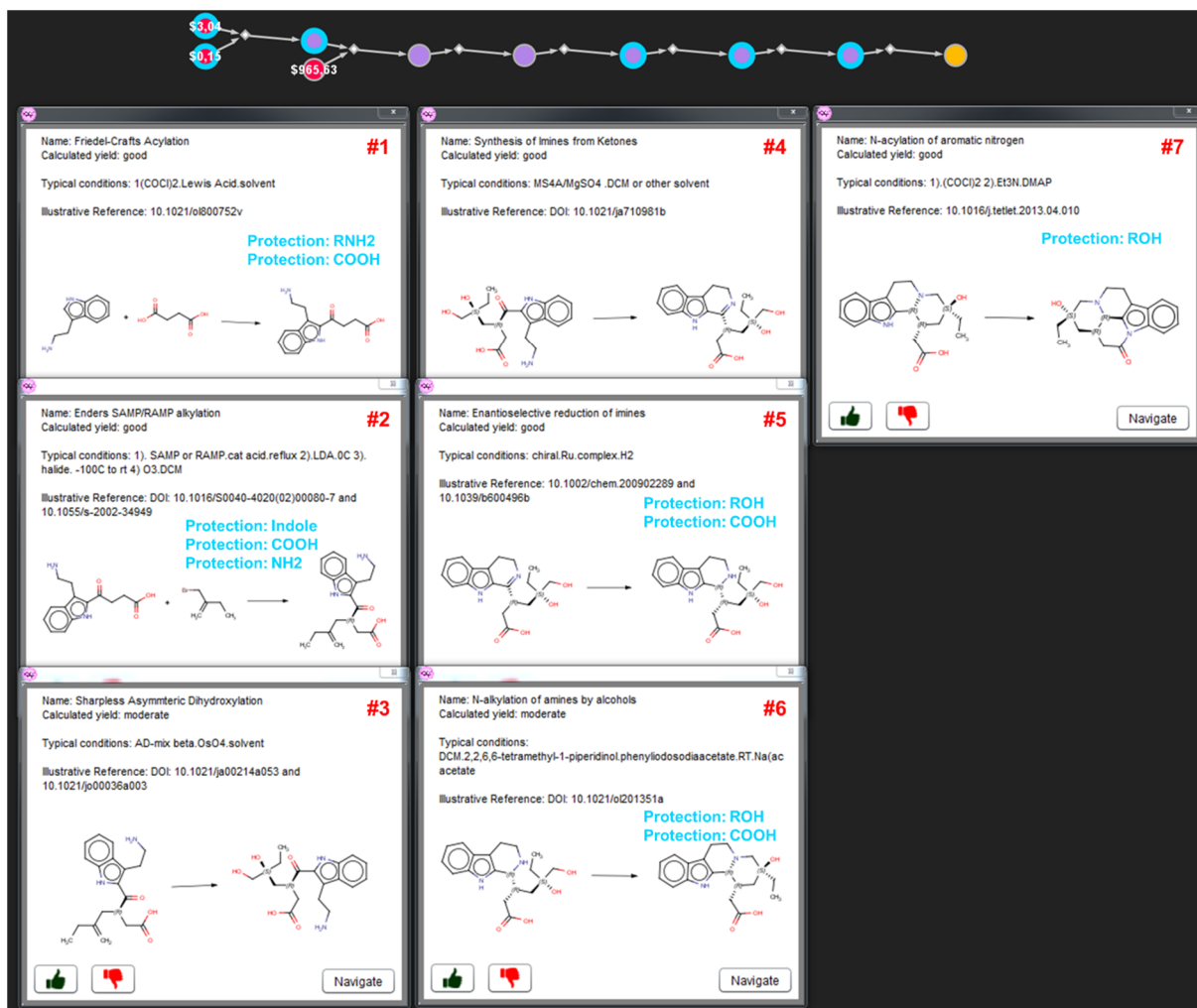


Figure S71. Details of Chemica's synthesis of Tacamomidine from Figure S70a.

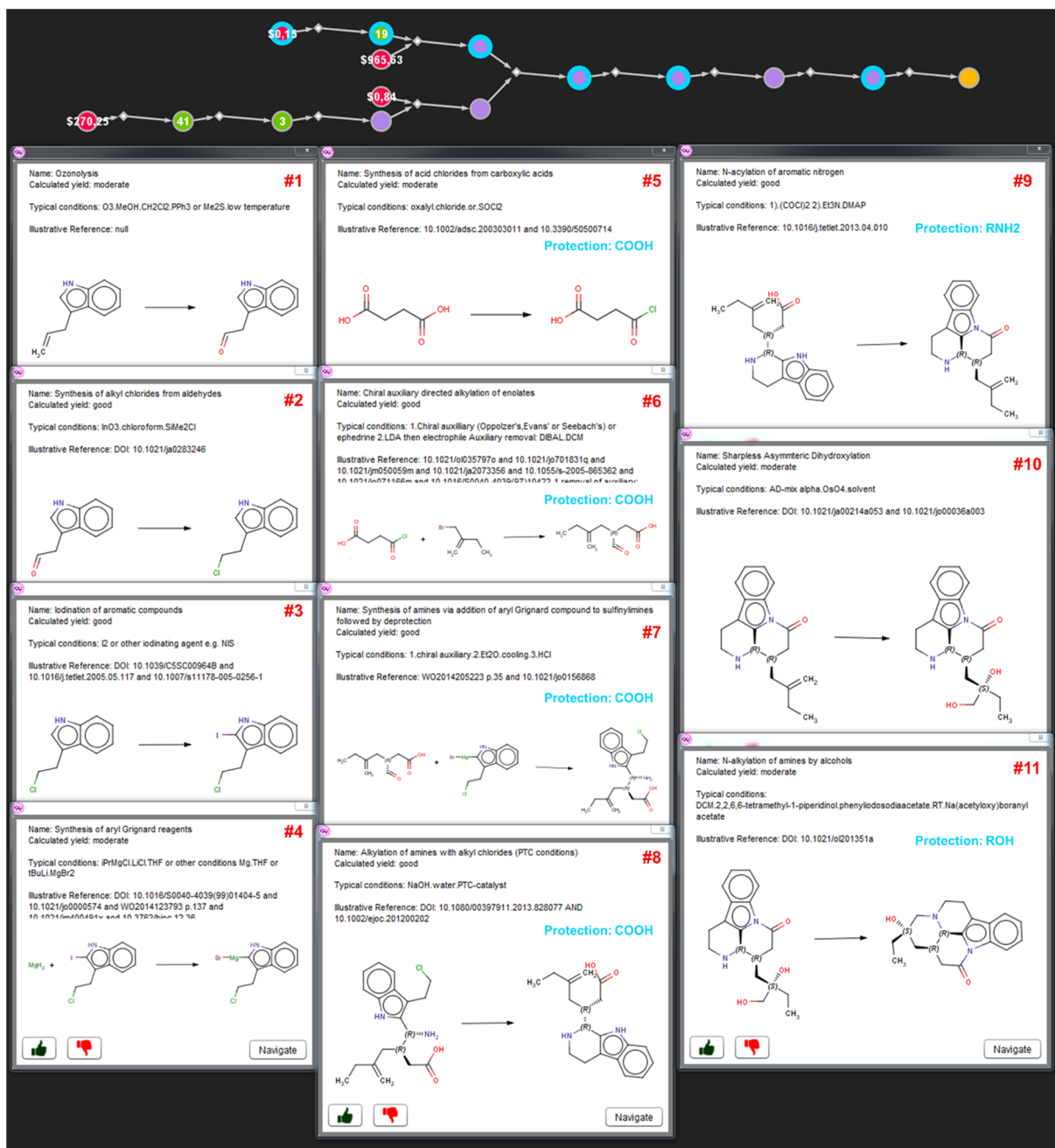


Figure S72. Details of Chemica's synthesis of Tacamomidine from Figure S70b.

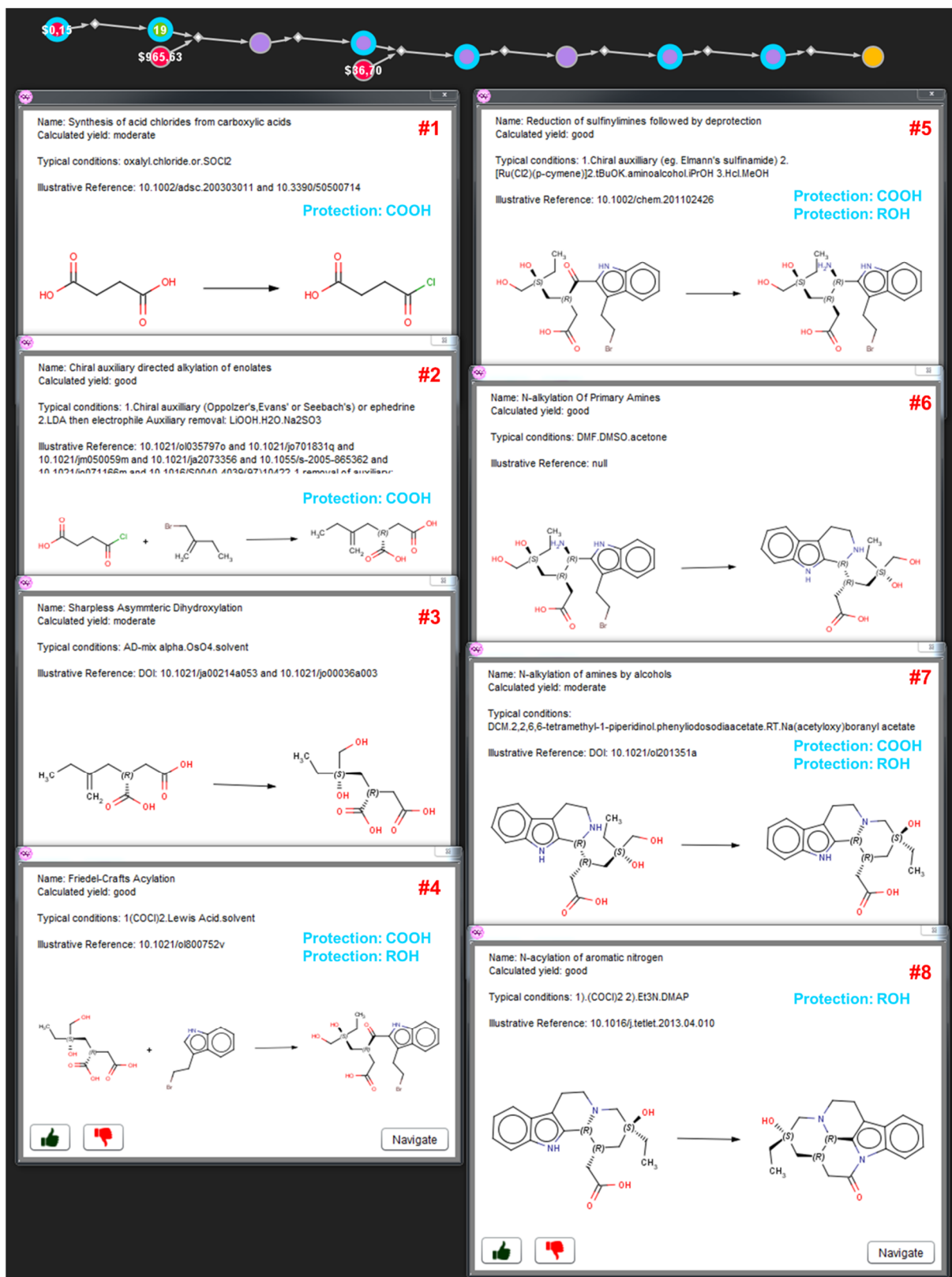


Figure S73. Details of Chematica's synthesis of Tacamonidine from **Figure S70c**.

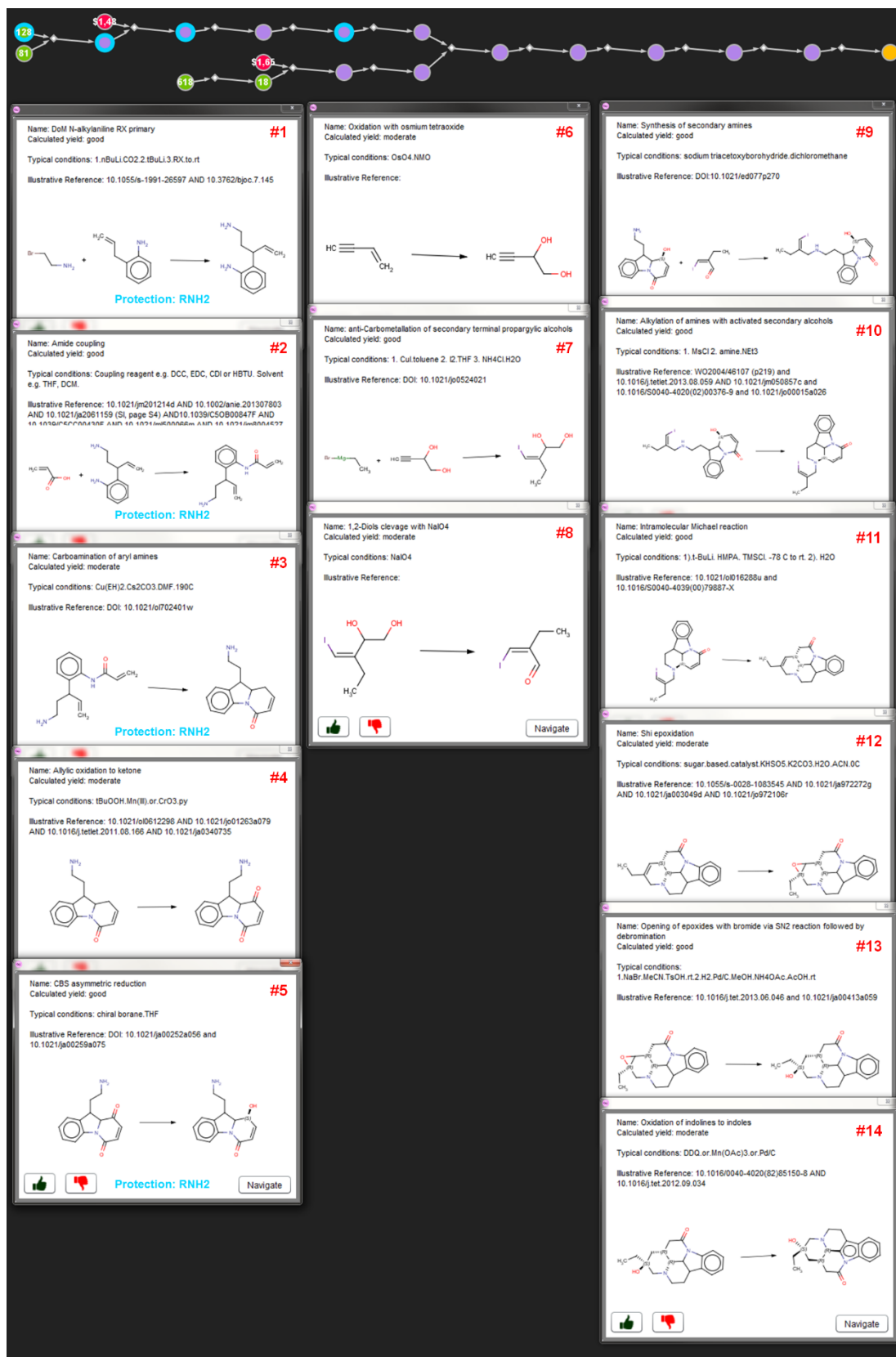


Figure S74. Details of Chemica's synthesis of Tacamonidine from Figure S70d.

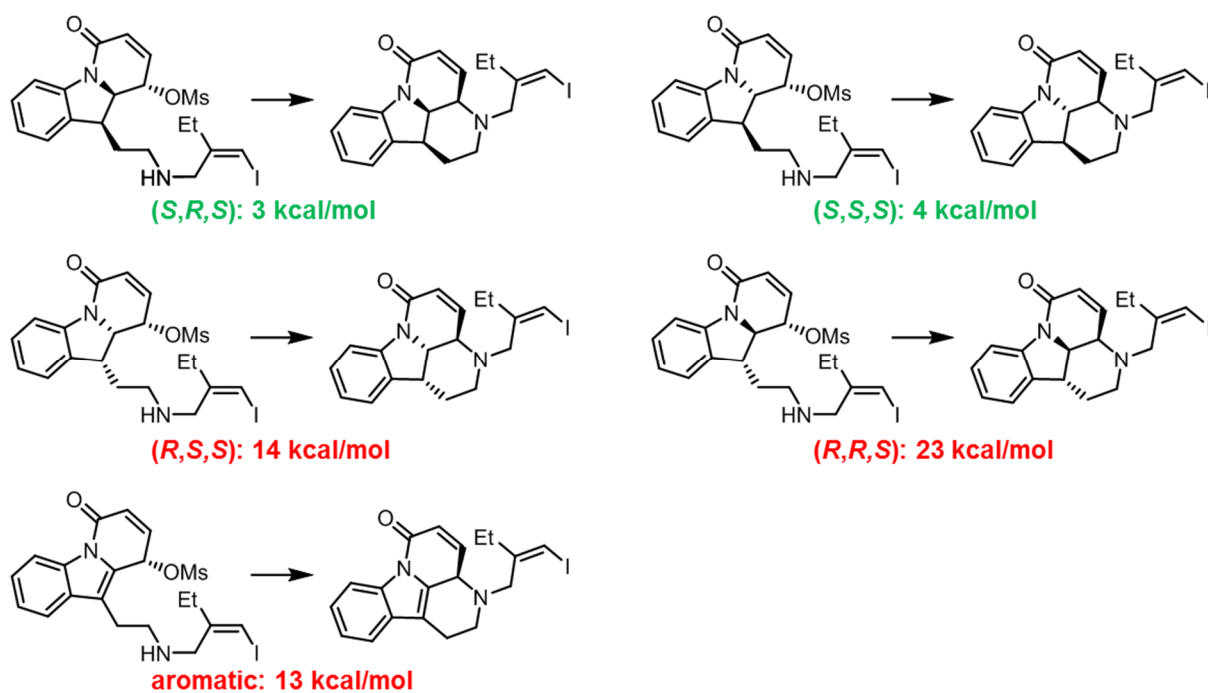


Figure S75. Feasibility of intramolecular amination (pathway from **Figure S70d**, step #10 in **Figure S74**) evaluated by intramolecular cyclization post-synthetic-design filter (described in detail in ^{9,27}). The calculations confirm that cyclisation of (*S,R,S*) and (*S,S,S*) diastereomers (top) will occur much more readily compared with (*R,S,S*) or (*R,R,S*) isomers (middle) or the aromatized substrate (bottom). The red and green values are strain energies calculated as the difference between the energy of the lowest energy conformer of the substrate and the lowest energy conformer resembling the transition state (with fixed C-N distance and position relevant to S_N2 mechanism), calculated with Merck Molecular Force Field (MMFF94). 200 conformers were evaluated in each case. Based on this analysis, we further queried the Chematica software to design synthetic routes leading to the (*R*)-precursor of the desired (*S,R,S*) and (*S,S,S*) dienes (for details see **Figure S76**).

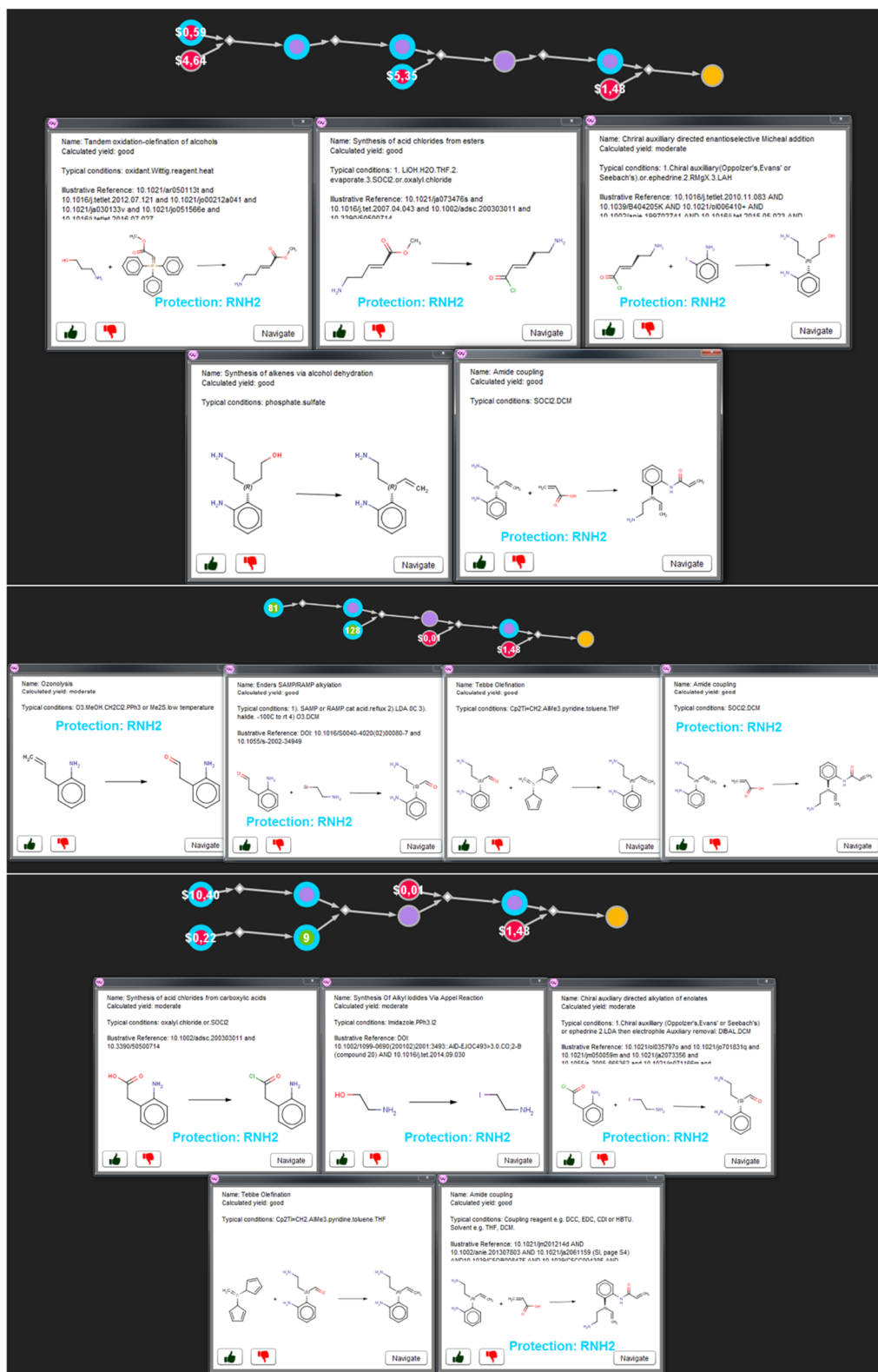


Figure S76. Chemica's syntheses of enantioenriched diene necessary for the preparation of (*S,R,S*) and (*S,S,S*) mesylates from **Figure S75**. In all synthetic plans, the key steps – installing the benzylic stereocenter – rely on methodologies using chiral auxiliaries either in conjugated addition or alkylation.

S4. Synthesis of Lamellodysidine A

S4.1. Details of Chematica's output for the Lamellodysidine A pathway.

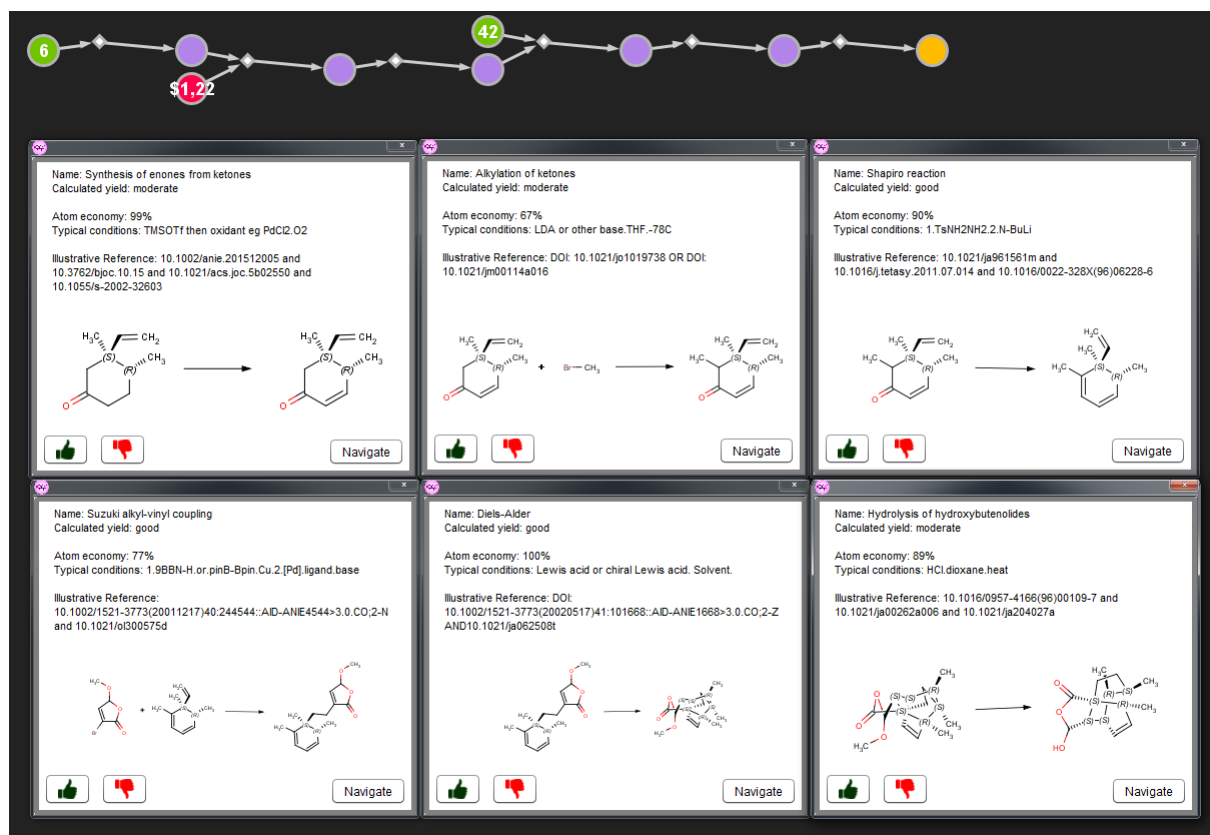
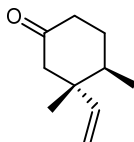


Figure S77. Details of Chematica's raw output for the synthesis of Lamellodysidine A; the figure complements main-text **Figure 5**. Expansion of each reaction node provides, *inter alia*, reaction miniature, name of the reaction, general class of reaction conditions, and most relevant literature references with specific conditions.

S4.2. Synthetic details.

General information. All starting materials and reagents were obtained from commercial sources and used as received unless otherwise noted. All solvents used were freshly distilled prior to use. ^1H NMR spectra were recorded at 400, 500 or 600 MHz and ^{13}C NMR spectra were recorded at 100, 125 or 150 MHz with complete proton decoupling. Chemical shifts are given in δ relative to the residual signals of the deuterated solvents. High-resolution mass spectra were acquired using electron ionization (EI) or electrospray ionization (ESI) mode with a time-of-flight detector. Infrared (IR) spectra were recorded on a Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometer as a thin film on a NaCl plate (film). HPLC analyses were performed on a HPLC system equipped with chiral stationary phase columns, detection at 254 nm. Optical rotations were measured at room temperature with a polarimeter. TLC was performed with aluminum plates coated with 60 F254 silica gel. Plates were visualized with UV light (254 nm) and by treatment with ethanolic *p*-anisaldehyde with sulfuric and glacial acetic acids, followed by heating, aqueous cerium(IV) sulfate solution with molybdic and sulfuric acids, followed by heating, or aqueous potassium permanganate with sodium hydroxide and potassium carbonate solution, followed by heating. Reaction products were purified by flash chromatography using silica gel 60 (230-400 mesh). Microwave reactions were performed with a CEM Discover single mode platform using 10 mL pressurized vials.



(3*S*,4*R*)-3,4-dimethyl-3-vinylcyclohexan-1-one (29).

Prepared via adaptation of procedure from ⁴⁵.

To a flask containing CuI (10 g, 52.50 mmol, 2 equiv) was added anhydrous THF (300 mL) and the mixture was cooled to -78°C . Vinyl magnesium bromide (1.0 M in THF, 105 mL, 105.00 mmol, 4 equiv) was added dropwise over 25 min and the mixture was warmed to -10°C and stirred for 1.5 h. Next, the mixture was recooled to -78°C and a solution of (*R*)-3,4-dimethylcyclohex-2-en-1-one **28** obtained following procedure from ⁴⁶ (3.260 g, 26.25 mmol) in anhydrous THF (72 mL) was added dropwise over 15 min. A solution of HMPA (73 mL, 420.00 mmol, 16 equiv.) and TMSCl (7 mL, 55.13 mmol, 2.1 equiv.) in anhydrous THF (39 mL) was added to the mixture and the reaction was allowed to warm to rt and was stirred for 14 h. Upon completion, the mixture was quenched at 0°C with 1 M HCl (30 mL) and stirred

for 1 h. The layers were separated and the aqueous phase was washed with Et₂O and combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified by column chromatography (pentane/Et₂O 4:1) to give **29** (3.298 g, 83%) as a slightly yellow liquid.

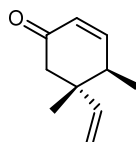
$[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ -30.33 (c 1.34, CH₂Cl₂);

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 5.76 (dd, *J* = 17.4, 10.8 Hz, 1H), 5.02 (dd, *J* = 10.8, 0.9 Hz, 1H), 4.96 (dd, *J* = 17.4, 0.9 Hz, 1H), 2.39 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 2.36 – 2.32 (m, 2H), 2.09 (dd, *J* = 14.1, 1.4 Hz, 1H), 1.97 – 1.90 (m, 1H), 1.89 – 1.80 (m, 1H), 1.66 – 1.60 (m, 1H), 0.91 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.90 (s, 3H);

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 211.5, 147.1, 112.2, 53.0, 44.4, 40.7, 38.3, 30.6, 17.0, 15.5;

IR (film) 3084, 2964, 2935, 2875, 1713, 1637, 1457, 1420 cm⁻¹;

HRMS (EI) *m/z*: [M]⁺ Calcd for C₁₀H₁₆O 152.1201; Found 152.1202.



(4*R*,5*S*)-4,5-dimethyl-5-vinylcyclohex-2-en-1-one (30).

Ketone **29** (3.080 g, 20.23 mmol) was dissolved in a mixture (2:1) of anhydrous toluene (135 mL) and anhydrous DMSO (67.5 mL). 1-Hydroxy-1,2-benziodoxol-3(1*H*)-one 1-oxide (IBX) (**54**) (11,331 g, 40.46 mmol, 2 equiv) and *p*-TsOH (0.192 g, 1.01 mmol, 5 mol%) were added, and the reaction was stirred at 85 °C for 2 h. Upon completion, the mixture was diluted with Et₂O and was washed with sat. NaHCO₃, water and brine. Organic phase was dried over Na₂SO₄, concentrated *in vacuo* to remove Et₂O and the residual solution was poured directly onto silica gel and purified by column chromatography (pentane/Et₂O 4:1) to give **30** (2.589 g, 85%) as a slightly yellow liquid.

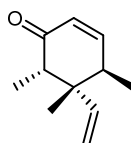
$[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ -177.24 (c 1.09, CH₂Cl₂);

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.65 (dd, *J* = 10.1, 3.0 Hz, 1H), 5.95 (ddd, *J* = 10.1, 2.5, 0.9 Hz, 1H), 5.80 (dd, *J* = 17.4, 10.8 Hz, 1H), 5.04 (dd, *J* = 10.8, 0.9 Hz, 1H), 5.01 (dd, *J* = 17.4, 0.8 Hz, 1H), 2.57 – 2.50 (m, 1H), 2.44 (dd, *J* = 16.0, 0.8 Hz, 1H), 2.28 (dd, *J* = 16.0, 0.9 Hz, 1H), 1.06 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H), 0.99 (s, 3H);

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 199.2, 153.9, 145.7, 128.1, 113.0, 49.5, 42.9, 39.6, 18.5, 14.6;

IR (film) 3084, 3028, 2971, 2879, 2839, 1682, 1640, 1454, 1415 cm⁻¹;

HRMS (EI) *m/z*: [M]⁺ Calcd for C₁₀H₁₄O 150.1045; Found 150.1047.



(4R,5S,6S)-4,5,6-trimethyl-5-vinylcyclohex-2-en-1-one (31).

To a solution of diisopropylamine (1.90 mL, 13.56 mmol, 1.25 equiv) in anhydrous THF (55 mL) at -78 °C was added *n*-BuLi solution (1.6 M in hexanes, 8.48 mL, 13.56 mmol, 1.25 mmol) and the mixture was stirred for 30 min. Then a solution of enone **30** (1.630 g, 10.85 mmol) in anhydrous THF (40 mL) was added dropwise and the mixture was stirred at -78 °C for 2 h. Next iodomethane (3.080 g, 21.70 mmol, 2 equiv) in anhydrous THF (15 mL) was added dropwise at -78 °C followed by addition of HMPA (7.55 mL, 43.40 mmol, 4 equiv). The reaction mixture was stirred at -78 °C for 30 min, warmed to 0 °C, and stirred for additional 1 h. Upon completion, the reaction mixture was diluted with Et₂O and sat. NH₄Cl was added. Aqueous phase was extracted with Et₂O and combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified by column chromatography (pentane/Et₂O 9:1) to give **31** (1.498 g, 84%) as a slightly yellow liquid.

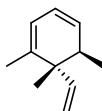
$[\alpha]_D^{23}$ -257.75 (c 1.24, CH₂Cl₂);

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.61 (dd, *J* = 10.1, 3.3 Hz, 1H), 5.91 (dd, *J* = 10.1, 2.3 Hz, 1H), 5.82 (dd, *J* = 17.6, 11.0 Hz, 1H), 5.12 (dd, *J* = 11.0, 1.1 Hz, 1H), 5.05 (dd, *J* = 17.6, 1.1 Hz, 1H), 2.64 – 2.58 (m, 1H), 2.27 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 1.09 (d, *J* = 7.7 Hz, 3H), 1.07 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.04 (s, 3H);

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 202.9, 152.5, 143.2, 126.8, 114.5, 50.8, 44.5, 36.7, 20.1, 14.4, 11.3;

IR (film) 3083, 3028, 2976, 2938, 2879, 1681, 1638, 1455, 1415 cm⁻¹;

HRMS (EI) *m/z*: [M]⁺ Calcd for C₁₁H₁₆O 164.1201; Found 164.1208.



(5R,6S)-1,5,6-trimethyl-6-vinylcyclohexa-1,3-diene (32). Prepared under conditions from^{S41}. Enone **31** (1 g, 6.09 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in anhydrous THF (31 mL) and cooled to -78 °C. A solution of LiHMDS (1M in THF, 9.1 mL, 9.135 mmol, 1.5 equiv.) was slowly added to the flask. The solution was stirred for 1 h before the dropwise addition of a THF solution of PhNTf₂ (3.7 g, 10.35 mmol, 1.7 equiv.; prepared by dissolving in 20 mL anhydrous THF). The

mixture was slowly warmed to rt for 2.5 h and was stirred additional 1 h. It was then diluted with Et₂O and washed with sat. NH₄Cl. The aqueous layer was extracted with Et₂O. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and carefully concentrated (**product is highly volatile!**). Crude triflate (6.09 mmol, 1.0 equiv), Pd(OAc)₂ (274 mg, 1.22 mmol, 20 mol %), and PPh₃ (640 mg, 2.44 mmol, 40 mol %) were dissolved in anhydrous DMF (60 mL). *n*-Bu₃N (7.2 mL, 30.45 mmol, 5.0 equiv) and formic acid (0.69 mL, 18.27 mmol, 3.0 equiv) were added. The resulting solution was heated at 40 °C for 2 h, at which point the reaction turned black. It was then cooled to rt and purified without extraction. Flash chromatography in pentane afforded diene **32** (727 mg, 80%) as a colorless liquid (**product is highly volatile!**).

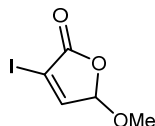
$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -157.5$ (c 2.5, CHCl₃);

¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) δ 5.77 (ddd, *J* = 9.4, 5.3, 2.5 Hz, 1H), 5.69 – 5.61 (m, 2H), 5.42 (dd, *J* = 9.4, 3.3 Hz, 1H), 5.01 – 4.91 (m, 2H), 2.34 – 2.27 (m, 1H), 1.56 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.85 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H);

¹³C NMR (100 MHz, C₆D₆) δ 145.4, 141.0, 129.9, 123.2, 120.0, 112.5, 44.5, 38.2, 19.8, 13.9, 12.9;

IR (film) 3083, 3033, 2971, 2933, 2876, 2813, 1830, 1674, 1636, 1588, 1445, 1413, 1372, 1100, 1063, 1005 cm⁻¹;

HRMS (EI) *m/z*: [M]⁺ Calcd for C₁₁H₁₆ 148.1252; Found 148.1259.



3-iodo-5-methoxy-5H-furan-2-one (27-I). Prepared under conditions from ^{S42}.

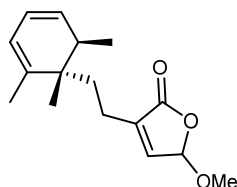
To a stirred solution of 5-methoxy-2(5H)-furanone ^{S43,S44} (1.141 g, 10.00 mmol) in a mixture (1:1) of THF (25 mL) and water (25 mL) were added successively K₂CO₃ (1.658 g, 12.00 mmol, 1.2 equiv.), iodine (6.345 g, 25.00 mmol, 2.5 equiv.) and DMAP (0.611 g, 5.00 mmol, 0.5 equiv.). The reaction was stirred at rt for 22 h and upon completion the mixture was diluted with Et₂O and quenched with 1 M Na₂S₂O₃. Aqueous phase was extracted with Et₂O, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 4:1) to give **27-I** (1.037 g, 43%) as a slightly yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.50 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 5.80 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 3.57 (s, 3H);

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 167.6, 155.3, 105.4, 91.4, 57.1;

IR (film, CH₂Cl₂) 3093, 2939, 2842, 1772, 1599, 1445 cm⁻¹;

HRMS (EI) *m/z*: [M]⁺ Calcd for C₅H₅IO₃ 239.9283; Found 239.9286.



5-methoxy-3-(2-((1S,6R)-1,2,6-trimethylcyclohexa-2,4-dien-1-yl)ethyl)furan-2(5H)-one (33). Prepared under conditions reported in ^{S45}.

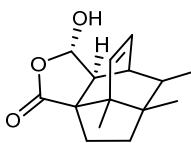
Triene **32** (44.5 mg, 0.3 mmol) was dissolved in anhydrous THF (0.4 mL). 9-BBN-H (0.5 M in THF, 0.9 mL, 0.45 mmol, 1.5 equiv.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt for 2 h and then quenched with water (27 μ L, 1.5 mmol, 5 equiv). To this solution iodide **27-I** (86 mg, 0.36 mmol, 1.2 equiv.) in anhydrous THF (0.8 mL) was added. The solution was cooled to 0 °C and Pd(PPh₃)₄ (35 mg, 0.03 mmol, 10 mol%) in anhydrous THF (1.15 mL) was added dropwise. After 5 min, TIOEt (32 L, 0.45 mmol, 1.5 equiv.) was added to the orange solution over a 10 min period. After 2 h at 0 °C, reaction was quenched with 1M Na₂S₂O₃, filtered through a Celite plug and extracted with Et₂O and water. The combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 9:1) to give **33** (43 mg, 55%) as a slightly yellow oil.

¹H NMR (500 MHz, C₆D₆) δ 5.72 – 5.71 (m, 1H), 5.44 (dd, J = 9.5, 5.3 Hz, 1H), 5.32 – 5.29 (m, 1H), 5.19 – 5.15 (m, 1H), 4.83 – 4.81 (m, 1H), 2.80 (s, 3H), 1.84 – 1.78 (m, 3H), 1.32 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 1.24 – 1.19 (m, 1H), 0.55 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.49 (d, J = 4.6 Hz, 3H);

¹³C NMR (125 MHz, C₆D₆) δ 170.5, 141.0, 141.0, 140.7, 138.8, 130.5, 122.5, 120.6, 120.6, 102.0, 102.0, 55.8, 55.7, 39.9, 39.8, 35.8, 35.6, 34.3, 34.2, 20.8, 20.8, 19.3, 19.2, 17.8, 17.8, 13.3;

IR (film) 3031, 2964, 2934, 1770, 1660, 1590, 1448, 1367, 1338, 1258, 1205, 1123, 1078, 1026 cm^{-1} ;

HRMS (ESI) m/z : [M + Na]⁺ Calcd for C₁₆H₂₂O₃Na 285.1461; Found 285.1467.



Lamellodysidine A (**35**).

Diels-Alder intramolecular cycloaddition

Toluene (2.4 mL) was added to a reaction vial charged with the starting material **33** (31 mg, 0.12 mmol). The mixture was then irradiated with microwaves in a CEM Discover apparatus for 5 min, setting the temperature to 170 °C and setting the stirring to “high”. Upon completion, the mixture was concentrated *in vacuo* and the crude product (~1:1 mixture of diastereoisomers) was directly submitted for the next step without further purification. Diagnostic signals from proton NMR spectrum, which confirm the presence of the Diels-Alder product **34**: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.26 – 6.15 (m, 1H, H-10), 5.81 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 0.48 x 1H, H-11), 5.54 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 0.52 x 1H H-11), 5.29 (d, *J* = 7.6 Hz, 0.52 x 1H, H-1), 4.81 (d, *J* = 3.9 Hz, 0.48 x 1H, H-1), 3.45 (s, 1.44 x 3H, OMe), 3.44 (s, 1.56 x 3H, OMe).

Stereospecific hydrolysis of the methoxyacetal performed under conditions reported in ^{S46}.

To a solution of crude cycloaddition product (0.12 mmol) in methanol (2.4 mL) 1M KOH (0.6 mL, 5 equiv.) was added and the mixture was refluxed for 1 h. Upon completion. the mixture was acidified with conc. HCl and diluted with DCM. Water was added, the layers were separated and the aqueous phase was extracted with DCM. Combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Crude product was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 4:1) to give **35** (20 mg, 67% (2 steps)) as a white solid. Analytical data match those reported in the literature³⁷.

[α]²⁴_D -56.77 (c 1.27, CH₂Cl₂), (Specific optical rotation of Lamellodysidine A reported previously³⁷ was measured in methanol. Due to very poor solubility of **35** in methanol, we decided to measure the optical rotation in DCM);

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.20 (dd, *J* = 8.3, 6.5 Hz, 1H), 5.81 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 5.26 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 2.66 (dddd, *J* = 6.5, 3.9, 2.5, 1.3 Hz, 1H), 2.41 – 2.35 (m, 1H), 2.30 (t, *J* = 3.9 Hz, 1H), 1.80 (td, *J* = 12.6, 4.6 Hz, 1H), 1.72 – 1.66 (m, 2H), 1.60 – 1.55 (m, 1H), 1.14 (s, 3H), 0.82 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.79 (s, 3H);

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 178.6, 135.4, 132.5, 99.6, 60.5, 57.6, 51.4, 48.7, 46.8, 39.2, 38.2, 33.1, 18.4, 17.0, 15.6;

IR (film, CH₂Cl₂) 3295, 2977, 2933, 2886, 1719, 1471 cm⁻¹;

HRMS (ESI) *m/z*: [M + Na]⁺ Calcd for C₁₅H₂₀O₃Na 271.1310; Found 271.1302.

	<i>Isolated Lamellodysidine A</i> ³⁷		<i>Synthetic Lamellodysidine A</i>	
no.	δ_c , type	δ_H , mult (J in Hz)	δ_c , type	δ_H , mult (J in Hz)
1	99.4, CH	5.24, d (3.8)	99.6, CH	5.26, d (3.9)
2	60.7, CH	2.28, d (3.8)	60.5, CH	2.30, t (3.9)
3	38.5, CH	2.64, m	38.2, CH	2.66, dddd (6.5, 3.9, 2.5, 1.3)
4	47.1, CH	1.68, m	46.8, CH	1.70, m
5	49.0, C		48.7, C	
6 α 6 β	39.4, CH ₂	1.58, m 1.79, td (12.6, 4.6)	39.2, CH ₂	1.57, m 1.80, td (12.6, 4.6)
7 α 7 β	33.4, CH ₂	1.68, m 2.38, m	33.1, CH ₂	1.70, m 2.38, m
8	57.7, C		57.6, C	
9	178.2, C		178.6, C	
10	132.5, CH	6.18, brt (8.2)	132.5, CH	6.20, dd (8.3, 6.5)
11	135.8, CH	5.80, dd (8.2, 1.0)	135.4, CH	5.81, dd (8.3, 1.3)
12	51.6, C		51.4, C	
13	15.8, CH ₃	1.14, s	15.6, CH ₃	1.14, s
14	18.6, CH ₃	0.78, s	18.4, CH ₃	0.79, s
15	17.2, CH ₃	0.81, d (7.3)	17.0, CH ₃	0.82, d (7.3)

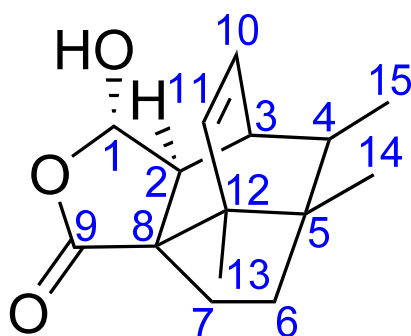


Figure S78. ¹H NMR and ¹³C NMR Data (600/150 MHz, CDCl₃) for isolated and synthetic Lamellodysidine A.

S4.3. Raw spectroscopic data.

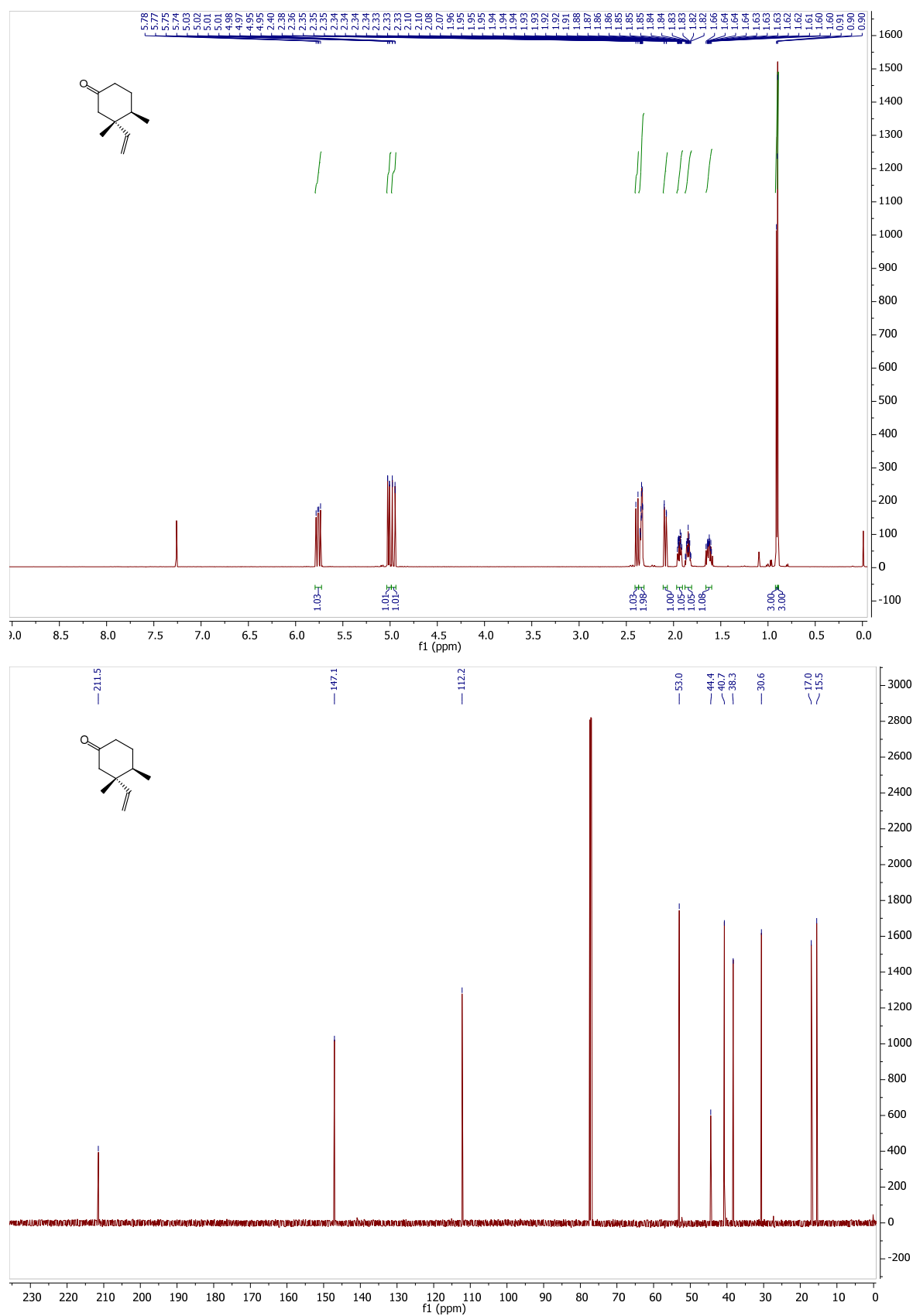


Figure S79. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound 29.

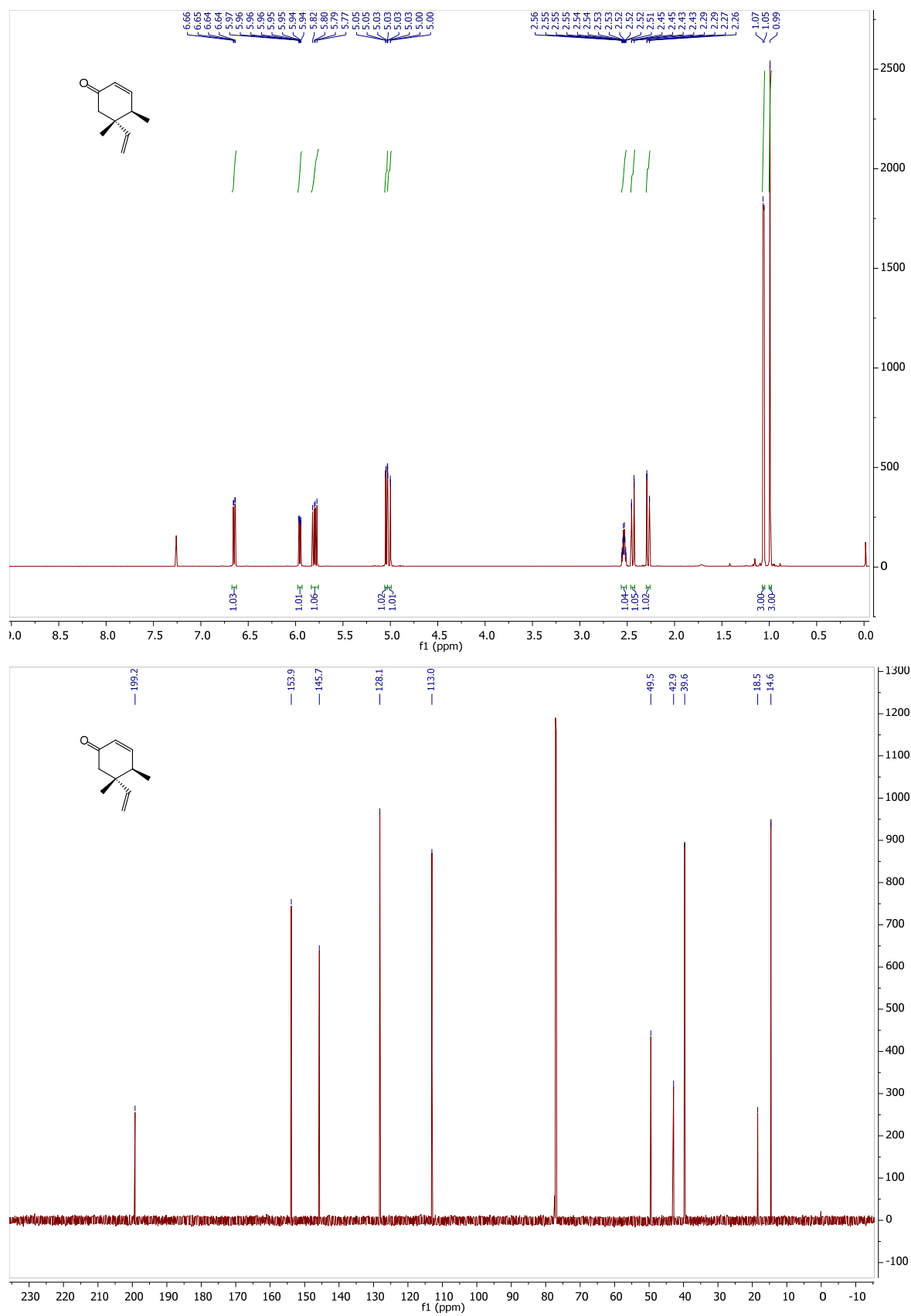


Figure S80. ^1H NMR (top) and ^{13}C NMR (bottom) spectra of compound **30**.

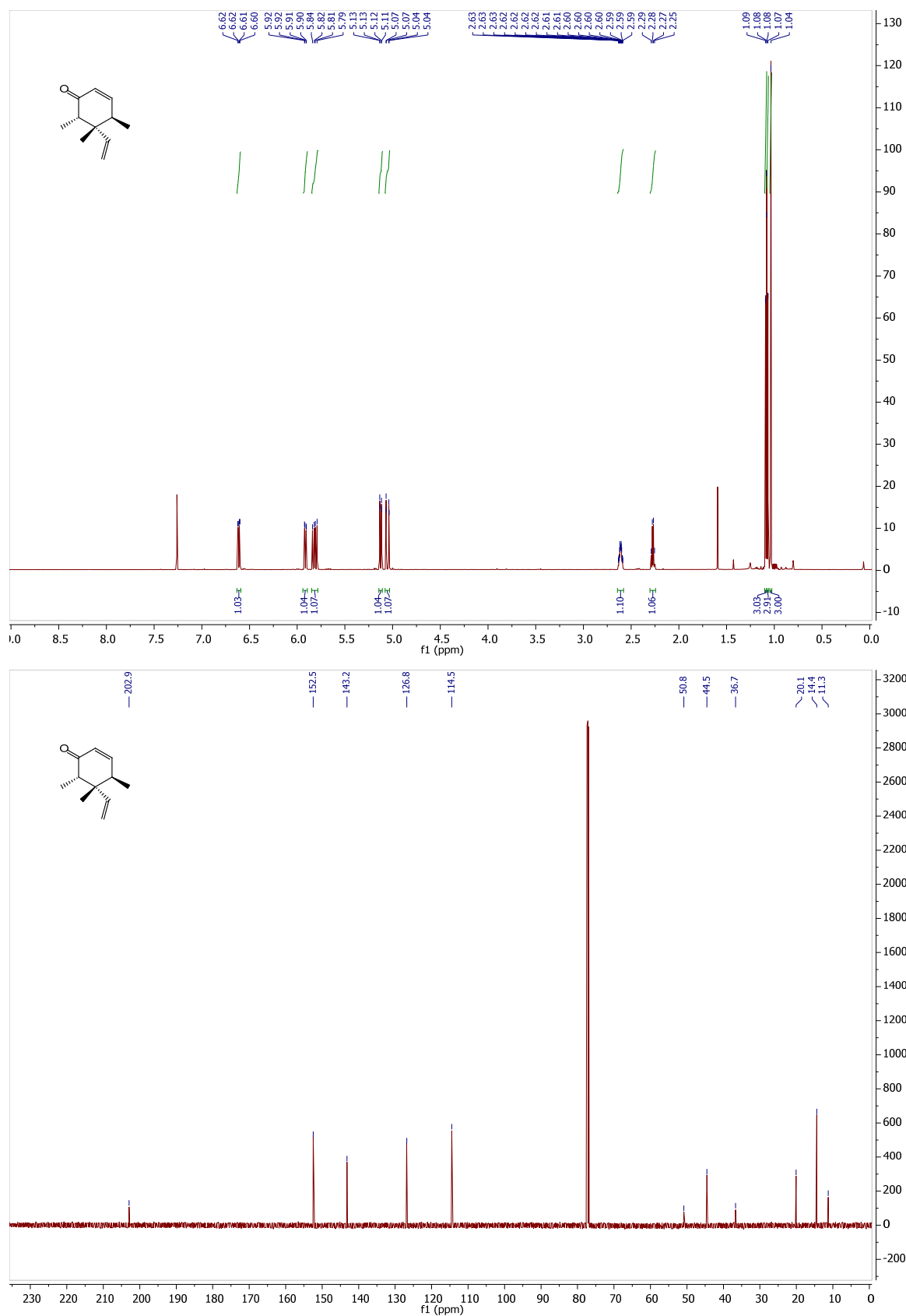


Figure S81. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound **31**.

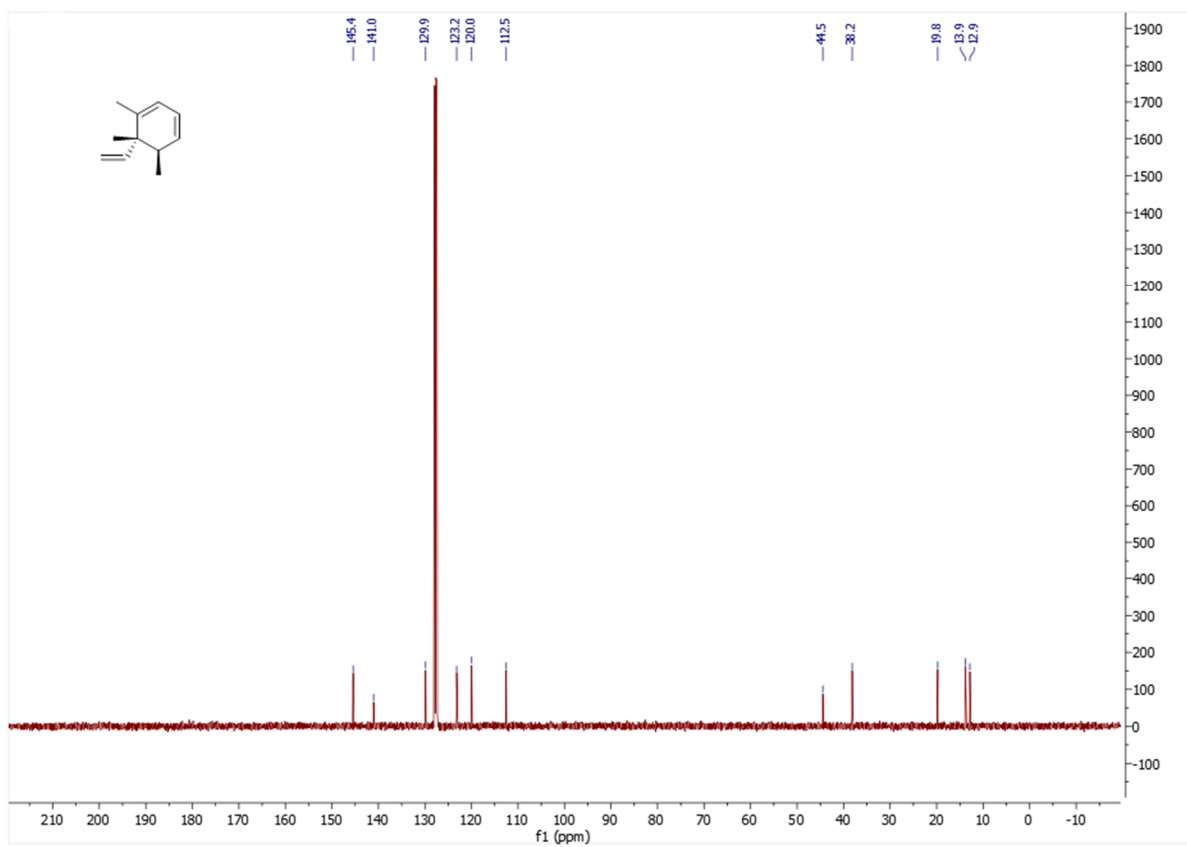
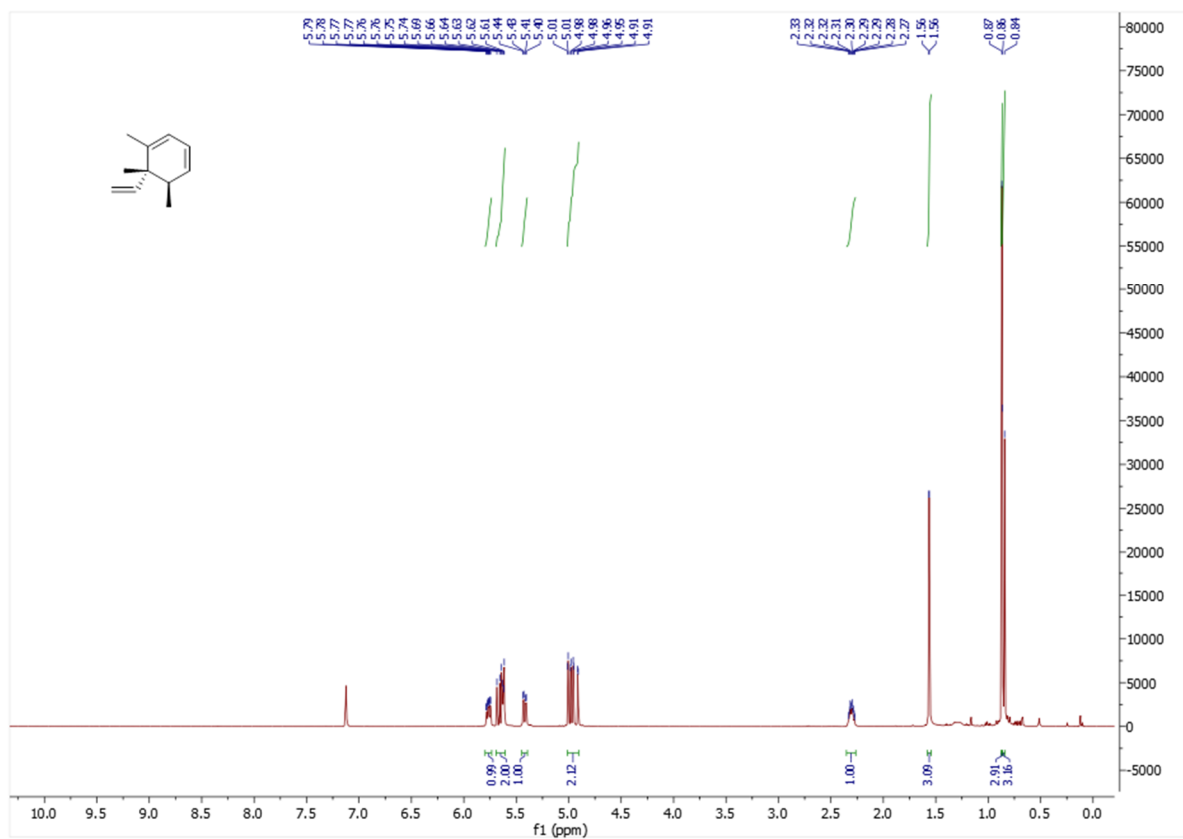


Figure S82. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound **32**.

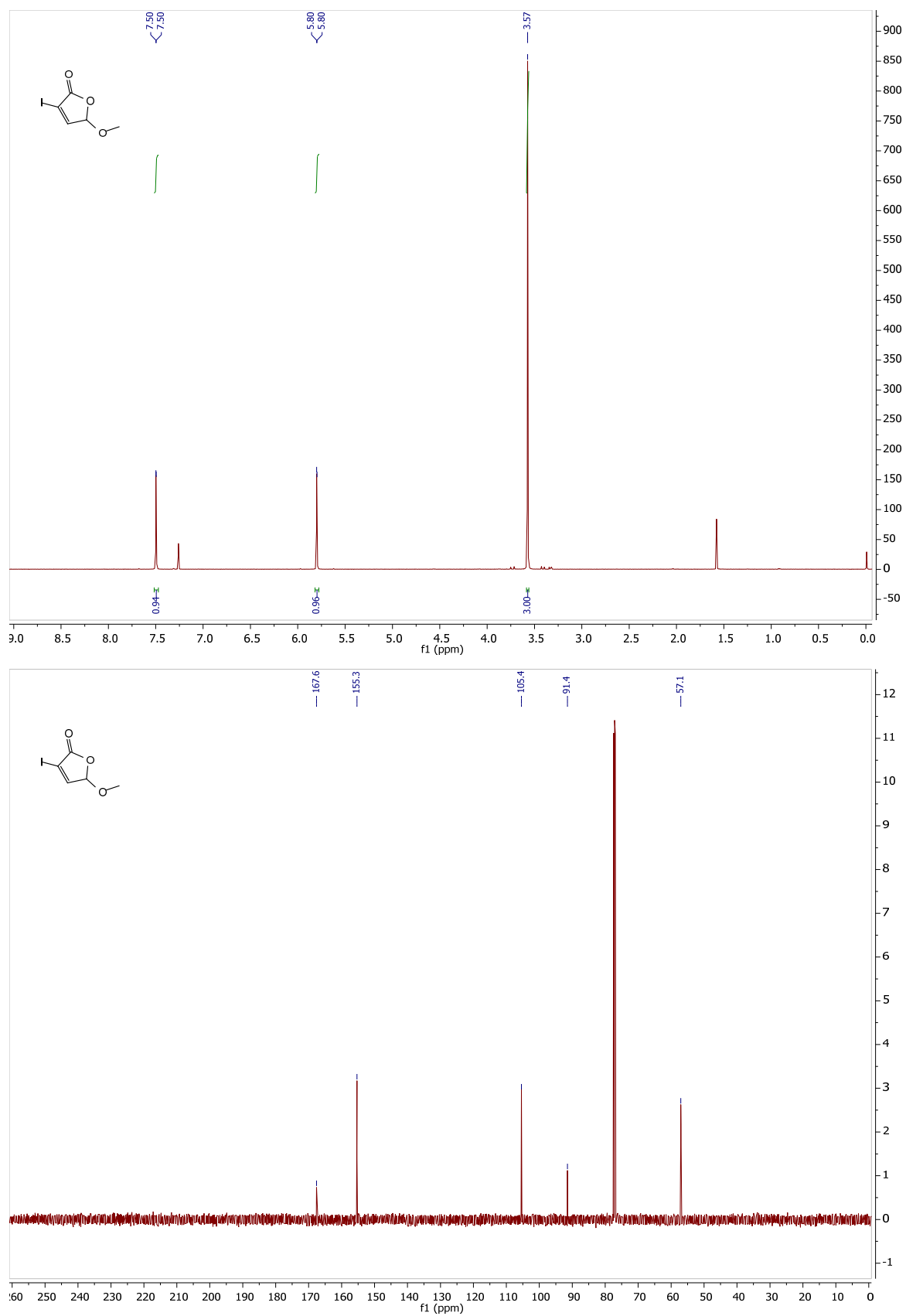


Figure S83. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound **27-I**.

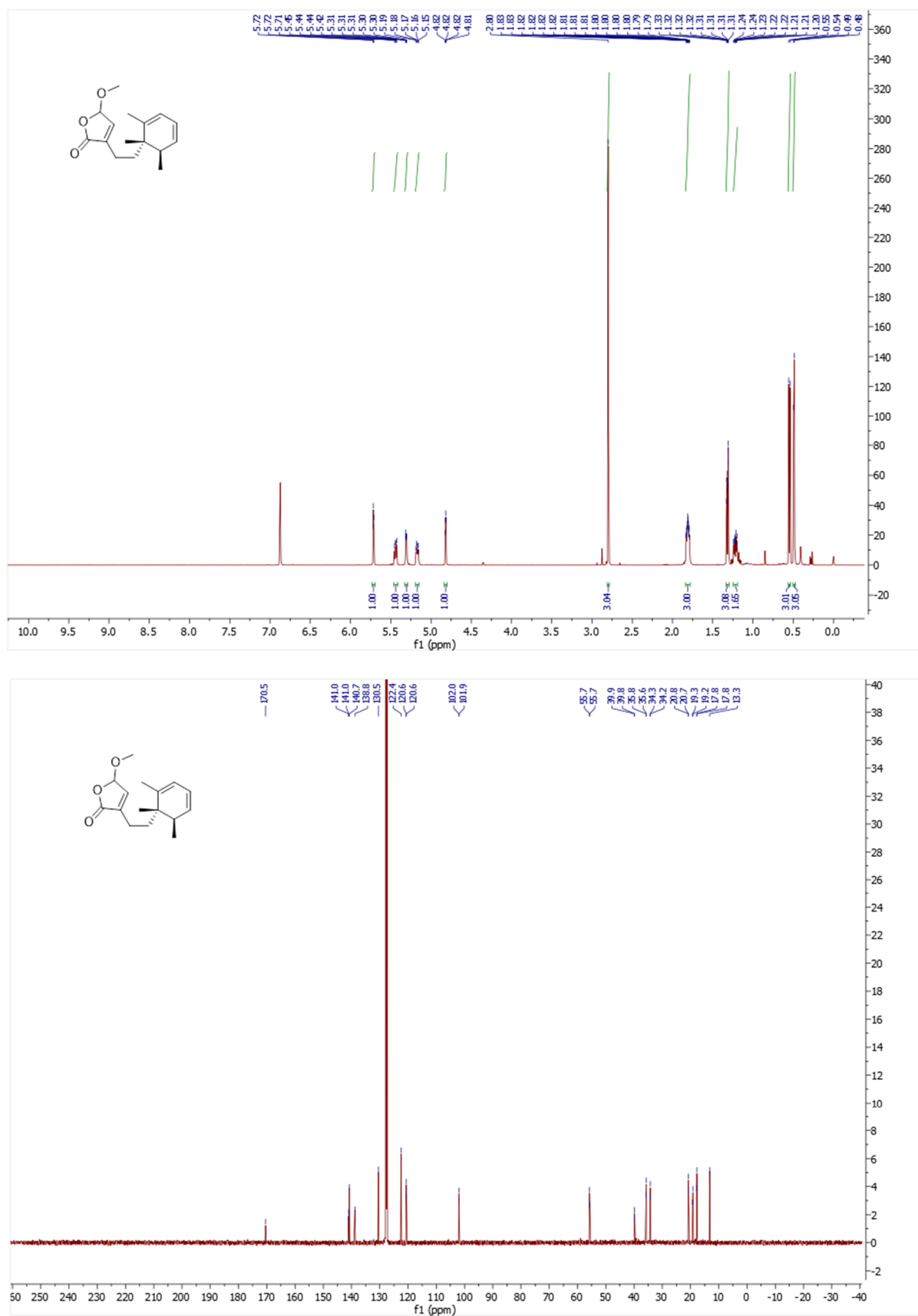


Figure S84. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of compound **33**.

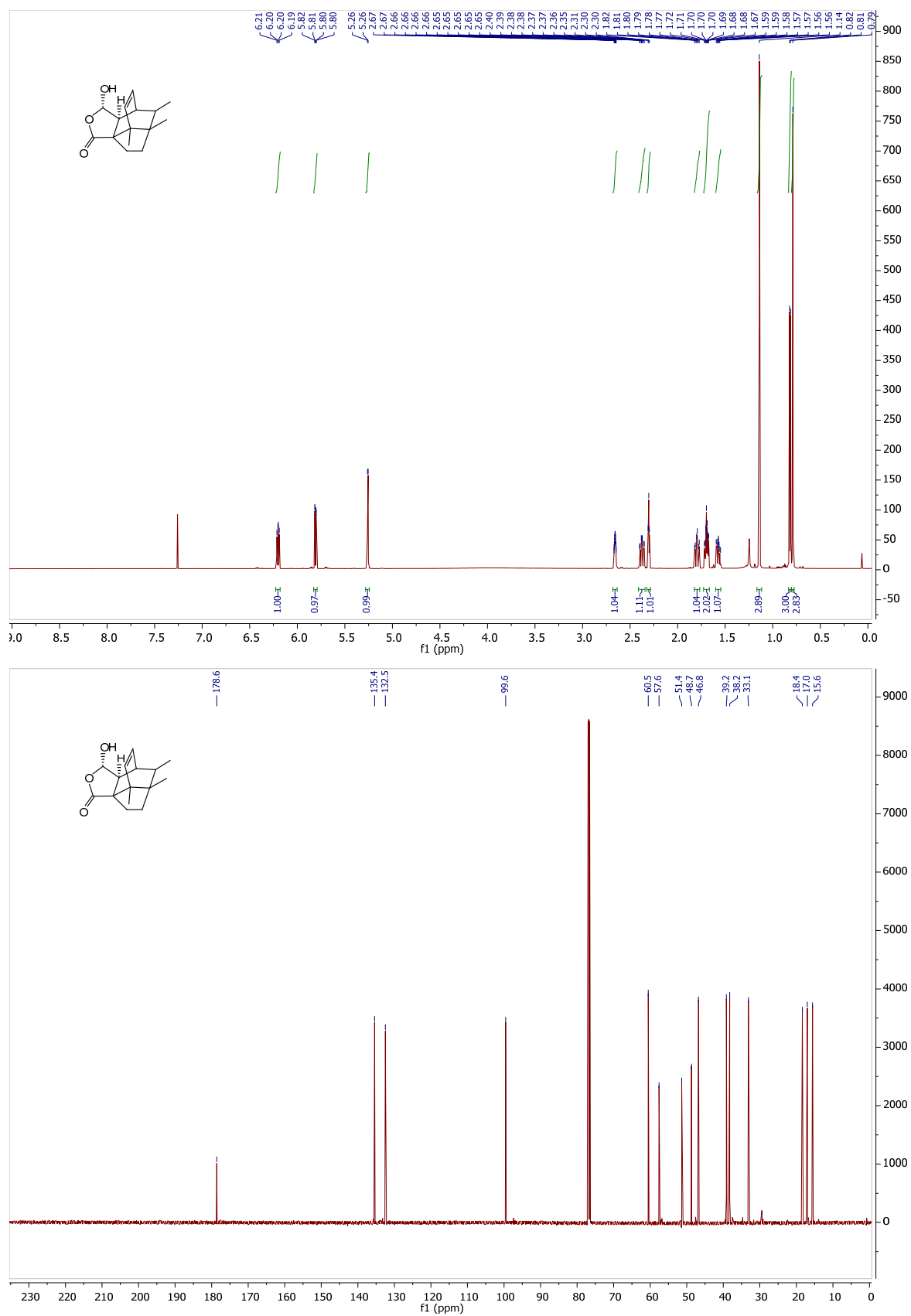


Figure S85. ^1H NMR (top) and ^{13}C NMR (bottom) spectra of compound 35.

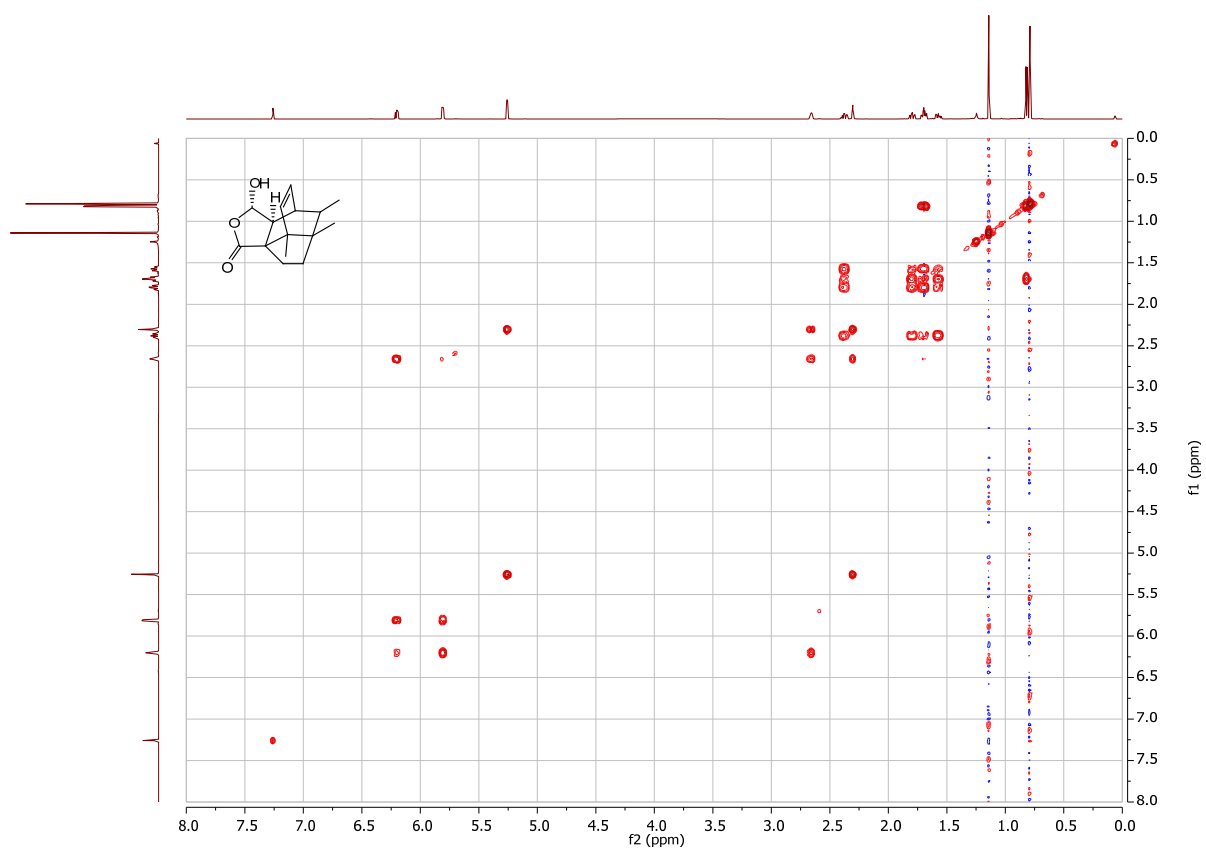


Figure S86. gCOSY spectrum of compound 35.

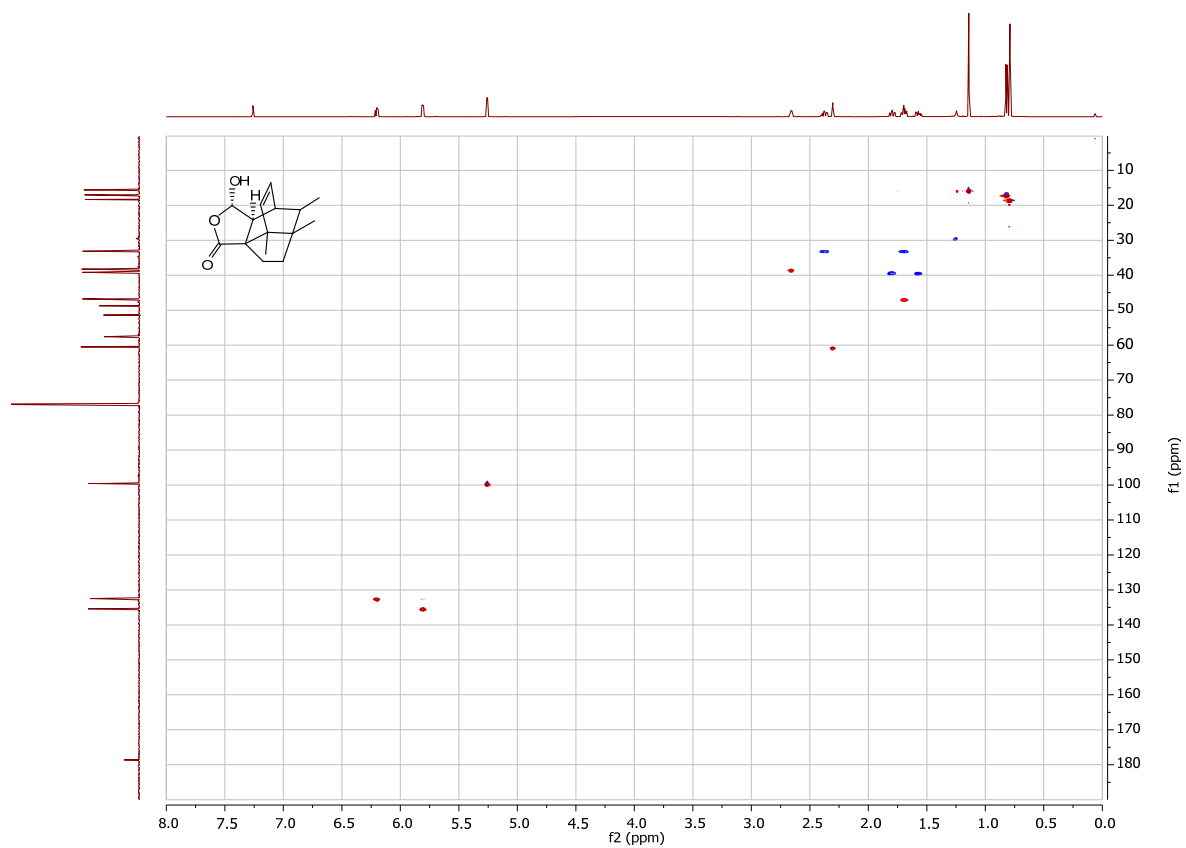


Figure S87. gHSQCAD spectrum of compound 35.

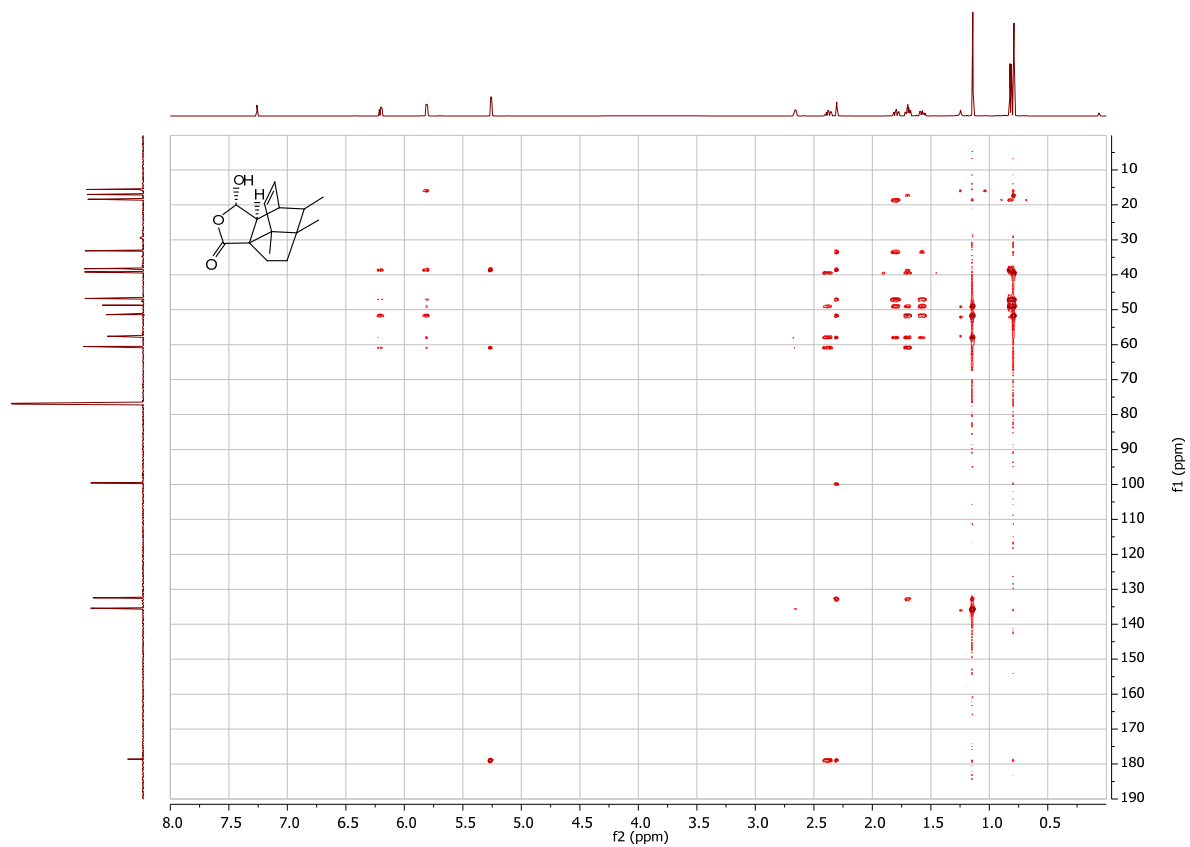


Figure S88. gHMBCAD spectrum of compound 35.

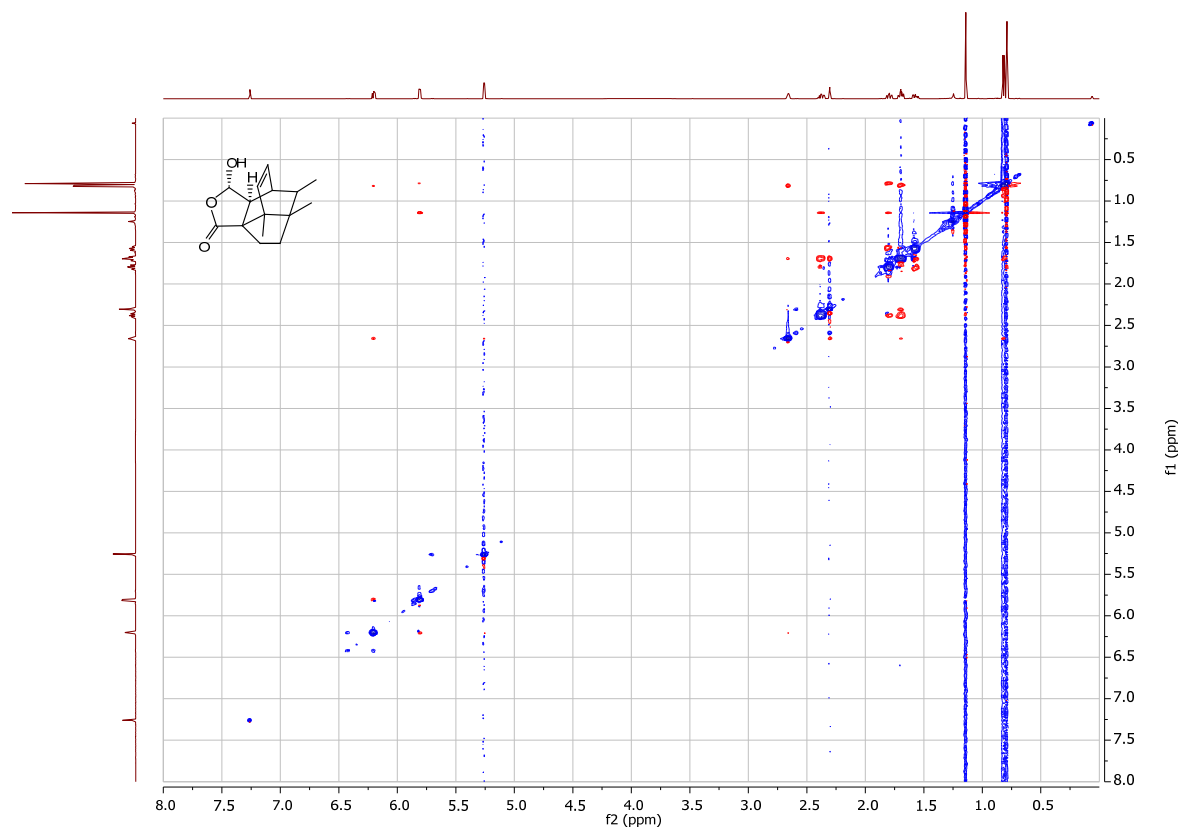


Figure S89. NOESY spectrum of compound 35.

Section S5. References

- S1. Pangborn, A. B., Giardello, M. A., Grubbs, R. H., Rosen, R. K. & Timmers, F. J. Safe and convenient procedure for solvent purification. *Organometallics* **15**, 1518–1520 (1996).
- S2. Perrin, D. D. *Purification of laboratory chemicals*. (Pergamon Press, 1988).
- S3. Maresh, J. J. *et al.* Facile one-pot synthesis of tetrahydroisoquinolines from amino acids via hypochlorite-mediated decarboxylation and Pictet–Spengler condensation. *Tetrahedron Lett.* **55**, 5047–5051 (2014).
- S4. Gremmen, C., Wanner, M. J. & Koomen, G.-J. Enantiopure tetrahydroisoquinolines via *N*-sulfinyl Pictet–Spengler reactions. *Tetrahedron Lett.* **42**, 8885–8888 (2001).
- S5. Sánchez-Obregón, R., Ortiz, B., Mastranzo, V. M., Yuste, F. & Ruano, J. L. G. Short stereoselective synthesis of (+)-crispine A via an *N*-sulfinyl Pictet–Spengler reaction. *Tetrahedron Lett.* **54**, 1893–1896 (2013).
- S6. Fukumoto, K., Ihara, M., Setsu, F., Shoda, M. & Taniguchi, N. A Total synthesis of (±)-Tacamonine (Pseudovincamone I) through radical cyclization. *Heterocycles* **37**, 289 (1994).
- S7. Ihara, M. *et al.* Asymmetric total synthesis of Tacamonine (Pseudovincamone I) via radical cyclization. *J. Org. Chem.* **59**, 5317–5323 (1994).
- S8. Lounasmaa, M., Din Belle, D. & Tolvanen, A. Total synthesis of the indole alkaloid (±)-Tacamonine. *Tetrahedron Lett.* **36**, 7141–7144 (1995).
- S9. Lounasmaa, M., Karinen, K., Din Belle, D. & Tolvanen, A. Controlled epimerization of indolo[2,3-*a*]quinolizidine derivatives: An efficient total synthesis of (±)-Tacamonine. *Tetrahedron* **54**, 157–164 (1998).
- S10. Danieli, B., Lesma, G., Maccellini, S., Passarella, D. & Silvani, A. Formal enantioselective synthesis of Tacamonine starting from asymmetric 2-substituted propane-1,3-diols. *Tetrahedron: Asymmetry* **10**, 4057–4064 (1999).
- S11. Danieli, B., Lesma, G., Passarella, D., Sacchetti, A. & Silvani, A. Stereocontrolled reduction of an oxazepinohexahydroindolo[2,3-*a*]quinolizidine derivative: asymmetric total synthesis of (+)-Tacamonine. *Tetrahedron Lett.* **42**, 7237–7240 (2001).
- S12. Ihara, M. & Suzuki, M. Short Synthesis of (±)-Tacamonine by the intramolecular double Michael reaction. *Heterocycles* **52**, 1083 (2000).
- S13. Ho, T.-L. & Gorobets, E. Synthesis of Tacamonine. *Tetrahedron* **58**, 4969–4973 (2002).
- S14. Chen, C.-Y., Chang, B.-R., Tsai, M.-R., Chang, M.-Y. & Chang, N.-C. Regioselective reduction of *N*-alkyl-3-sulfonyl glutarimides to δ -lactams. Formal synthesis of (±)-Paroxetine and (±)-Tacamonine. *Tetrahedron* **59**, 9383–9387 (2003).

- S15. Chen, C.-Y., Chang, M.-Y., Hsu, R.-T., Chen, S.-T. & Chang, N.-C. One-pot facile conversion of Baylis–Hillman adduct into *N*-alkyl 3-(*E*)-alkylidene-5-substituted sulfonylpiperidine-2,6-dione. Formal synthesis of tacamonine. *Tetrahedron Lett.* **44**, 8627–8630 (2003).
- S16. Ho, T.-L. & Lin, Q. Stereoselective synthesis of (\pm)-Tacamonine. *Tetrahedron* **64**, 10401–10405 (2008).
- S17. B. & Padwa, A. General access to the Vinca and Tacaman alkaloids using a Rh(II)-catalyzed cyclization/cycloaddition cascade. *J. Org. Chem.* **73**, 2792–2802 (2008).
- S18. Davis, F. A., Reddy, G. V., Chen, B.-C., Kumar, A. & Haque, M. S. Enantioselective synthesis of 2-methyl-2-hydroxy- γ -butyrolactone and its application in the asymmetric synthesis of Frontalin and Mevalonolactone. *J. Org. Chem.* **60**, 6148–6153 (1995).
- S19. Seebach, D., Naef, R. & Calderari, G. (α -Alkylation of α -heterosubstituted carboxylic acids without racemization. *Tetrahedron* **40**, 1313–1324 (1984).
- S20. Barnhart, R. W. *et al.* Asymmetric catalysis. Asymmetric catalytic intramolecular hydroacylation of 4-pentenals using chiral rhodium diphosphine catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1821–1830 (1994).
- S21. Leonard J., Lygo G. & Procter, G. *Advanced Practical Organic Chemistry*, 3rd ed. (CRC Press, 2013).
- S22. Taylor, M. & Jacobsen, E. N. Highly enantioselective catalytic acyl-Pictet–Spengler reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10558–10559 (2004).
- S23. Seayad, J., Seayad, A. M., & List, B. Catalytic asymmetric Pictet–Spengler reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1086–1087 (2006).
- S24. Wanner, M. J., van der Haas, R. N., de Cuba, K. R., van Maarseveen, J. H., & Hiemstra, H. Catalytic asymmetric Pictet–Spengler reactions via sulfenyliminium ions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 7485–7487 (2007).
- S25. Yamashita, T., Kawai, N., Tokuyama, H., & Fukuyama, T. Stereocontrolled total synthesis of (–)-Eudistomin C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 15038–15039 (2005).
- S26. Pradhan, P. K., Nandi, D., Pradhan, S. D., Jaisankar, P., & Giri, V. S. An unusual diastereoselective Pictet–Spengler reaction: Synthesis of novel tetrahydro- β -carboline glycosides *Synlett* **24**, 85–89 (2013).
- S27. Ducrot, P., Cherif R., & Thal, C. Synthesis of tetrahydro- β -carbolines and studies of the Pictet–Spengler reaction. *Tetrahedron* **56**, 2683–2692 (2000).

- S28. Liu, J., Nakagawa, M., & Hino, T. Liu, J., Nakagawa, M., & Hino, T. (1989). The Pictet-Spengler reaction of Nb-hydroxytryptamines and cysteinals. I. Isolation of tetracyclic intermediates and formation of optically active Nb-hydroxy-tetrahydro- β -carbolines. *Tetrahedron* **45**, 7729-7742 (1989).
- S29. Enders, D. *et al.* Enantioselective synthesis of polyfunctional small building blocks with a quaternary stereogenic center. *Chem. Ber.* **127**, 1707–1721 (1994).
- S30. Job, A., Janeck, C. F., Bettray, W., Peters, R. & Enders, D. The SAMP-/RAMP-hydrazone methodology in asymmetric synthesis. *Tetrahedron* **58**, 2253–2329 (2002).
- S31. Kolb, H. C., VanNieuwenhze, M. S. & Sharpless, K. B. Catalytic asymmetric dihydroxylation. *Chem. Rev.* **94**, 2483–2547 (1994).
- S32. Blank, N. & Opatz, T. Enantioselective synthesis of tetrahydroprotoberberines and bisbenzylisoquinoline alkaloids from a deprotonated α -aminonitrile. *J. Org. Chem.* **76**, 9777–9784 (2011).
- S33. Cheng, L., Liu, L., Sui, Y., Wang, D. & Chen, Y.-J. Highly diastereoselective reactions of 2-lithiated indoles with chiral *N*-tert-butanefulfinyl aldimines for the synthesis of chiral (2-indolyl) methanamine derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* **18**, 1833–1843 (2007).
- S34. Pablo, Ó., Guijarro, D. & Yus, M. Synthesis of nitrogenated heterocycles by asymmetric transfer hydrogenation of *N*-(tert-butylsulfinyl)haloimines. *J. Org. Chem.* **78**, 9181–9189 (2013).
- S35. Herbert, J. M. & Maggiani, M. Generation and reactivity of 1,2-dilithioindole. *Synth. Commun.* **31**, 947–951 (2001).
- S36. Hirose, T. *et al.* Structure determination and total synthesis of (+)-16-Hydroxy-16,22-dihydroapparicine. *Chem. - A Eur. J.* **19**, 10741–10750 (2013).
- S37. Lelais, G., Campo, M. A., Kopp, S. & Seebach, D. Enantioselective preparation of β -amino acids with aspartate, glutamate, asparagine, and glutamine side chains. *Helv. Chim. Acta* **87**, 1545–1560 (2004).
- S38. Fuller, P. H. & Chemler, S. R. Copper(II) carboxylate-promoted intramolecular carboamination of alkenes for the synthesis of polycyclic lactams. *Org. Lett.* **9**, 5477–5480 (2007).
- S39. Piers, E., Harrison, C. L. & Zetina-Rocha, C. Intramolecular conjugate addition of alkenyl and aryl functions to enones initiated by lithium–iodine exchange. *Org. Lett.* **3**, 3245–3247 (2001).
- S40. Deiters, A., Pettersson, M. & Martin, S. F. General strategy for the syntheses of Corynanthe, Tacaman, and oxindole alkaloids. *J. Org. Chem.* **71**, 6547–6561 (2006).

- S41. Wang, H. *et al.* Enantioselective synthesis of (–)-Acetylpoaranotin. *Org. Lett.* **19**, 1698–1701 (2017).
- S42. Krafft, M. & Cran, J. A Convenient protocol for the α -iodination of α,β -unsaturated carbonyl compounds with I₂ in an aqueous medium. *Synlett* **2005**, 1263–1266 (2005).
- S43. Moradei, O. M. & Paquette, L. A. (5*S*)-(d-Menthyloxy)-2(5*H*)-furanone. in *Organic Syntheses* 66–74 (John Wiley & Sons, Inc., 2003).
- S44. Feringa, B. L. & De Lange, B. Asymmetric 1,4-additions to 5-alkoxy-2(5*H*)-furanones. *Tetrahedron* **44**, 7213–7222 (1988).
- S45. Humphrey, J. M., Aggen, J. B. & Chamberlin, A. R. Total synthesis of the serine-threonine phosphatase inhibitor Microcystin-LA. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11759–11770 (1996).
- S46. Ishibashi, F., Park, S., Kusano, T. & Kuwano, K. Synthesis and algicidal activity of (+)-Cyanobacterin and its stereoisomer. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 391–396 (2005).

The international journal of science / 1 October 2020

nature

IN A SPIN

Concentric liquid reactors simplify multistep chemical processes

Coronavirus

Could your voice help diagnose whether you have COVID-19?

Climate change

Greenland ice sheet's rate of loss set to hit historic high

Feeling detached

Localized neural rhythm linked to dissociated state of consciousness

Vol. 586, No. 7827
nature.com

Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2768-9>

Received: 28 September 2019

Accepted: 12 August 2020

Published online: 30 September 2020

 Check for updates

Olgierd Cybulski^{1,5}, Mirosław Dygas^{1,3,5}, Barbara Mikulak-Klucznik^{1,3}, Marta Siek¹, Tomasz Klucznik^{1,3}, Seong Yeol Choi⁴, Robert J. Mitchell⁴, Yaroslav I. Sobolev¹ & Bartosz A. Grzybowski^{1,2,3}✉

Recent years have witnessed increased interest in systems that are capable of supporting multistep chemical processes without the need for manual handling of intermediates. These systems have been based either on collections of batch reactors¹ or on flow-chemistry designs^{2–4}, both of which require considerable engineering effort to set up and control. Here we develop an out-of-equilibrium system in which different reaction zones self-organize into a geometry that can dictate the progress of an entire process sequence. Multiple (routinely around 10, and in some cases more than 20) immiscible or pairwise-immiscible liquids of different densities are placed into a rotating container, in which they experience a centrifugal force that dominates over surface tension. As a result, the liquids organize into concentric layers, with thicknesses as low as 150 micrometres and theoretically reaching tens of micrometres. The layers are robust, yet can be internally mixed by accelerating or decelerating the rotation, and each layer can be individually addressed, enabling the addition, sampling or even withdrawal of entire layers during rotation. These features are combined in proof-of-concept experiments that demonstrate, for example, multistep syntheses of small molecules of medicinal interest, simultaneous acid–base extractions, and selective separations from complex mixtures mediated by chemical shuttles. We propose that ‘wall-less’ concentric liquid reactors could become a useful addition to the toolbox of process chemistry at small to medium scales and, in a broader context, illustrate the advantages of transplanting material and/or chemical systems from traditional, static settings into a rotating frame of reference.

The inspiration for our research comes from the so-called density columns^{5–8} in which immiscible or pairwise-immiscible liquids stack up vertically—if such a multilayered column contained different reagents in different layers, it could potentially drive a multistep reaction of chemicals migrating through it. In practice, however, static stacks are easily destabilized by capillary forces or by small mechanical disturbances, so the layers must be thick and cannot be internally mixed to speed up transport. Both of these limitations result in very long reagent diffusion times, and thus render the idea impractical.

To avoid such problems, we prepared the stacks not in a static column but in a rotating cylindrical container. In the basic design in Fig. 1a, the container is mounted on a vertically aligned shaft of an electric motor. Without rotation the liquids are layered horizontally, with the densest liquid (transparent Fluorinert FC-40) at the bottom. When the container starts to rotate, the liquids adopt slanted profiles with increasing slopes, and ultimately—at the highest rotational speed ($\omega_c \approx 2,600$ rpm)—assume a concentric-layer configuration in which FC-40 forms the outermost ring and the central portion of the container is occupied by air (for theoretical details of layer evolution,

see Supplementary Information section 4 and Supplementary Video 8).

Liquids can be added to an already-rotating stack by simply dispensing them either near the centre of rotation or via a system of channels embedded in the bottom surface of the container (Fig. 1b, c, Supplementary Videos 1, 2). Notably, when the addition of different liquids is sequential, not only all-immiscible but also pairwise-immiscible liquids can be stacked up: with adequate control of liquid addition, stable stacks comprising more than 20 layers can be assembled (Fig. 1d–f). By using channels of different geometries, it is also possible to modify desired, individual layers within the stack: by injecting additional components, drawing small-volume samples, or even removing an entire layer out of the rotating stack (see Supplementary Figs. 1–4, Supplementary Videos 2, 7).

At constant rotational speed and with the liquids subject to rigid-body rotation, the transport processes across each layer are purely diffusive and are therefore slow. A considerably more rapid transport and efficient mixing within (Fig. 2a, b) and between (Fig. 2c) the layers can be achieved—within seconds—by periodically decelerating and

¹IBS Center for Soft and Living Matter, Ulsan National Institute of Science and Technology, Ulsan, Republic of Korea. ²Department of Chemistry, Ulsan National Institute of Science and Technology, Ulsan, Republic of Korea. ³Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland. ⁴Division of Biological Sciences, School of Life Sciences, Ulsan National Institute of Science and Technology, Ulsan, Republic of Korea. ⁵These authors contributed equally: Olgierd Cybulski, Mirosław Dygas. ✉e-mail: nanogrybowski@gmail.com

Supplementary information

Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation

In the format provided by the authors and unedited

Data availability

All data that support the findings of this study are available within the Article and its Supplementary Information, or from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements This research was supported by the Institute for Basic Science, Korea (project code IBS-R020-D1). B.M.-K. and T.K. were also supported by the National Science Center, NCN, Poland under the Symfonia Award (number 2014/12/W/ST5/O0592). M.D. acknowledges partial support from the National Science Center, NCN, Poland under the Maestro Award (number 2018/30/A/ST5/O0529).

Author contributions O.C. designed the rotors and performed most of the experiments. M.D. performed the syntheses of small molecules described in Fig. 3. B.M.-K. and T.K. performed

the separations and extractions described in Fig. 4. O.C. and M.S. performed the nanoseparations described in Fig. 5. O.C., S.Y.C. and R.J.M. performed experiments with bacteria. O.C. and Y.I.S. developed theoretical models. B.A.G. conceived the project, supervised the research and wrote the paper with help from the other authors.

Competing interests A patent covering the layered liquid reactors described in this work (number WO2020/153739) has been filed by the Institute of Basic Science, Republic of Korea, listing O.C., M.D., B.M.-K., Y.I.S. and B.A.G. as inventors.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2768-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to B.A.G.

Peer review information *Nature* thanks Panagiota Angeli, Jon Clardy and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permissions information is available at <http://www.nature.com/reprints>.

Supplementary Information for “Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation.”

Olgierd Cybulski^{1†}, Mirosław Dygas^{1,3†}, Barbara Mikulak-Klucznik^{1,3}, Marta Siek¹, Tomasz Klucznik^{1,3}, Seong Yeol Choi⁴, Robert J. Mitchell⁴, Yaroslav I. Sobolev¹ & Bartosz A. Grzybowski^{1,2,3*}

¹ IBS Center for Soft and Living Matter, Ulsan National Institute of Science and Technology, 50 UNIST-gil, Ulsan 44919, Republic of Korea

² Department of Chemistry, Ulsan National Institute of Science and Technology, 50 UNIST-gil, Ulsan 44919, Republic of Korea.

³ Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences ul. Kasprzaka 44/52, 01-224, Warsaw, Poland.

⁴ Division of Biological Sciences, School of Life Sciences, Ulsan National Institute of Science and Technology, 50 UNIST-gil, Ulsan 44919, Republic of Korea.

† Authors contributed equally

* Correspondence to nanogrzybowski@gmail.com

TABLE OF CONTENTS:

Section S1. System’s components and setup.

Section S2. Additional examples of advanced operations on existing layers.

Section S3. Internal flows and further details of mixing within thin layers.

Section S4. System’s stability and scalability.

S4.1 Practical consideration for the preparation of stacks comprised of large numbers of layers.

S4.2 Minimal thickness of a stable layer.

S4.3 Scalability considerations.

S4.3.1 Dynamic stability of concentric fluid layers in steady-rotation regime.

S4.3.2. Behavior of fluid layers during acceleration-deceleration cycles used for mixing.

S4.3.3. Mechanical challenges associated with increasing system’s dimensions.

S4.3.4. Theoretical considerations for liquid layers in axially elongated rotating tubes.

S4.3.5. Experiments with rotating tubes.

Section S5. Synthetic and spectroscopic details.

S5.1 Materials and equipment.

S5.2. Three-phase synthesis of 1,4-phenylene-diacrylic acid dimethyl ester (main-text Figures 3a-c).

S5.3. Three-phase, three-step synthesis of *N*-(4-ethoxyphenyl)acetamide (phenacetin; main-text Figure 3d).

S5.4. Four-phase, four-step synthesis of 4-(2,2-dichloro-*N*-methylacetamido)phenyl furan-2-carboxylate (diloxanide furoate; main-text Figure 3e).

S5.5. An unsuccessful three-phase synthesis of aripiprazole.

S5.6. Simultaneous acid/base separation of a quinine 4-nitrobenzoate salt (main-text Figure 4a).

S5.7 Selective extraction of phenylalanine from a fermentation-like broth (main-text Figure 4b).

S5.8 Selective extraction of phenylalanine from a complex, 11-component mixture.

S5.9. Synthesis of fluorescent silver nanoclusters and their three-layer phase transfer (to accompany main-text Figure 5a-f).

Section S6. Details of experiments with bacteria.

S6.1. The use of rotors in bacterial extractions and communication.

S6.2. Bacterial strains and growth.

S6.3. Construction of the AHL-producing plasmid.

S6.4. Toxicity tests of oils and weighing agents.

S6.5. Assessment of viability of bacteria grown in a rotating multilayer system.

S6.6. Efficiency of extraction of violacein from living bacteria.

Section S7. Captions to supplementary movies.

Section S8. Supplementary references.

Section S1. System's components and setup.

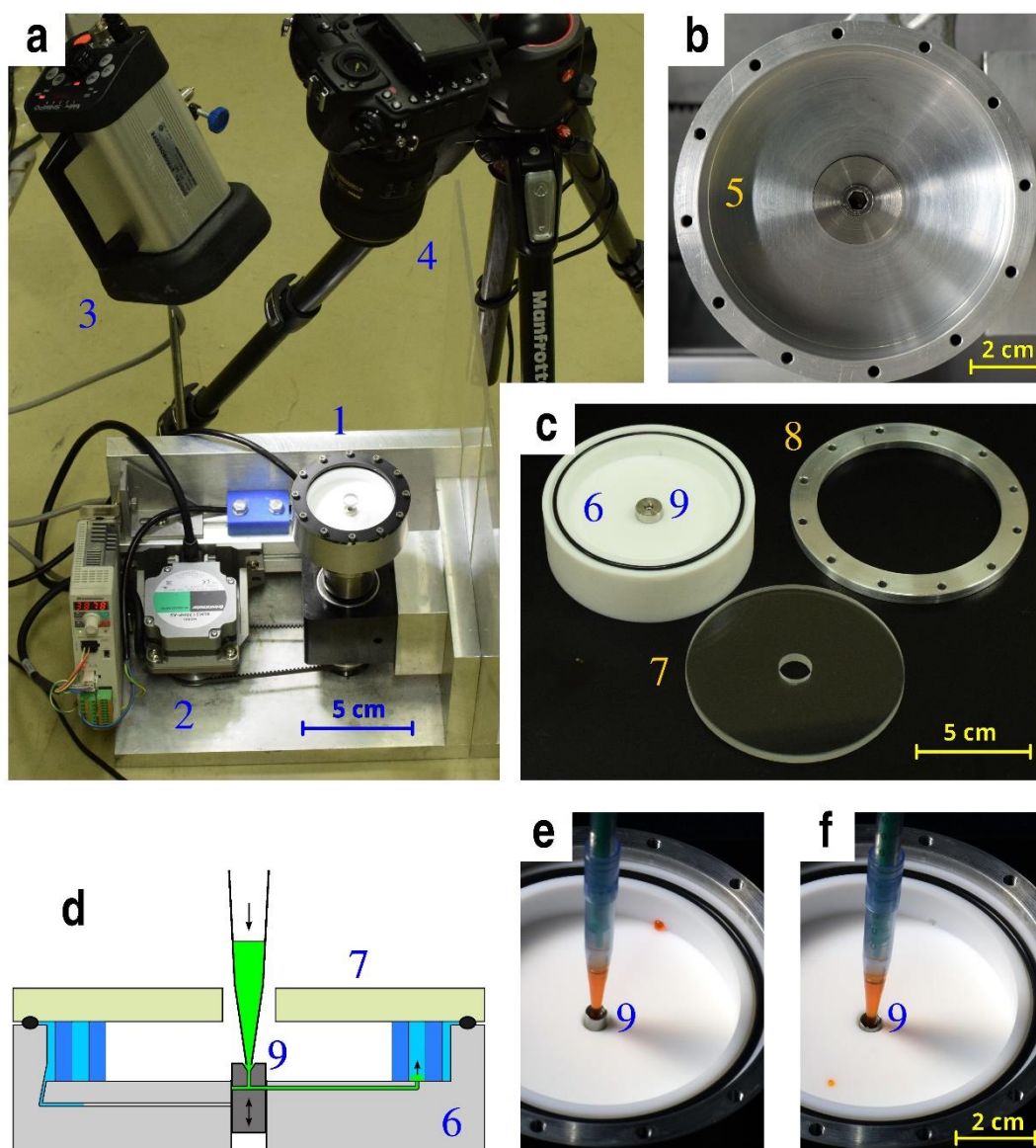


Figure S1. Details of a generic system enabling chemical reactions in multilayered liquids. **a**, Photograph of the system: rotating chamber (1) driven by brushless motor (2) is illuminated by stroboscope (3) in the field of view of a camera (4). In most experiments, the frame rate of the camera, pulses of light from a stroboscopic lamp, and rotational speed of the chamber are synchronized at frequencies 25, 30, 50, 60, 75 or 90 Hz, providing stationary views of the rotating assembly for one of standard frame rates of the camera (25, 30, 50 or 60 f.p.s.). The chamber consists of **b**, an aluminum rotor (5), to which **c**, replaceable insets made of Teflon (6) are tightly inserted, sealed with a NBR O-ring against quartz lid (7), and compressed together with an aluminum ring (8). Internal dimensions of the cavity in the Teflon inset (6) ranged, depending on the rotor, from 70 to 75 mm (diameter) and 10 to 15 mm (height). Materials of the chamber intended for permanent contact with liquids (i.e., Teflon inset, quartz lid) are highly resistant to harsh chemicals. Additionally, the quartz lid (7) is silanized with vapor-deposited 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyltrichlorosilane to prevent wetting by water phases and to match contact angles of liquids with the bottom surface of the chamber (i.e., with Teflon). In the middle of the insert (6) there is a stainless steel mandrel (9) with coaxial port, connected (via

channels drilled inside of the Teflon insert) with small holes (0.3 to 1.5 mm diameter) in the floor or side walls of the internal cavity of the Teflon inset. These ports are used for injecting liquid into (or removing from) a preselected layer inside the rotating chamber. **d**, If two points of access (including the central port, and direct access to the innermost layer through the opening in the lid (7)) are not sufficient, additional channels and corresponding holes at different radial positions may be selected by shifting the mandrel (9) along the axis of rotation – in this way the central port may be dynamically reconnected between two (as shown in the schematics) or more channels without stopping the rotor. Undercuts in the side wall of the chamber, as well as inclination of drilling angle of the channel accessing most external layer, facilitate redrawing its whole volume when liquid is collected from the rotor. **e** and **f**, Accessing two different radial positions by pushing the mandrel (9) deeper into the rotor. See **Figure S2** for demonstration of this modality in a rotating multilayer system.

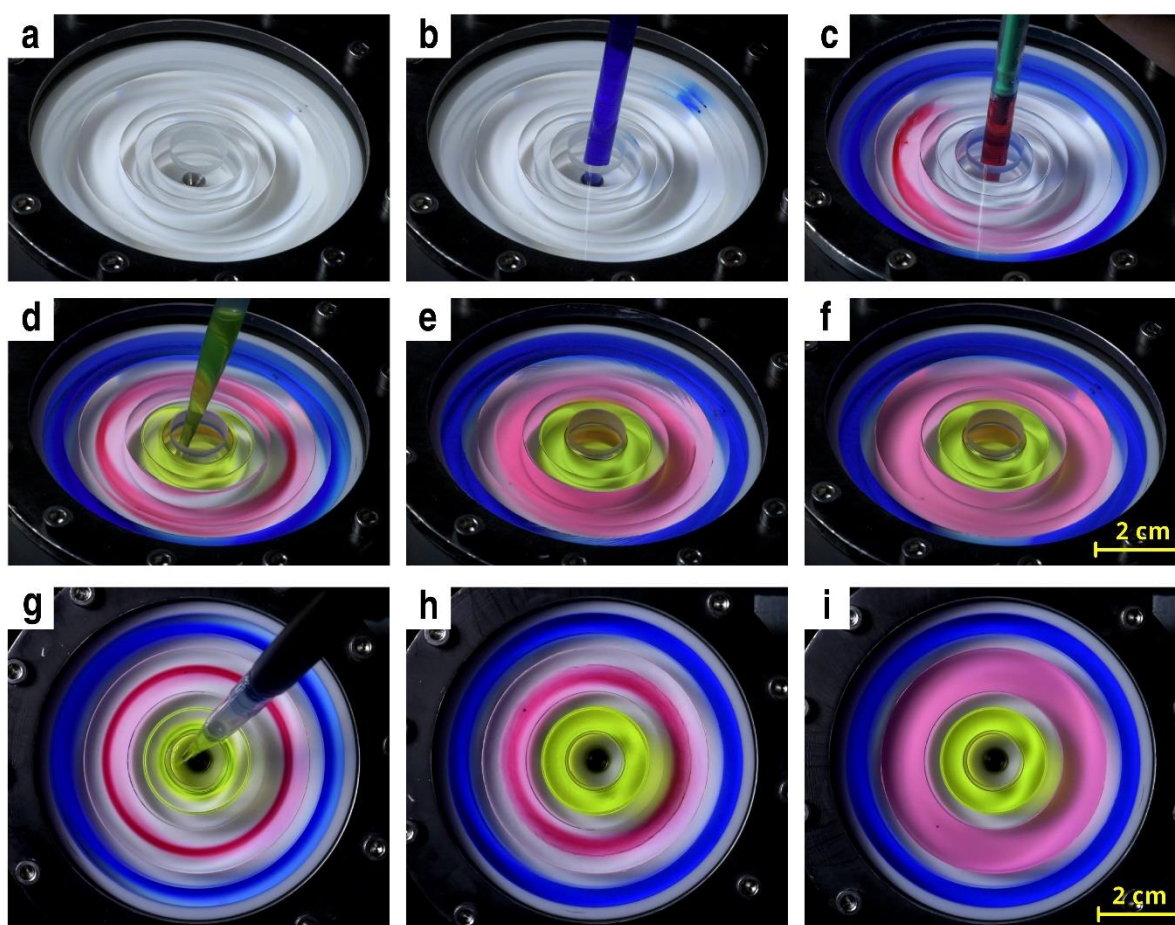


Figure S2. Demonstration of a multilayer system with three points of access. **a**, Initially, the chamber (shown in **Figure S1d-f**, with diameter 75 mm and height 13 mm) is filled with six liquid layers injected by the opening in the center of the lid. From the densest (outermost, introduced as the first one) these layers are: **1**: dibromomethane (DBM), **2**: CsCl in water (64% w/w), **3**: tetrachloroethylene (TCE), **4**: 1,2-dichlorobenzene (DCB), **5**: water, and **6**: toluene. Note that TCE and DCB are mutually miscible, thus layers **3** and **4** form continuous density gradient, gradually smoothed by diffusion. **b**, Addition of a blue dye (Sudan Blue II) in DBM/chloroform 5:1 v/v to layer **1** by central port connected to a hole in the chamber's side wall (as in **Figure S1e**). Since the added solution is less dense than DBM (but still denser than CsCl brine in layer **2**), it tends to surround the inner boundary of layer **1**, leaving the outermost region transparent (note that in the image, visibility of the dyed regions is also affected by angle

of incidence of light from the stroboscopic lamp). **c**, The same central port has been reconnected to 0.3 mm hole in the floor of the chamber (akin to **Figure S1f**) and is now used for adding mixture of TCE and DCB (1:1 v/v) dyed with Oil Red EGN into the zone between layers **3** and **4**. Although miscible with both of these layers, the red dyed zone remains in the middle. **d**, Quinoline yellow in toluene/hexane (5:1 v/v) is injected directly to the opening in the center of the lid – i.e. in the same way as used for the creation of multilayer assembly from (**a**). As the lightest liquid in the system, the yellow solution remains close to the inner boundary of layer **6**. **e**, After 8 seconds of mixing (two 4-second cycles in which rotational speed, ω_c , varies from 1500 to 2250 and back to 1500 rpm), layers **1** and **6** are virtually homogenized, while more voluminous layers **3** and **4** required approximately a minute (15 cycles) to reach the **f**, “well mixed state”. Note that there are no traces of cross-contamination between layers which are separated by at least one immiscible layer – i.e., from **1** to **3/4** and from **3/4** to **6**. **g-i** show top views of the same system at instances of time roughly corresponding to (**d**), (**e**) and (**f**). Light strikes from upper the left corner of the photographs (~ 10 o’clock), therefore the best correspondence between distribution of colors in pictures and actual distribution of dyes is achieved at 1 and 7 o’clock.

Section S2. Additional examples of advanced operations on existing layers.

Preparing layers of mutually immiscible liquids does not have to be limited to sequential loading. Thanks to the access to internal layers by channels in the floor of the chamber, we can modify the existing layer(s) in order to create a new layer between them or even in the middle of an existing layer. One of such operations was already shown in the main text **Figure 5a-f** – the new layer was created as a result of phase separation ongoing within an existing layer. Yet another way of introducing new layers is shown in **Figure S3** and **Movies S5, S6, and S7** (the **Movie S7** correspond one-to-one to subsequent panels of **Figure S3** and its continuation in **Figure S4**). First, an initial single-phase layer is differentiated by heavier or lighter admixtures in order to create continuous density gradient. **Figure S3a** shows such a gradient prepared by sequential injection of specified volumes of mutually miscible organic solutions with three different densities: 2.47, 1.72 and 0.97 g/mL. Due to the flows created during the deposition (by pipetting on the floor of rotating chamber) and later due to diffusion, these liquids partially intermix, creating a smooth density gradient with two zones of gradually decreasing density. Therefore, when water phases of densities 2.1 and 1.35 g/mL are slowly injected through the hole in the floor of the chamber (**Figures S3b** and **S3c**, correspondingly), they form two clouds of droplets localized in zones of matching density. The droplets slowly coalesce (**Figures S3c** and **d**) but do not form full layers, so that mutual diffusion of lighter and heavier organic solvents is not stopped and may lead to further degradation of the layers. However, thirteen-fold increase of the centrifugal acceleration (by slowly changing the rotational speed from 1500 to 5400 rpm) transforms the clouds of droplets into fully closed rings, as seen in **Figure S3e**. The smoothed density gradients, however, remain unchanged, so that some droplets of intermediate density (created when lighter water phase started to flow through a channel occupied by remainders of the heavier one) hang in the middle of organic layer, at points of the density gradient matching the composition of the droplets. In order to make these droplets join one of two full water phase rings we need to equalize the continuous density gradient, i.e. homogenize the content within each organic layer – we do so by performing a series of mixing cycles, as described in **Section S3** and main-text **Figure 2**. The result of this procedure is shown in **Figure S3f**. The obtained five-layer two-phase system does not differ from systems created by sequential loading of alternating water and organic phases and it can be subjected to further modifications similar to those demonstrated in **Figures S2, S6** and main text **Figure 2a** – as an example, we present addition (**Figure S4a-c** and **Movie S7**), mixing (**S4d-e** and **Movie S7**), and drawing a sample (**S4f**) of liquid from the middle layer (3 of 5) of the same liquid assembly. All these operations preserve the integrity of layers and do not lead to any visible cross-contamination of layers (in particular, layers **1** and **5** remain clear despite of large concentration of dyes in layer **3**, from which they are separated only by thin water-phase layers **2** and **4**).

Another demonstration of adding a new, immiscible layer in the middle of an existing layer is shown in **Movie S5**. In contrast to **Figure S3**, the steepest zone of the continuous density gradient of the organic phase is located at the same radial position as the hole in the floor of the chamber, from which the new water phase is introduced. For this reason, instead of small droplets, this water phase collects itself into larger lobes or flakes, spaced along the zone by currents driven by Coriolis force. For comparison, **Movie S6** demonstrates a related experiment in which the added liquid has the same density and viscosity as in **Movie S5**, yet is miscible with the neighboring liquids so that the introduced ring slowly fades away due to diffusion (shown, after 20 minutes, at the end of **Movie S6**).

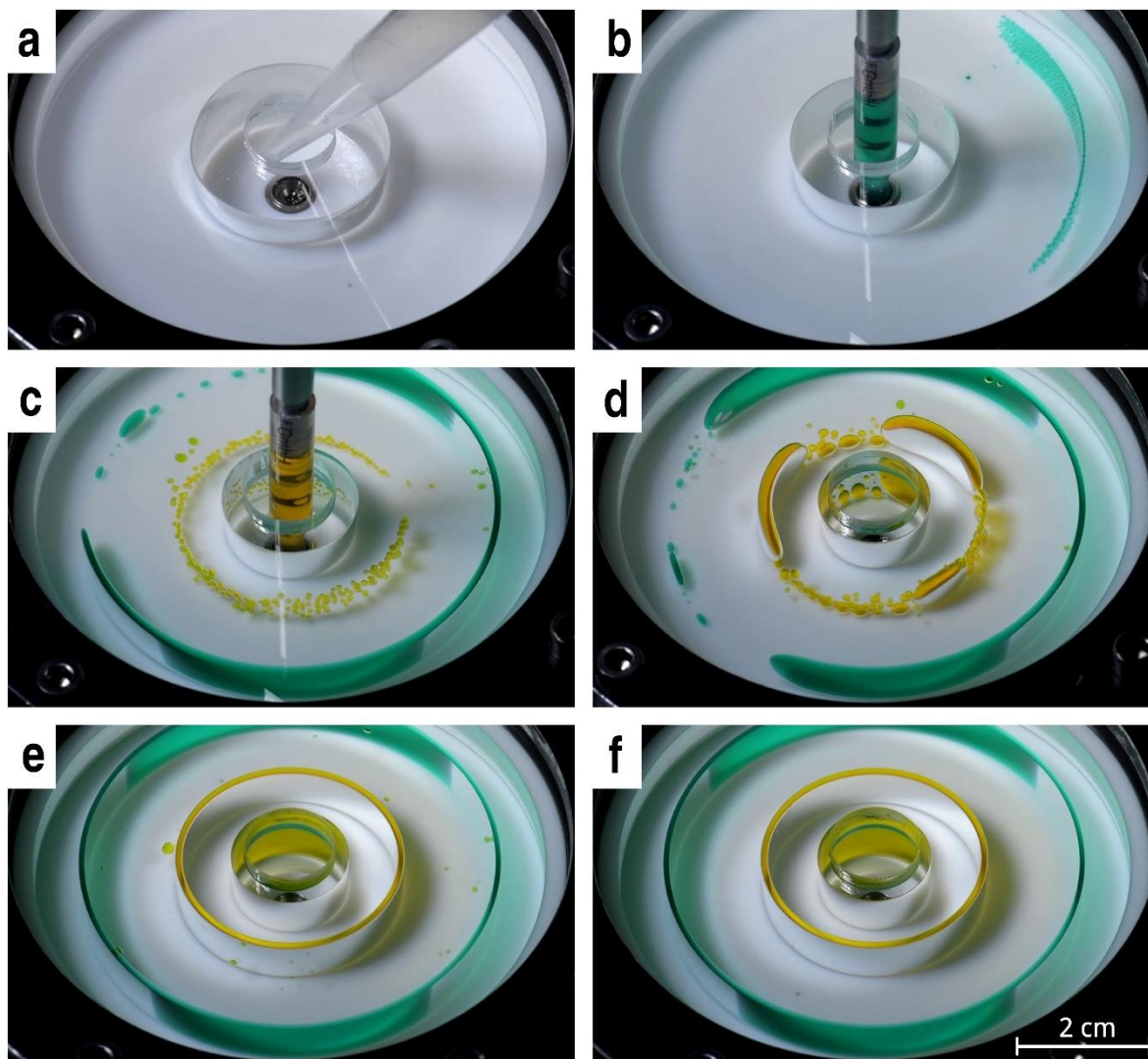


Figure S3. Introducing new immiscible layers into an existing single-phase continuous density gradient. **a**, Creation of the density gradient by sequential pipetting of 20 mL dibromomethane (DBM, density 2.47 g/mL), 25 mL of DBM / tetralin mixture (1:1 v/v, 1.72 g/mL) and 8 mL of tetralin (0.97 g/mL). **b**, Introduction of the first water phase: water solution of sodium metatungstate with density 2.1 g/L, dyed by Light Green SF. The stream of the injected phase enters the chamber by the hole in its floor; it forms a series of droplets that find their way to a radial zone of matching density. The trajectories of droplets are curved by Coriolis force, which is also responsible for moving the emerging band of droplets away from the hole (instead of placing all the droplets at the same angular position). **c**, Introduction of the second water phase, sodium metatungstate in water, 1.35 g/mL, dyed with Orange G. **d**, 5 minutes later, with the same rotational speed (1500 rpm): some droplets coalesce, but they do not form closed rings for this speed as long as the surrounding organic phase does not differ enough in terms of density. **e**, After increasing the speed to 5400 rpm, the water “fragments” form fully closed rings, but the continuous density gradient still remains, preventing droplets of intermediate density from joining one of these rings. **f**, After a minute of mixing by oscillating rotational speed between 3000 and 2250 rpm, the gradient flattens and all droplets become parts of one of the two rings.

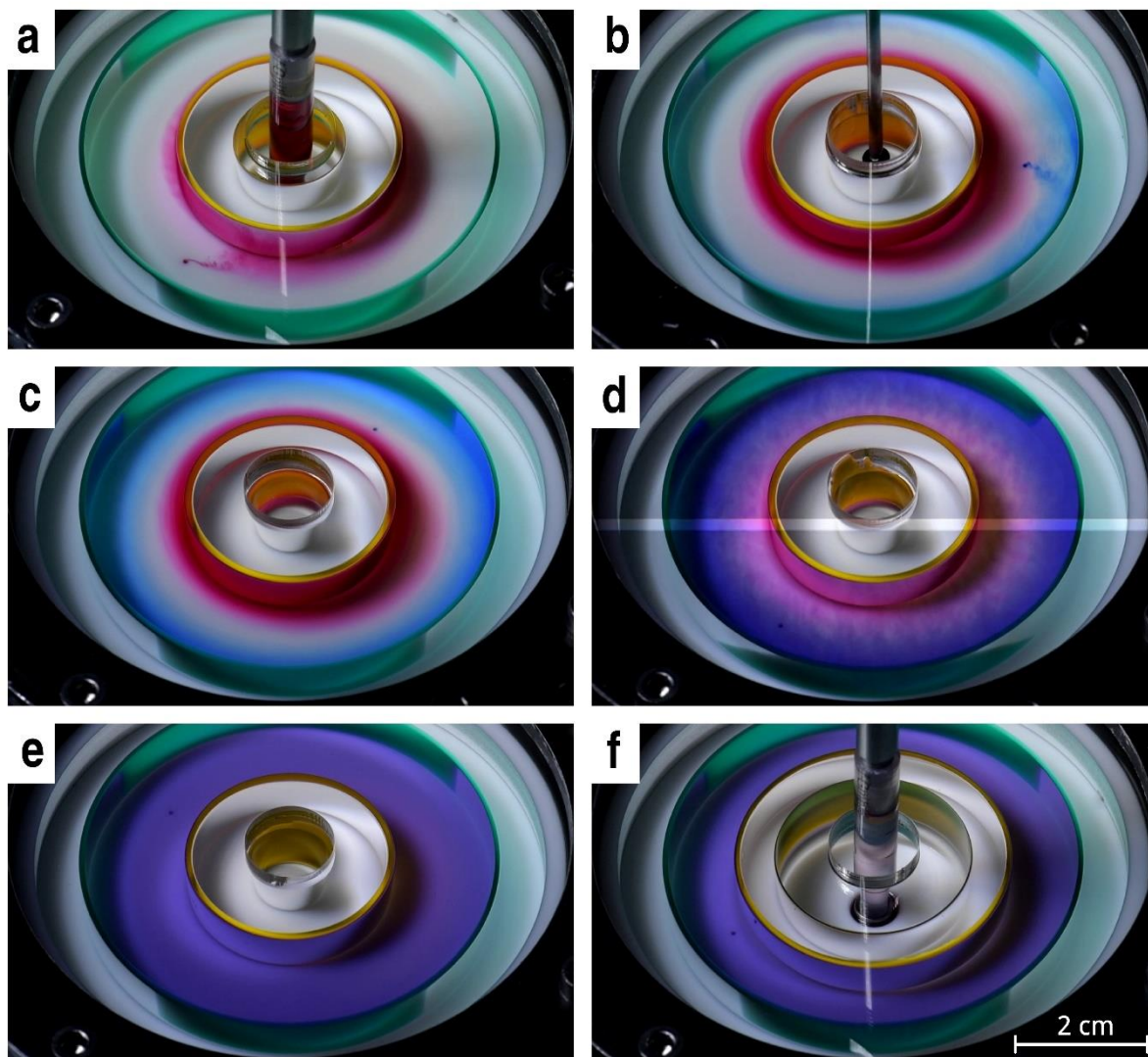


Figure S4. Continuation of the demonstrations from Figure S3 illustrating some “typical” operations on the middle (3 of 5) layer, performed without cross-contamination between this layer and neighboring organic layers. **a**, Addition of ~1 mL of DBM / tetralin, 2:3 v/v (density 1.57 g/mL) dyed with Oil Red EGN. **b**, Addition of ~1 mL of DBM / tetralin, 3:2 v/v (density 1.87 g/mL) dyed with Sudan Blue II. **c**, The resulting gradient of colors and density evolves very slowly due to diffusion, but is rapidly homogenized after applying **d**, one mixing cycle within six seconds and **e**, ten mixing cycles within one minute. **f**, Sampling the liquid from the processed layer, with using the same hole in the floor of the chamber as had been used for adding new liquid in (a) and (b).

Section S3. Internal flows and further details of mixing within thin layers.

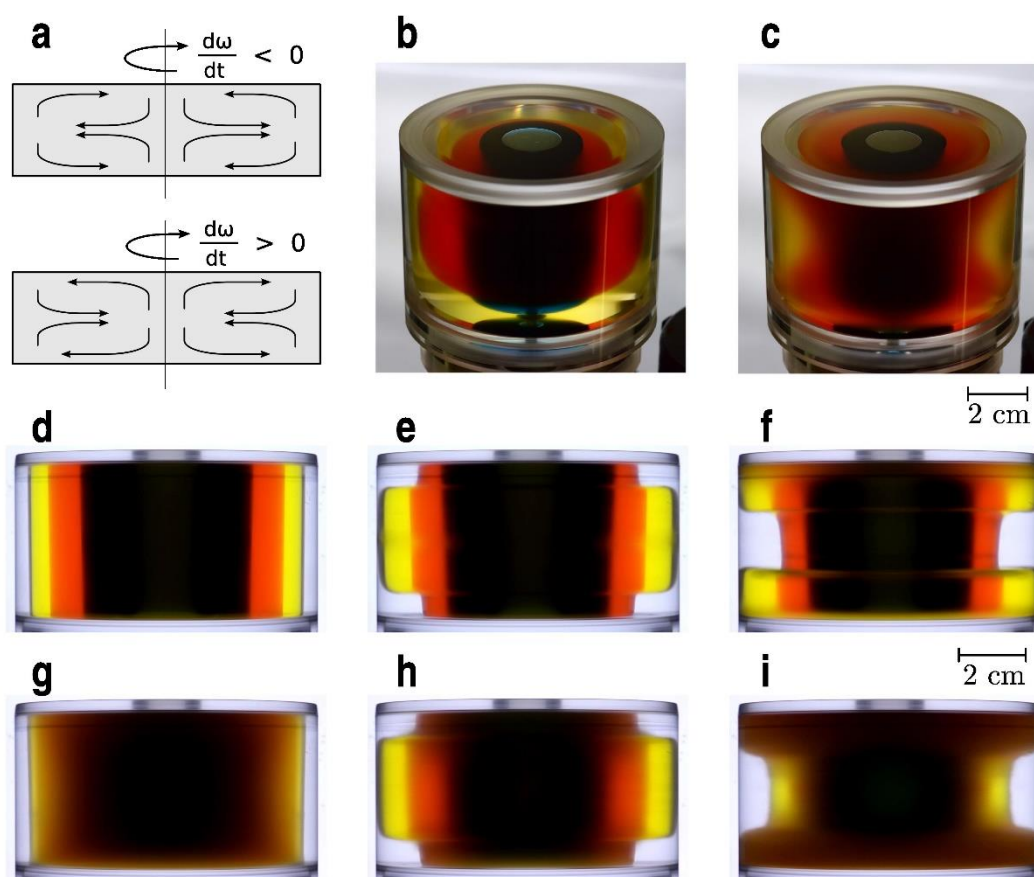


Figure S5. Flows induced by changing angular speed of the rotor and accompanying deformations of layers. **a**, Vertical and radial components of liquid circulation induced by deceleration (top panel) and acceleration (bottom panel) of a cylindrical container rotating along vertical axis (shown is the cross-sectional plane containing this axis; transversal component of flows – perpendicular to the plane – are not shown, despite being much larger than radial and vertical components). **b**, Deceleration, and **c**, acceleration of a four-layer system composed of fluorinert FC-40 (most dense, transparent), water/PEG 35000/K₃PO₄ ATPS (salt-rich layer – yellow, PEG-rich layer – orange), and hexadecane (blue). **d**, Equilibrium, **e**, smooth deceleration, and **f**, smooth acceleration of a similar four-layer system with FC-40 (transparent, density 1.855 g/mL), water/PEG 2000/CsCl ATPS (salt-rich layer, dyed with 4-nitrophenol, density 1.800 g/mL; PEG-rich layer, dyed with 4-nitrophenol and Congo red, density 1.535 g/mL), and hexadecane (0.770 g/mL, dyed with Sudan blue II). Due to low density difference, the interface between FC-40 and denser ATPS fraction is deformed to large extent, whereas the interface between lighter fraction of ATPS and hexadecane (density difference 0.765 g/mL) remains virtually unchanged. **g**, Emulsification of the same system achieved by cyclic repetition of **h**, rapid deceleration (from 2200 to 1300 rpm within two seconds) and **i**, rapid acceleration (back to 2200 rpm within two seconds). After stopping the cycles at the higher speed (2200 rpm), the system from (**g**) requires about 30 seconds to come back to clean, fully separated state as in (**d**). Note that despite low density difference (0.055 g/mL) between FC-40 and aqueous phases, this interface does not undergo emulsification – it only deforms its shape in a continuous manner. Intense emulsification occurs only at the interface between two fractions of ATPS,

whose densities differ by 0.265 g/mL, but interfacial tension is much smaller than between any water phase and FC-40 or hexadecane.

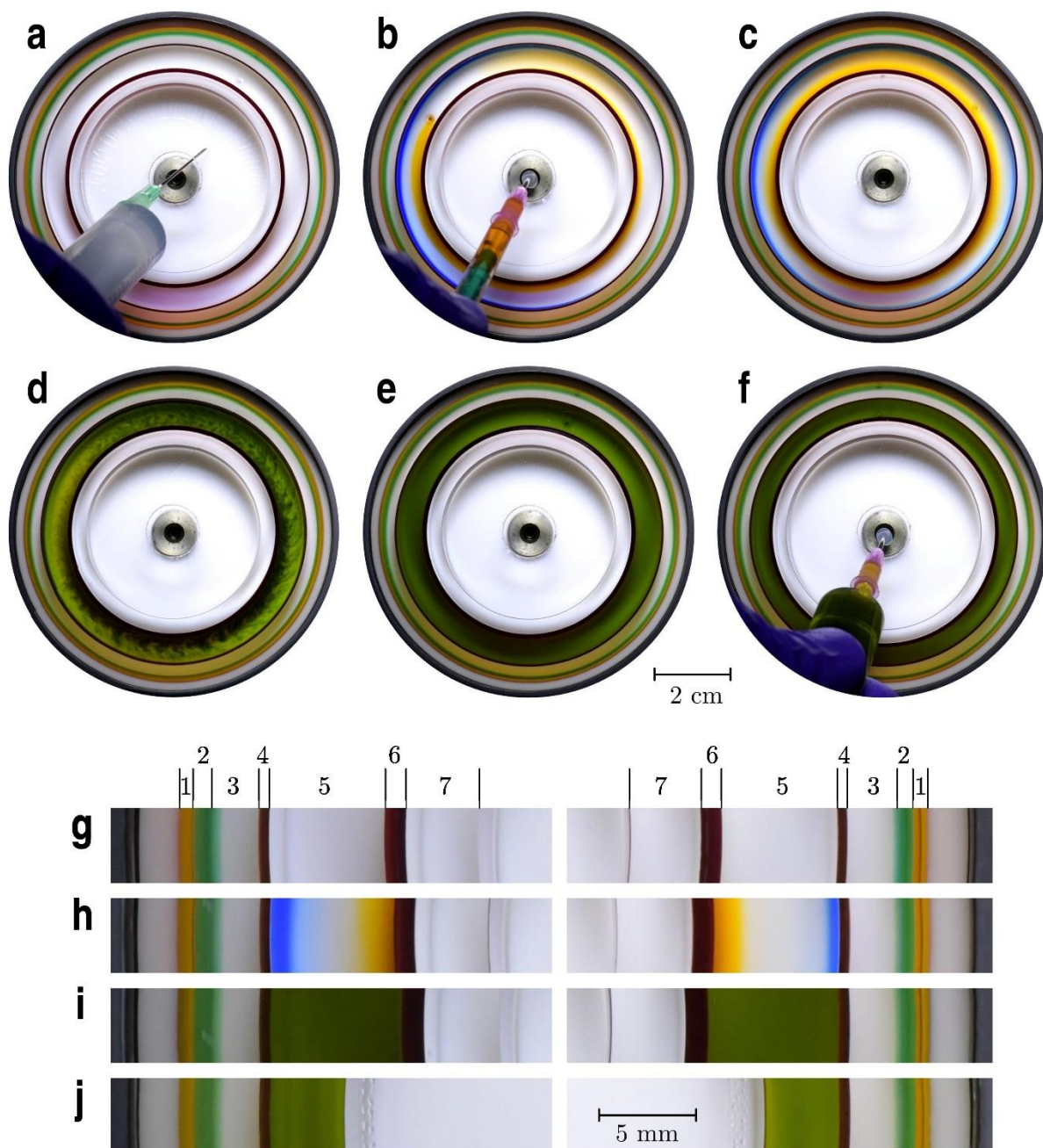


Figure S6. Top-view snapshots of the rotor from main-text Figure 2a (illuminated by stroboscopic pulses at the frequency of 60 Hz) during the cycle of demonstrations including: **a**, sequential loading of seven liquids (also in the **Movie S1**). **b**, Addition of dyed liquids into the layer connected with the central port by a channel running under the bottom surface of the chamber (also in the **Movie S2**). **c**, Lack of appreciable mixing 10 minutes after (**b**). **d**, Intense mixing within the layers (easily visible in the layer with added dyes; cf. **Movie S3**) caused by rapid variations of the chamber's rotational speed. Despite local eddies and shear forces (evidenced by Kelvin Helmholtz instability, visible in the layers with non-uniform distribution

of dyes), all layers and interfaces remain intact. **e**, End-result of the mixing, just a few second after (**d**). **f**, Demonstration of sampling or withdrawing liquids from the existing layers (also shown at the end of the **Movie S2**). **g-j**, High resolution photographs evidencing that the dyes injected in (**b**) do not migrate into or contaminate other layers of compatible polarity. Image (**g**) shows freshly assembled layers; (**h**) corresponds to the situation from (**c**); (**i**) – to the situation from (**e**), and (**j**) – to the situation after the instance (**f**), when the two innermost layers are already withdrawn. The composition of layers in (**g**), as indicated by numbers, is: **1** solution of tetrabromomethane and Sudan I in dibromomethane (orange, density 2.80 g/mL), **2** aqueous solution of sodium polytungstate and Light Green SF Yellowish (green, 2.52 g/mL), **3** mixture of dibromomethane and tetrachloroethylene (clear, 2.2 g/mL), **4** aqueous solution of cesium acetate with Alizarin Red S (dark brown, 1.8 g/mL), **5** tetrachloroethylene with hexadecane (clear, 1.420 g/mL), **6** similar to (**4**) but with smaller concentration of the salt (dark brown, 1.085 g/mL), and **7** hexadecane (clear, 0.77 g/mL). Dyes introduced into the layer **5** in (**b**) and (**c**) were dissolved in a mixture of tetrachloroethylene and hexadecane with densities 1.4 g/mL for the yellow dye (Sudan I) and 1.44 for the blue one (Sudan Blue II).

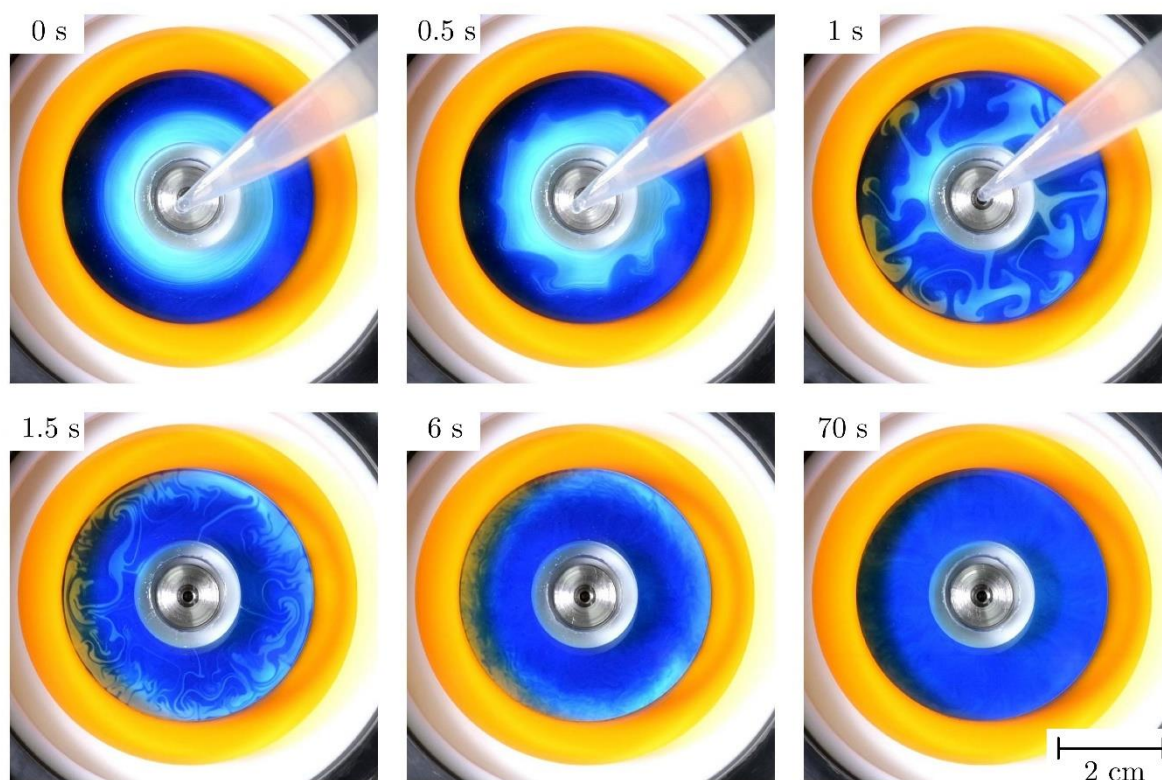


Figure S7. Mixing by Rayleigh-Taylor instability. At time zero (first snapshot), pure n-decane is added to the rotor containing three phases – transparent, most dense fluorinated oil HFE7500, methanol dyed with Orange G, and 5% n-octane in n-decane with Sudan Blue II. As a result of density difference between pure n-decane and the blue layer (the latter is about 0.2% denser), the developing Rayleigh-Taylor instability mixes the layer preliminarily within a few seconds (timestamps) and further mixing ensues due to diffusion. Rotation speed is kept constant at 3000 rpm. Compared to Rayleigh-Taylor instabilities observed in non-moving containers, centripetal acceleration (here, c.a. 200×g) increases the speed of the process and makes the flows more turbulent. Moreover, the instability pattern becomes skewed due to Coriolis force.

Section S4. System's stability and scalability.

S4.1 Practical consideration for the preparation of stacks comprised of large numbers of layers. In preparing stacks comprised of large numbers of layers, two practical considerations are useful. First, as the density differences between adjacent layers in such stacks may happen to be small, one should strive to minimize the use of solvents that exhibit even marginal mutual solubility and should also make sure that the most volatile components do not evaporate – both of these processes can nullify density differences and render the layers unstable. Second, minimum thickness of mutually immiscible layers is limited by interfacial tension and capillary phenomena – overcoming them requires higher rotation speed, ω_c , which scales as $N^{3/2}$ for N pair-wise immiscible layers covering constant range of densities and the same total thickness (for the derivation of this scaling, see **Section S4.2**). We note that in the absence of interfacial tension, i.e., when layering mutually miscible liquids, high ω_c is only relevant to minimize turbulent mixing during addition of a new layer. Naturally, with time such layers are slowly being blurred by diffusion (maintaining a molecular density gradient against diffusion by centripetal acceleration is only possible in most advanced, ultra-high speed centrifuges¹).

Figure 1d-f in the main text, and its extended version presented below as **Figure S8**, demonstrate both types of stacks and also their obliteration: by lowering ω_c , for mutually immiscible layers (**S8d**), or due to diffusion, for miscible ones (**S8f**).

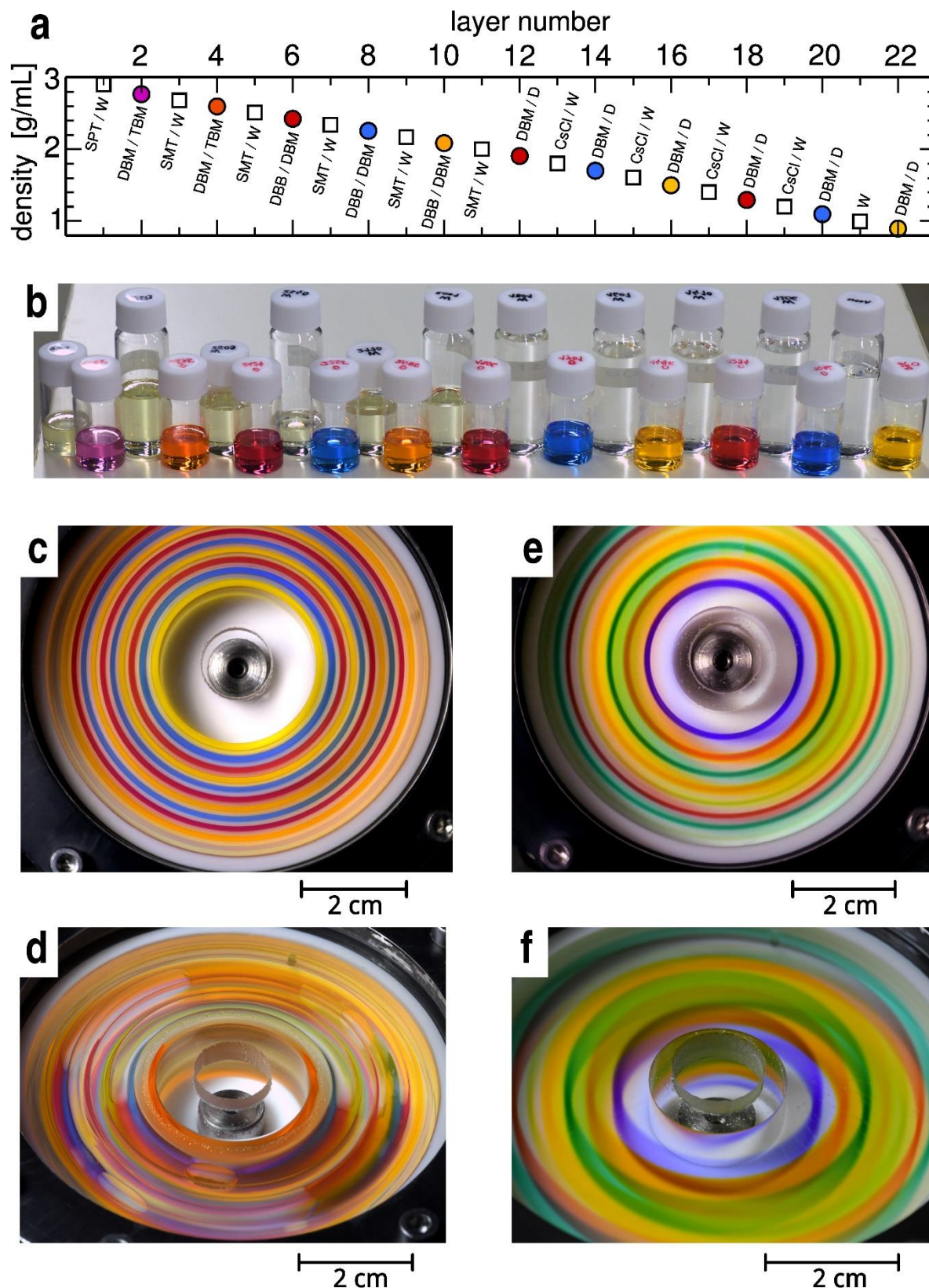


Figure S8. Systems with large number of layers (extended version of Figure 1d-f from the main text) a, Densities and ingredients of b, solutions (here, in 20 and 40 mL vials) used for c, the construction of a 22-layer, discrete density “staircase” in a chamber rotating at 5400 rpm. Water phases (W, odd numbers, no dyes) contain different concentration of sodium polytungstate (SPT), sodium metatungstate (SMT) or cesium chloride (CsCl). Organic phases

are mixtures of tetrabromomethane (TBM), dibromomethane (DBM), 1,4-dibromobutane (DBB) and *n*-decane (D) dyed with Sudan Blue II (13.3 mg/L) in layers **2**, **8**, **14** and **20**, Sudan I (26.6 mg/L) in **4**, **10**, **16** and **22**, and Oil Red EGN (13.3 mg/L) in **6**, **12** and **18**. Amounts of liquids injected into the chamber were 3 mL for layer **1**, 2.4 mL for layers **2** to **5**, 2.1 mL for **6-9**, 1.8 mL for **10-13**, 1.5 mL for **14-17** and 1.4 mL for **18-22**. Appearance (i.e., the colors) of layers does not show any cross-contamination between different layers. **d**, As the rotation speed was decreased to 1500 rpm, the layers became unstable, broke into arcs (cf. main-text **Figure 2**), and coalesced. For comparison, **e** and **f** show a *single* phase, 17-step density gradient created in the same rotor by *mutually miscible* water solutions of NaI, methanol and polyethylene glycol (35k PEG, the same concentration of 125 g/L in all layers) of densities linearly decreasing from 1440 to 926 g/mL. **f**, In the absence of interfacial tensions, the layers do not break when rotation speed is slowly decreased to 750 rpm, however, their boundaries are gradually blurred by diffusion.

S4.2 Minimal thickness of a stable layer.

With reference to main-text **Figure 2d**, we consider a liquid of volume V and density ρ , forming an arc of radius r and thickness d between neighboring layers of liquids having densities $\rho \pm \Delta\rho$ in a chamber rotating with angular velocity $\omega = 2\pi\omega_c$. As long as d is small compared to r and to the span of the covered area, the surface energy of the orange liquid can be approximated² by $E_s = 2\gamma V/d$, where the factor of two accounts for both sides of the considered layer, and γ is the interfacial tension, assumed equal for both sides. Potential energy related to the displacement of the yellow liquid with respect to the dotted line in the presence of centripetal acceleration, $a = \omega^2 r$, may be calculated as $E_p = \Delta\rho a V d/4$. Minimization of the total energy $E_s + E_p$ over d then gives the minimal thickness of a stable layer,

$$d_{\min} = \sqrt{\frac{8\gamma}{\Delta\rho a}} = \frac{2}{\omega} \sqrt{\frac{2\gamma}{\Delta\rho r}} \quad (1)$$

Below this value, the layer becomes metastable and, in response to large enough perturbations, may break into an “arc”, as in main-text **Figure 2e-f**. As a consequence, the previously separated layers come into direct contact and – if they are mutually miscible – coalesce, as in **Figure S8d**.

The derived dependence implies that for given liquids (i.e., given $\Delta\rho$ and γ), maintaining thinner layers requires higher rotational speeds or larger radial distances from the axis of rotation. For systems of N layers (see **Section S4.1**) covering fixed range of densities and stacked between fixed radial positions, minimum ω needed to stabilize the system scales as $N\sqrt{N}$, assuming constant interfacial tension between adjacent layers. This scaling follows from eq. 1 solved for ω , under assumption, that in order to substitute N layers by kN layers (for $k > 1$) their thicknesses must be scaled from d to d/k , while differences of density from $\Delta\rho$ to $\Delta\rho/k$. Thus ω scales as $k\sqrt{k}$. We also note that for a typical system of oil-water phases ($\gamma \approx 50$ mN/m), the lowest theoretically available thickness of layer is of the order of 10 μm – the value obtained for $\Delta\rho = 0.5$ g/mL and $a = 10^6$ g, as available in top-speed ultracentrifuges.

S4.3 Scalability considerations.

Regarding upscaling the system for industrial applications, we envision three main approaches:

- 1) Parallelization (using many rotating drums in parallel) can take advantage of placing many rotating drums on the same axle. One industrial precedent for this upscaling method is

parallelization of uranium isotope separation centrifuges, which rotate at speeds above 60 000 rpm and for this reason remain relatively small in diameter (about 30 cm).

- 2) Increasing all dimensions of the system (including thicknesses of liquid layers). This can be advisable in applications that focus on efficient inter-layer mixing by the acceleration/deceleration cycles. We discuss this type of upscaling in **Sections 4.3.1-4.3.3** below.
- 3) Increasing only the axial length of the drum. This can be useful in applications that focus on creating very thin liquid layers in a steady-rotation regime. In this case, required transport of species can be satisfied by diffusion (since layers are thin) and may not necessitate mixing by acceleration/deceleration cycles. Furthermore, long drums allow for reversible change of topology without disruption of liquid layer sequence: by tuning the rotational rate of a drum whose axis is along the gravity vector, it is possible to gradually and reversibly switch from non-rotating vertical stack of thick layers (convenient for loading/unloading) to a radial stack of same, but now very thin layers under rotation (enjoying fast and tunable diffusive transport and other advantages we demonstrated in this work). Operation of axially long drums is discussed in **Sections S4.3.4. and S4.3.5.**

S4.3.1 Dynamic stability of concentric fluid layers in a steady-rotation regime.

In a steady rotation regime, fluid flows are absent in the rotating frame of reference of the drum. In drum's reference frame, fluids experience radial fictitious force that arises due to centrifugal acceleration and acts analogously to gravitational acceleration. Thus, changing dimensions of the drum while maintaining the same centrifugal acceleration does not affect the steady rotation regime except for changing the curvature of the interfaces; it also does not affect the stability of layers, provided that their thickness is larger than the minimum given by eq. (1) in **Section S4.2.**

However, due to mechanical imperfections, rotation of the drum may not be perfectly uniform and circular. The motor, transmission belts, and other moving components of the system may cause vibrations of the drum, especially at the main frequency ω or its overtones. These vibrations may excite waves on the liquid interface that are analogous to the waves on the surface of the ocean. These waves are called "gravity waves," since gravity is the force that tries to restore the equilibrium position of the liquid surface – i.e., make surface flat in case of the ocean. In our case, the role of gravitational acceleration is played by the centrifugal acceleration.

With these general considerations, we consider a layer bounded from outside by the wall of the rotor, $r = R$ and of thickness h (i.e., with inner radius $r = R - h$). For normal waves that modulate layer thickness along its circumference, modes are defined by integer number N of wavelengths equal to the circumference $2\pi(R - h)$ of the drum at the liquid surface $r = R - h$; therefore N -th mode has wavevector $k_N = 2\pi/\lambda = N/(R - h)$. Dispersion relation between the wavevector k and the wave frequency ω_w is given by Airy wave theory for linear gravity waves: $\omega_w(k) = \sqrt{a k \cdot \tanh(k h)}$, where a in our case is the centrifugal acceleration $\omega^2(R - h)$ at the liquid's surface. The frequency of the N -th mode is thus $\omega_N = \omega_w(N/(R - h)) = \omega \sqrt{N \cdot \tanh(N h/(R - h))}$. N -th mode can be resonantly excited by the M -th overtone of the main system frequency ω whenever $\omega_N = M\omega$, which is equivalent to the following condition:

$$M^2/N = \tanh(Nh/R) \quad (2)$$

Note that since for positive x , function $\tanh(x) < 1$, condition (2) can only be satisfied when $M^2 < N$ and

$$\frac{R}{h} = 1 + \frac{N}{\operatorname{arctanh}\left(\frac{M^2}{N}\right)} \quad (3)$$

To minimize waves, ratios of drum radius to liquid layer thickness given by (2) should be avoided. **Figure S9a** shows all such “resonant” ratios R/h within the range $1 < R/h < 30$. The “angular wavelength”, plotted on the Y-axis, is defined as $\lambda \cdot 360^\circ / (2\pi(R - h)) = 360^\circ / N$; it measures the angle of a circular sector corresponding to wavelength λ . For example, $R/h < 4$ is one of the “safe” intervals, according to this analysis. **Figure S9b** illustrates a wave we observed in our system before fixing clearances of the main ball bearings of the rotor. The measured angular wavelength, c.a. 21° (ratio $R/h \approx 11.5$), roughly corresponds to a theoretically predicted mode with $N = 17$ (angular wavelength $360/17 = 21.176^\circ$, $M = 4$ and $R/h = 10.724$). We note that our treatment does not take into account waves running along the axis of rotation (please see **Figure S9c**), nor resonances which frequencies that are not simple overtones of ω .

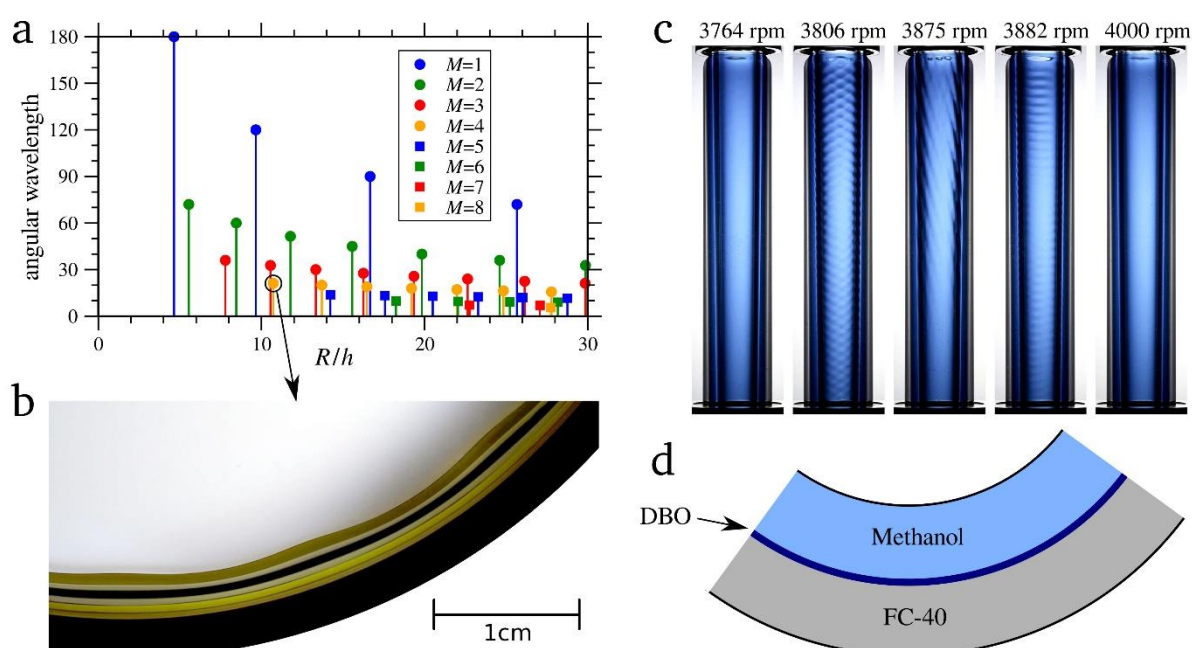


Figure S9. Resonant waves excited by mechanical vibrations of the rotor. **a**, Theoretical predictions (calculated based on eq. 3) of ratios of the drum’s radius to the liquid layer thickness, R/h , for which resonant waves can be excited by overtones of rotational frequency of the rotor, $M\omega$. Shapes and colors of symbols correspond to different values of M . **b**, Waves detected in our system before fixing clearances of the main ball bearings of the rotor. Although the presented theory does not strictly apply to waves in a multilayer system with layers of different densities, the measured angular wavelength, c.a. 21° , and ratio $R/h \approx 11.5$, roughly correspond to a theoretically predicted mode with $N = 17$ (angular wavelength $360/17 = 21.176^\circ$), $M = 4$ and $R/h = 10.724$, indicated by the arrow between panels (a) and (b). **c**, Resonant waves in a three-layer system, illustrated in cross-section in **d**, and made of 28 mL FC-40 fluorinated oil, 2.5 mL 1,8-dibromooctane, DBO, dyed with Sudan Black B, and 22 mL methanol with water (10% w/w, added to lower solubility of the dye in methanol) in an elongated, 75 mL glass tube (26 OD, 23.32 ID, c.a. 195 mm long, including 40 mm hidden in

the mounting spindle) rotating with speeds indicated above snapshots in (c). These waves were observed only within a narrow range of ω_c , between 3800 and 3900 rpm (whereas the available speeds of rotation cover the range from 70 to 5576 rpm). They do not satisfy any of resonance conditions predicted by eq. 3, since our simplified model does not take into account longitudinal modes (waves running along the axis of the rotor rather than its circumference) nor resonances with frequencies that are not overtones of ω_c . We note that the actual speed of electric motor was 1.394 times lower than ω_c , and the transmission belt between the motor and spindle might have been yet another source of such non-harmonic vibrations.

S4.3.2. Behavior of fluid layers during acceleration-deceleration cycles used for mixing.

During acceleration-deceleration cycles, mixing is effected mostly by changing the linear speed of the drum with respect to liquid that moves with inertia. If the same program of linear acceleration is applied to drums of different dimensions, but having the same layer thicknesses, the resulting flow regimes should be roughly the same, since the curvature of the liquid surfaces should have only a weak influence on the flows as long as the drum's radius is large in comparison to fluid layer thicknesses. If all dimensions of the system are scaled up by a factor K (including the layer thicknesses), both the Reynolds number (which compares inertial forces to viscous forces) and the Weber number (which compares inertial forces to surface tension) grow linearly with system's increasing scale K , thus making the mixing more vigorous in a larger system (again, given the same program of linear acceleration/deceleration).

Next, we consider the power required for acceleration/deceleration mode of operation. During an acceleration-deceleration cycle, drive system must modulate the kinetic energy of the rotating drum. Typically, electric motors for such applications are operated with regenerative braking: since any electric motor can also function as electric generator, during the breaking phase the mechanical energy can be converted back to electrical and is stored for half-cycle. Overall efficiency of regenerative electrical braking is at least 60-70%, limited mostly by electric storage efficiency and Joule heating. Alternatively, similar or higher efficiencies of kinetic energy recovery can be achieved by purely mechanical means: by temporarily storing the energy in rotation of an auxiliary flywheel, then feeding it back to the drum in the acceleration phase of the cycle. Despite these common energy-saving methods, in the following analysis, we assume – for illustrative purposes – the least efficient type of breaking: that is, when kinetic energy is entirely lost to heat. Note that the kinetic energy of the drum rotating at angular speed ω is

$$E_K = \frac{\omega^2}{2} \cdot (I_{\text{liquid}} + I_{\text{drum}}) \quad (4)$$

where I_{liquid} and I_{drum} are moments of inertia of liquid layers and of the drum, respectively. If the minimum and maximum angular velocities reached during one cycle are $\omega_0 + \Delta\omega$ and $\omega_0 - \Delta\omega$, then the required change of drum's kinetic energy in one cycle is

$$\Delta E_K = 2\omega_0\Delta\omega(I_{\text{liquid}} + I_{\text{drum}}) \quad (5)$$

and we assume that this is equal to the electric energy expended. Moment of inertia I_{drum} typically has a complex dependence on R :

$$I_{\text{drum}} = \pi\rho_{\text{drum}}(bR^4 + 2cLR^3) \quad (6)$$

where the first term is the contribution from two discs (bottom and top walls of the rotor, wall thickness b , material density ρ_{drum}), the second term is the contribution from outer cylindrical shell having thickness c and same material density ρ_{drum} . Given an axial length L , $I_{\text{liquid}} = 2\pi L \int \rho(r)r^3 dr$. Therefore, each liquid layer of density ρ_i , inner radius r_{i1} and outer radius r_{i2} contributes $\frac{\pi L \rho_i}{2} (r_{i2}^4 - r_{i1}^4)$ to the overall I_{liquid} . If all dimensions of the system are modified by the same scale factor K , moments of inertia change proportionally to K^5 . To maintain fixed centrifugal accelerations $a(Kr) = \omega_0^2 \cdot Kr$ upon scaling, angular velocity should be changed as $\omega_0 \sim K^{-1/2}$. Reynolds number Re and Weber number We would then depend on the scale factor K as follows:

$$\begin{aligned} Re &\sim \frac{K}{\nu} \cdot K\Delta\omega = \frac{K^2\Delta\omega}{\nu} \\ We &\sim \frac{(K\Delta\omega)^2 K}{\gamma} = \frac{K^3\Delta\omega}{\gamma} \end{aligned} \quad (7)$$

where ν is the kinematic viscosity, and γ is the surface tension. It follows from (7) that a rule $\Delta\omega \sim K^{-2}$ would maintain fixed Re , while a rule $\Delta\omega \sim K^{-3}$ would maintain fixed We . Some additional parameter (viscosity or surface tension) must be tuned to make both Re and We fixed when the scale K changes. Depending on which of the above two rules for $\Delta\omega$ one chooses, substituting these relations in expression (5) leads to

$$\Delta E_K \sim K^{-1/2} \cdot K^{-(2+3)} \cdot K^5 = K^{1.5+2.5} \quad (7)$$

yielding exponents between 1.5 and 2.5, depending on whether Re or We number is conserved by tuning the acceleration program. This means that the required energy per mixing cycle scales sublinearly relative to liquid volume $V \sim K^3$, making upscaling favorable in terms of power per useful volume.

Similarly, since torques T required to perform a given program $\omega(t)$ of angular acceleration/deceleration are

$$T = (I_{\text{liquid}} + I_{\text{drum}}) \cdot \frac{d\omega}{dt} \quad (8)$$

they would scale as $\sim K^5 \cdot K^{-(2+3)} = K^{2+3}$, which is sublinear or linear with respect to useful volume of liquid $V \sim K^3$.

S4.3.3. Mechanical challenges associated with increasing system's dimensions.

Behavior of fluids in our system at steady-state rotation is intrinsically insensitive to the mechanical perfection of the outer wall of the chamber: liquid-liquid and liquid-gas interfaces automatically assume shapes that are perfectly concentric with the axis of rotation, irrespective of the irregularities of the wall – provided that they are smaller than the thickness of the outmost fluid layer. However, these irregularities may have significant impact on mixing patterns – to such extent that it may be worthwhile to consider placing them purposefully to improve mixing.

As the radius R of the chamber increases by a factor K along with all other dimensions, the angular frequency required to maintain the same centrifugal acceleration $a(kR) = \omega^2 Kr$ decreases as $\sim K^{-1/2}$. Upon such scaling, stress $\sigma = p_{\text{wall}} R/b$ on the chamber's outer walls (wall thickness b) due to hydrostatic pressure p_{wall} of liquid layer (of thickness h) would increase as

$$\sigma = \frac{R}{b} p_{\text{wall}} = \frac{R}{b} \int_{R-h}^R \rho \omega^2 r dr = \frac{R}{b} \omega^2 \rho h \left(R - \frac{h}{2} \right) \sim \frac{K^2}{b} \quad (9)$$

which means that the thickness of the outer walls must increase as $b \sim K^2$ to maintain structural robustness. This is sublinear with respect to the total useful volume increasing as $V \sim K^3$. However, load on the bearings would scale in the same way as total rotating mass ($\sim K^3$). This is one of the reasons why commercial centrifuges are typically designed as small-radius, rapidly rotating systems, not as large-radius slowly rotating ones. Yet, if necessary, a large vessel can be designed to rotate at a very uniform rate, with relative variation $\Delta\omega/\omega \approx 10^{-7}$: this is the typical requirement for large liquid mirror telescopes, and is achieved using frictionless bearings and high inertia turntables³ for diameters 3.7 meters⁴ or 6 meters⁵. Such mechanical stability would be more than enough for implementing the scaled versions of our system.

S4.3.4. Theoretical considerations for liquid layers in axially elongated rotating tubes.

As long as a vertically elongated rotor – further referred to as a tube – rotates with ω high enough to maintain concentric layers of almost cylindrical shape, general features and potential applications are similar to all other rotors described in this study. Practical differences include:

- 1 Better visibility of layers from aside (for tubes with transparent walls) and much worse from atop,
- 2 Due to the necessity of maintaining larger speed of rotation, designing the machine is more technically challenging – very long rotors may require additional bearings to stabilize axis of rotation and prevent vibrations (such as those in **Figure S9c**).
- 3 Operations on liquids during rotation (adding new liquids to existing layers other than the innermost one, sampling or withdrawing existing layers) require more sophisticated solutions than the system of internal channels presented in main-text and **Figure S1d-f**. In particular, ports for connecting external sources of liquids under high rotation speeds must be more precise and resistant to friction, abrasion and temperature.
- 4 Large aspect ratio of layers limits active mixing of liquids within layers. On the other hand, long tubes are more suitable for working with very thin layers at very high ω 's (see the discussion on scaling at the beginning of **Section 4.3**) – consequently, passive mixing by diffusion becomes more efficient.

This being said, long tubes – in contrast to disk-shaped rotors – allow for continuously and reversibly changing the topology of liquids from a compact stack of horizontal layers (tube not rotating, $\omega = 0$) to thin, coaxial cylindrical layers (high ω). Such a continuous transformation of shape and layers' topology could be useful in controlling the surface to volume ratio, over almost as wide of a range as is typically achieved by emulsification, but preserving the order and integrity of the layers, even if some of them are mutually miscible. The expanded, coaxial configuration could be useful in applications requiring large contact area and short distance to neighboring layers (also implying short time of transport by pure diffusion), while its transformation to the compact stack at $\omega = 0$ would facilitate operations on liquids (addition, sampling, monitoring).

As was shown in the main text **Figure 1a**, for systems large enough to neglect capillary interactions, all interfaces between immiscible liquids in a container rotating around vertical axis with constant ω adopt the shape of axisymmetric paraboloids (differing only by offset along the axis of rotation, otherwise identical). Comparison of theoretical (i.e., not taking into account menisci and interfacial tensions) stationary shapes of layers in elongated and flattened rotors (i.e., in rotating tubes vs. disks) is shown in **Figure S10**. The problem can be easily nondimensionalized by using relative radial and vertical positions, $\tilde{r} = r/R$ and $\tilde{h} = h/H$, ranging from 0 to 1, and nondimensional parameter $\Omega = \omega R/\sqrt{2gH}$, where R and H are actual dimensions (radius and height) of the rotor, and g is acceleration due to gravity. Therefore, Ω

may be interpreted as the ratio of the linear velocity of rotation, ωR , at the boundary of the rotor to the velocity of free fall from its height, $\sqrt{2gH}$. Specifically, in all cases the equation of the interface shape is

$$\tilde{h}(\tilde{r}) = \Omega^2 \tilde{r}^2 - \frac{a}{H} \quad (10)$$

where offset a/H depends on (i) which of the rotor's surfaces are touched by the interface (this affects the formula for the volumes of phases) and on (ii) the dimensionless volume fraction $\eta = V/(\pi R^2 H)$ of the volume V under the interface to the rotor's total volume $\pi R^2 H$. For example, if $\Omega^2 < 2\eta$ and $2\eta < 1$, the interface only touches the walls and the interface shape is

$$\tilde{h}(\tilde{r}) = \Omega^2 \left(\tilde{r}^2 - \frac{1}{2} \right) + \eta \quad (11)$$

If $2\eta < 1$ and $2\eta < \Omega^2 < 1/(2\eta)$, the interface touches only the bottom and the side walls and the interface shape is

$$\tilde{h}(\tilde{r}) = \Omega^2 (\tilde{r}^2 - 1) + \Omega \sqrt{2\eta} \quad (12)$$

If $1/(2\eta) < \Omega^2$, the interface touches both the top and the bottom of the rotor and the interface shape is

$$\tilde{h}(\tilde{r}) = \frac{1}{2} + \Omega^2 (\tilde{r}^2 - 1 + \eta) \quad (13)$$

If $2\eta > 1$ and $\Omega^2 > 2\pi(1 - \eta)$, the interface only touches the top,

$$\tilde{h}(\tilde{r}) = \Omega^2 \tilde{r}^2 - \Omega \sqrt{2\pi(1 - \eta)} + 1 \quad (14)$$

Cross-section of such a nondimensionalized rotor with five liquid layers for $\Omega = 2$ is shown in **Figure S10a**. In this figure, liquids, starting from the most dense, occupy 10, 15, 25, 25 and 15 percent of the total volume of the rotor, yet from the perspective of further analysis it is more convenient to use volume of all liquids below a given interface, regardless of the number and partitioning of layers – such cumulative volumes are illustrated in **Figure S10b**, along with colors of layers contributing to a given volume. Cross-sections of two real rotors subjected to this comparison (both of them were used in experiments described in this study) are shown in **Figures S10c** for the tube (I.D. 23.32 mm, height 190 mm, volume 81 mL) and **S10d** for the disk (I.D. 78 mm, height 15 mm, volume 72 mL), both drawn on the same scale and with theoretical shapes of layers corresponding to $\Omega = 2$ – as in **Figure S10a**. Note that both **Figures S10c** and **d** differ from **S10a** only by scaling along radial and vertical axis. Since most applications of multilayer liquid assemblies described in this study require high centripetal acceleration and almost vertical orientation of layers, we plotted graphs illustrating dependence of these characteristics on ω : centripetal acceleration in **Figures S10e** and **f** (for tube and disk rotors, respectively) and radial positions of interfaces at the level of floor and ceiling of the rotor in, respectively, **Figures S10g** and **h**. For cylindrical layers, both of these positions would be the same; however, as real shapes are more or less elongated paraboloids of revolution, comparing the radial positions of interfaces at both ends of the rotor may serve as a convenient description of departures of real liquid layers from the preferred, cylindrical shape. Colors of curves in graphs **S10g**, **h**, correspond to colors of interfaces in **Figure S10a**. For each interface, there are two different curves corresponding to the ceiling (larger radial position) and the floor of the rotor, obtained by finding \tilde{r} corresponding to $\tilde{h}(\tilde{r}) = 1$ using expression (13):

$$\frac{r_{\text{top}}}{R} = \sqrt{1 - \eta + \frac{1}{2\Omega^2}} \quad (15)$$

$$\frac{r_{\text{bottom}}}{R} = \sqrt{1 - \eta - \frac{1}{2\Omega^2}} \quad (16)$$

– these curves approach each other as ω increases. Vertical dashed lines in all four graphs correspond to $\Omega = 2$, i.e., to configurations of liquids presented in **Figures S10c** and **d**, and to actual rotational speeds of 3162.5 rpm and 265.7 rpm, correspondingly. Note that, despite the same Ω and the same relative asymmetry between positions of layers at the floor and the ceiling, centripetal accelerations at the walls are very different: 130 g for the narrow tube and 3.08 g for the disk.

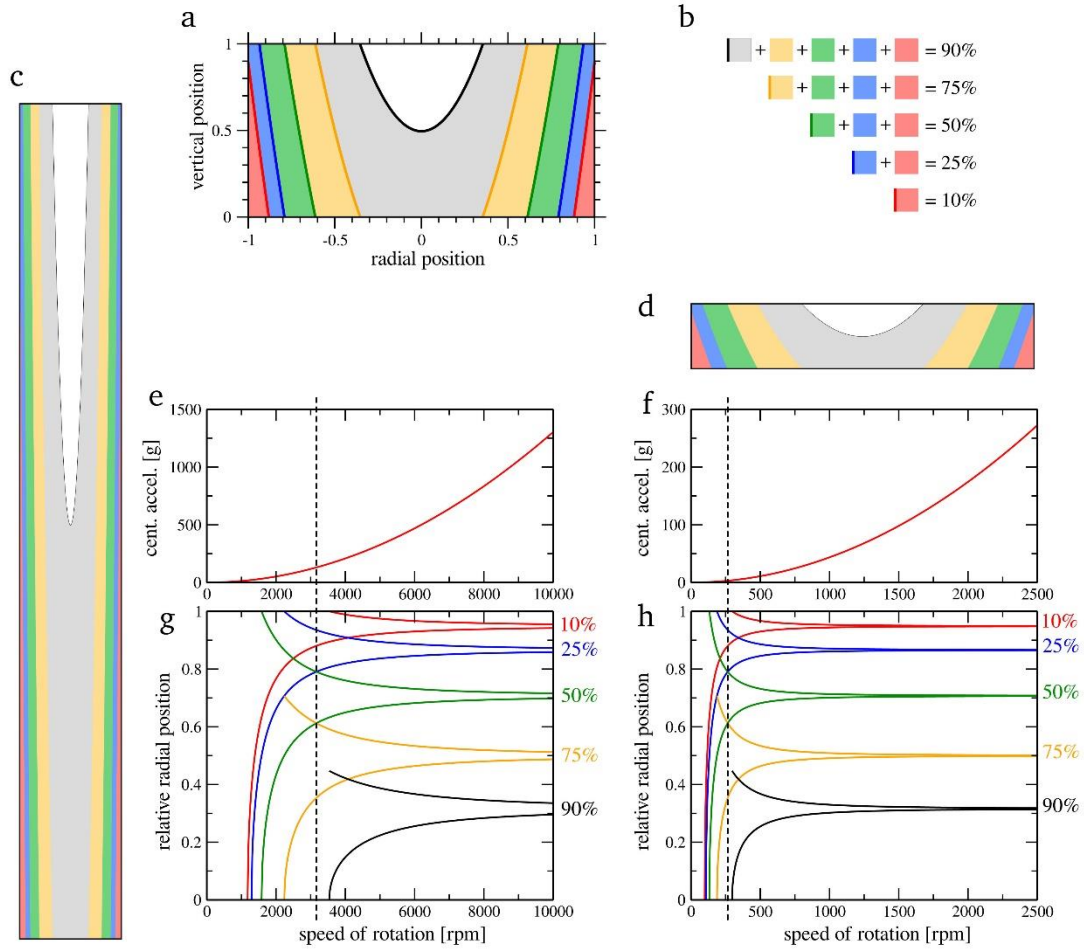


Figure S10. Theoretical configuration of liquid layers in elongated and flattened rotors. a, Five liquid layers in nondimensionalized rotor for non-dimensional $\Omega = 2$ (see the text). **b,** Legend with given cumulative volumes of liquids. **c, d,** Configuration of these liquids in tube (**c**) and disk (**d**) rotors (see text for details). **e, f,** Centripetal accelerations at the walls and **g, h,** radial position of interfaces at the ceiling and the floor of the rotors, all as a function of ω .

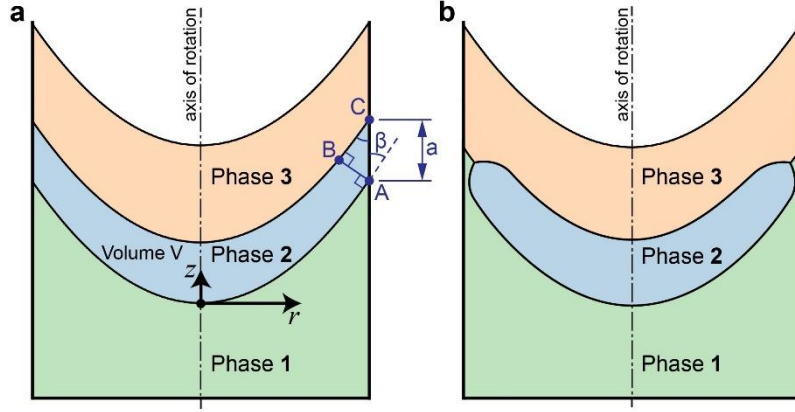


Figure S11. Analysis of a stable state of a thin liquid layer in a rotating tube. Depending on rotational speed, ω , and the volume of liquid, V , in phase 2 (blue color), it can either **a**, touch walls of the tube, or **b**, “hang” between neighboring phases 1 and 3 without touching these walls, with edge formed by the contact line of three liquid phases. At high ω , stable configurations different from **b** may occur, not necessarily axisymmetric (cf. **Figures S14-S16**).

Departures from paraboloidal interfaces become visible when distances between interfaces become as small as capillary length (see **Section S4.2**), i.e., for layers of small volume. Instead of being stretched along container’s walls, as in **Figure S11a**, such a layer may adopt other configurations, including axisymmetric configuration shown in **Figure S11b** – preferred for moderately low ω . In order to assess the stability of the configuration shown in **Figure S11a**, we consider the minimal distance between two paraboloid interfaces confining phase 2 in a rotating, cylindrical drum of radius R with rotation axis z parallel to the gravity vector \underline{g} . This distance (minimal thickness of phase 2) will then be compared to critical thickness d_{\min} based on capillary length and given by eq. (1) in **Section 4.2**. If the menisci are neglected, shapes of interfaces are paraboloids of revolution with the same parameters but vertically offset by a with respect to each other:

$$\begin{aligned} z_{1-2}(r) &= cr^2 \\ z_{2-3}(r) &= cr^2 + a \end{aligned} \quad (17)$$

where $c = \omega^2/(2g)$. Here, the absolute offsets of paraboloids (with respect to the top or bottom of the cylinder) play no role and are omitted, since interfaces only interact with side walls of the tube. The offset a can be computed from known volume V of phase 2 (blue color in **Figure S11a**): $V = \pi R^2 a$, and therefore $a = V/(\pi R^2)$. We are describing the solution in a vertical cross-section sketch of the problem ((r, z) plane), since the problem is rotationally-symmetric. It is easy to see that the thickness of layer 2 in **Figure S11a** decreases with radial distance from the axis of rotation. Therefore, minimal distance between both interfaces, d , can be found by fixing point A at the position $(R, z_{1-2}(R))$, in which the interface 1-2 meets the vertical wall of the tube, and finding such a point $B = (x_m, z_{2-3}(x_m))$ at the interface 2-3 that the length of the vector AB reaches minimum – defined as d . Exact expression for this minimal distance is

$$d = (R - x_m) \sqrt{1 + \frac{1}{4c^2 x_m^2}} \quad (18)$$

where x_m is the root of equation

$$2c^2 x_m^3 + x_m(1 - 2c^2 R^2 + 2ca) - R = 0 \quad (19)$$

which is not a simple analytical function. Thus, we turn to an approximation whereby angle ABC in **Figure S11a** is assumed to be the right angle, and line AB is assumed to be normal to the interface 1-2. Since $AC = a$, and $\cotan(\beta) = dz/dr = 2cR$, in this approximation

$$d = a \sqrt{\frac{1}{1 + 4c^2 R^2}} = \frac{V}{\pi R^2} \sqrt{\frac{1}{1 + \frac{\omega^4 R^2}{g^2}}} \quad (20)$$

If d is larger than the minimum thickness d_{\min} given by eq.1 in **Section 4.2**, the considered layer extends to the walls of the cylinder, otherwise one can expect configurations in which phases 1 and 3 in **Figure S11** touch each other and – if they are mutually miscible – coalesce. Therefore, for keeping layers 1 and 3 separated, it is required that $d > d_{\min}$, where d_{\min} is given by eq. 1 corrected to account for non-negligible g at low ω by using acceleration $\sqrt{\omega^4 r^2 + g^2}$ instead of just $\omega^2 r$:

$$d_{\min} = 2 \sqrt{\frac{2\gamma}{\Delta\rho\sqrt{\omega^4 r^2 + g^2}}} \quad (21)$$

where γ is the interfacial tension, assumed equal for both interfaces (1-2 and 2-3) and $\Delta\rho$ is density difference between neighboring phases, also – for simplicity – assumed to be equal for phases 1-2 and 2-3. Combining eqs. 20 and 21, the stability condition $d > d_{\min}$ upon speeding the tube down becomes

$$\frac{V}{\pi R^2} \sqrt{\frac{1}{1 + \frac{\omega^4 R^2}{g^2}}} > 2 \sqrt{\frac{2\gamma}{g\Delta\rho\sqrt{1 + \frac{\omega^4 R^2}{g^2}}}} \quad (22)$$

which is equivalent to

$$\frac{V/\pi R^2}{2\sqrt{2\gamma/(g\Delta\rho)}} > \left(1 + \frac{\omega^4 R^2}{g^2}\right)^{1/4} \quad (23)$$

Right-hand side of (23) is a monotonously increasing function of ω , is always larger than unity and is approximately equal to $\omega\sqrt{R/g}$ when $\omega^2 \gg g/R$. Therefore, if eq. 23 is satisfied for some high ω_0 , it will remain satisfied for all smaller $\omega < \omega_0$, and there will be no disruption of layers upon speeding down the tube.

The above stability analysis is valid when the liquid layer in question does not touch the “lid” and the “floor” of the tube – that is, when the tube is sufficiently long and the volumes of phases 1 and 3 in **Figure S11** are large. We now consider what happens if these assumptions are violated. Deviation from these assumptions will primarily change the formula for offset a : now, instead of simply being a constant $a = V/(\pi R^2)$, the value of a will become dependent on ω . First, we will treat a case when increasing ω can bring phase 2 into contact with the bottom (“floor”) of the tube. In this process, phase 2 sandwiched between phases 1 and 3 may go through three geometries illustrated in **Figure S12**: none of its interfaces (1-2 and 2-3) touch the bottom of the tube (**Figure S12a**), when only interface 1-2 touches the bottom (**Figure S12b**), and when both interfaces touch the bottom (**Figure S12c**). For now, the tube is assumed to be sufficiently high, and with most of its volume occupied by phase 3, such that the tube’s top lid cannot yet be reached by the phase 2. We assume that coordinate $z = 0$ corresponds to the bottom of the tube, and thus equations (17) of paraboloid shapes of the interfaces are replaced with

$$z_{1-2}(r) = cr^2 - a_{1-2} \quad (24)$$

$$z_{2-3}(r) = cr^2 - a_{2-3}$$

where a_{1-2} and a_{2-3} are vertical offsets as indicated in **Figure S12**. If neither interface touches the bottom or the top of the tube,

$$a_{1-2} = \frac{cR^2}{2} - \frac{V_1}{\pi R^2} \quad (25)$$

$$a_{2-3} = \frac{cR^2}{2} - \frac{V_1 + V_2}{\pi R^2}$$

and the vertical offset between interfaces is $a = a_{1-2} - a_{2-3} = V_2/(\pi R^2)$, matching the above results (17)-(23). As the parameter $c = \omega^2/(2g)$ increases with increasing ω , the interface **1-2** begins to touch the bottom of the tube when $c \geq 2V_1/(\pi R^4)$, where V_1 is the volume of phase **1**. Similarly, interface **2-3** begins to touch the tube's bottom when $c \geq 2(V_1 + V_2)/(\pi R^4)$, where V_2 is the volume of phase **2**. The stability condition (23) should now be corrected for a new value of the vertical offset $a = a_{1-2} - a_{2-3}$ (which now depends on c and is no longer equal to $V/(\pi R^2)$ as it was in (17)-(23)). When the interface **1-2** (but not **2-3**) touches the bottom,

$$a_{1-2} = cR^2 - \sqrt{2V_1c/\pi} \quad (26)$$

$$a_{2-3} = \frac{cR^2}{2} - \frac{V_1 + V_2}{\pi R^2}$$

When $c \geq 2(V_1 + V_2)/(\pi R^4)$, both interfaces touch the tube's bottom and

$$a_{1-2} = cR^2 - \sqrt{\frac{2V_1c}{\pi}} \quad (27)$$

$$a_{2-3} = cR^2 - \sqrt{\frac{2(V_1 + V_2)c}{\pi}} \quad (28)$$

By combining these cases, we construct a continuous piecewise function representing the vertical offset a :

$$a = a_{1-2} - a_{2-3} = \begin{cases} \frac{V_2}{\pi R^2}, & \text{for } c \leq \frac{2V_1}{\pi R^4} \\ \frac{cR^2}{2} - \sqrt{\frac{2V_1c}{\pi}} + \frac{V_1 + V_2}{\pi R^2}, & \text{for } \frac{2V_1}{\pi R^4} < c \leq \frac{2(V_1 + V_2)}{\pi R^4} \\ \sqrt{\frac{2c}{\pi}} (\sqrt{V_1 + V_2} - \sqrt{V_1}), & \text{for } c > \frac{2(V_1 + V_2)}{\pi R^4} \end{cases} \quad (29)$$

Similar to the derivation of inequality (23), the stability of phase **2** layer can be analyzed by comparing unity to the expression for d/d_{\min} :

$$1 < \frac{d}{d_{\min}} = \frac{a}{2\sqrt{2\gamma/(g\Delta\rho)}} \left(1 + \frac{\omega^4 R^2}{g^2}\right)^{-1/4} \quad (30)$$

while taking into account that the offset a here should be obtained using formula (29). Note that this stability condition can be applied not only near the side wall of the tube, but also at arbitrary radius r from the axis by substituting R in (30) with r .

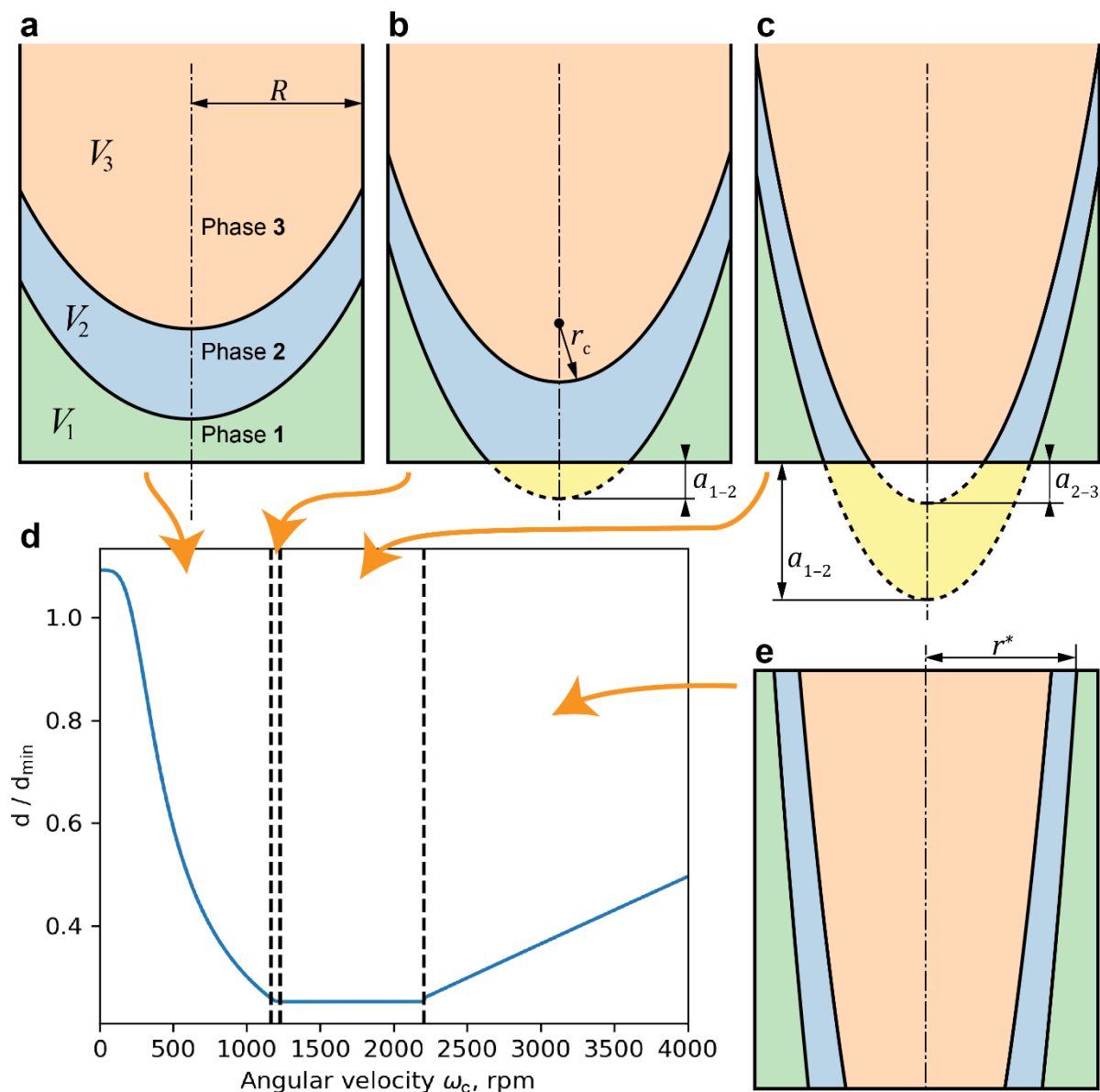


Figure S12. Continuous stability of a stack of liquid layers upon gradual change of tube's angular velocity. Illustrations used in the derivation of conditions required for maintaining continuity of liquid phase 2 sandwiched between phases 1 and 3 immiscible with it. **a-c, e**, Vertical cross-sections of a rotating tube containing three liquid phases. Dash-dotted vertical line is the axis of rotation. Angular velocity ω increases in sequence **a-c, e**, which brings the interfaces 1-2 and 2-3 of phase 2 initially touching the side walls only (**a**) into contact with the bottom of the tube (**b-c**), and then (upon further increase of ω) into additional contact with the top of the tube (**e**). In state **b**, only the interface 1-2 touches the bottom. In state **c**, both interfaces 1-2 and 2-3 touch the bottom. **d**, Example showing the dependence of compiled stability conditions (29)-(32) as a function of $\omega_c = \omega/(2\pi)$ for specific values of parameters used in experiments: $R = 11.66$ mm, $H = 195$ mm, $V_1 = 22$ mL, $V_2 = 2.5$ mL, and $2\sqrt{2\gamma/g\Delta\rho} = 5.36$ mm. Vertical dashed lines indicate transitions between geometries: from (**a**) to (**b**) when interface 1-2 touches the bottom at $\omega_c = 1164$ rpm, then from (**b**) to (**c**) when interface 2-3 touches the bottom at $\omega_c = 1228$ rpm. In these cases, plotted values of d/d_{\min} are obtained with expression (30), which utilizes (29). Finally, the geometry switches from (**c**) to (**e**) when phase 2 touches the top of the tube at $\omega_c = 2203$ rpm, and the d/d_{\min} starts to obey (31)-(32).

Next, we introduce a finite tube height H . It follows from (24) that at high enough ω , phase **2** will eventually touch the top of the tube when $cr^2 - a_{2-3} = H$, resulting in a state shown in **Figure S12e**. Assuming that this transition happens when both interfaces of phase **2** are already touching the bottom, that is $c > 2(V_1 + V_2)/\pi R^4$, equation (28) can be used to rewrite the condition for touching the top of the tube as $c > \pi H^2/(2(V_1 + V_2))$. We assume that both interfaces (**1-2** and **2-3**) touch the top almost at the same ω – this assumption is practically justified since the tube is long and thickness of phase **2** near the top is assumed to be small in comparison to tube's dimensions. Once phase **2** touches the top of the tube, this phase no longer touches the walls of the tube and condition (30) must be evaluated not at radius R , but at radius r^* of interface **2-3** at the top of the tube (indicated in **Figure S12e**):

$$1 < \frac{d}{d_{\min}} = \frac{\left(\frac{V_2 \omega^2}{2\pi g H}\right)}{2\sqrt{2\gamma/(g\Delta\rho)}} \left(1 + \frac{\omega^4 r^{*2}}{g^2}\right)^{-1/4} \quad (31)$$

$$r^* = \sqrt{R^2 - \frac{V_1}{\pi H} + \frac{gH}{\omega^2}} \quad (32)$$

Here we used the expression for offset $a = V_2 c/\pi H$, derived for the geometry in **Figure S12e**.

Figure S12d illustrates the dependence of d/d_{\min} on ω , as expressed by (30)-(31) for specific values of parameters from our experiment (see experimental demonstration in **Figure S15**). The experimental value of $2\sqrt{2\gamma/(g\Delta\rho)}$ for phase **2** was estimated by comparing the formula (1) to the experimental thickness of the liquid layer in a situation when the layer is not bound by the tube's walls but is in a state of a „ribbon” shown in **Figure S16f**. From the experimental estimation of thickness $d_{\text{exp}} = 0.33$ mm at 4500 rpm, $2\sqrt{2\gamma/(g\Delta\rho)} = d_{\text{exp}} \omega \sqrt{r/g} = 5.36$ mm.

The (almost) horizontal section of the blue curve in **Figure S12d** is where d/d_{\min} is minimal, which means that if the layer is stable in this section, it is also stable at all ω . This low-stability region occurs when phase **2** touches the bottom of the tube, but does not touch the top. This region is bound by values of ω given by $2(V_1 + V_2)/(\pi R^4) < \omega^2/2g < \pi H^2/(2(V_1 + V_2))$, amounting to $\omega_c = 1228 - 2203$ rpm in **Figure S12d**. Expression for d/d_{\min} in this region is obtained by substituting the third case of piecewise function (29) into (30):

$$\frac{d}{d_{\min}} = \sqrt{\frac{2c}{\pi}} \cdot \frac{(\sqrt{V_1 + V_2} - \sqrt{V_1})}{2\sqrt{2\gamma/(g\Delta\rho)}} \left(1 + \frac{\omega^4 R^2}{g^2}\right)^{-1/4} \approx \frac{\sqrt{V_1 + V_2} - \sqrt{V_1}}{2\sqrt{2\gamma/(g\Delta\rho)} \cdot \sqrt{\pi R}} \quad (33)$$

The approximate value on the right-hand side here, derived for the limit $\omega^2 R \gg g$, turns out to be independent of ω , as evidenced by almost-horizontal section of the blue curve (the exact expression) in **Figure S12d**. Thus, a reversible transition from a vertical stack of three liquid phases to a horizontal stack is possible without any disruption of the middle phase (i.e. keeping phases **1** and **3** from touching each other) if the following condition is satisfied:

$$\frac{\sqrt{V_1 + V_2} - \sqrt{V_1}}{\sqrt{8\pi R}} > \sqrt{\frac{\gamma}{g\Delta\rho}} \quad (34)$$

Conveniently, $\sqrt{\gamma/(g\Delta\rho)}$ is equal to the conventional capillary length at normal gravity (under no rotation). As noted above, in derivation of this condition we assumed that phase **2** first touches the bottom and only then touches the top (that is, $2(V_1 + V_2)/(\pi R^4) < \pi H^2/(2(V_1 + V_2))$), which is equivalent to $V_1 + V_2 < \pi R^2 H$, meaning that phases **1** and **2** together must occupy less than half of the volume of the tube).

Finally, we observe that high curvature of paraboloidal interfaces at the axis of rotation may invalidate the assumption of low curvature used in deriving the minimal stable thickness in **Section 4.2**, and lead to capillary expulsion of phase **2** away from the axis, as demonstrated experimentally in **Figure S14i-j** and **Figure S16b**. In order to avoid this, the radius of curvature $r_c = 2g/\omega^2$ of paraboloidal interfaces on the rotation axis (r_c is indicated in **Figure S12b**) must be much larger than the value of d_{\min} on this axis:

$$\frac{2g}{\omega^2} \gg 2\sqrt{2\gamma/(g\Delta\rho)} \quad (35)$$

unless ω is high enough for phase **2** to reach the bottom of the tube and for the liquid interfaces to stop crossing the axis of rotation – this geometry is shown in **Figure S12c** and requires that

$$\frac{\omega^2}{2g} > \frac{2(V_1 + V_2)}{\pi R^4} \quad (36)$$

One can see that for arbitrary ω , at least one of the conditions (35)-(36) would be satisfied if

$$\frac{\pi R^4}{V_1 + V_2} \gg 4 \sqrt{\frac{2\gamma}{g\Delta\rho}} \quad (37)$$

Conditions (34) and (37) are satisfied for the parameters of experiment shown in **Figure 1a** in the main text and in **Figure S13**. By design, (34) is not satisfied for any of the experimental demonstrations presented in **Figures S14-S16 (Section 4.3.5)**, in order to illustrate the modes of breakdown of liquid layer continuity.

S4.3.5. Experiments with rotating tubes.

Here we present results of experiments in which a commercially available glass culture-tube (O.D. 26 mm, I.D. 23.32 mm, length c.a. 195 mm) silanized with 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl-trichlorosilane, serves as a rotor for multilayer liquids. First we demonstrate topological transitions described in **Section S4.3.4** above – in this experiment, shown in **Figure S13**, the bottom part of the rotor (hidden in the rotating spindle) is filled with hardened epoxy resin, and for this reason the effective length of the rotor is reduced to 126.4 mm. Note that conditions (34) and (37) required for continuous topological transformations are easier to satisfy in tubes whose diameter and length are large in comparison to capillary length $\sqrt{\gamma/(g\Delta\rho)}$, if the volumes of liquids are scaled proportionally to the tube's net volume. Since we could not increase the radius of a long tube due to constraints of our equipment, for the present demonstration we, instead, decreased the capillary lengths by choosing a four-layer system of mutually immiscible liquids in such a way that interfacial tensions between all neighboring liquids are small. This enabled us to satisfy conditions (34) and (37) and to achieve continuous transformation of layer geometry without changing the neighborhood, i.e., without situations shown in **Figure S11b**. The liquids for the experiment shown in **Figure S13** were prepared by shaking and centrifugation (in order to obtain homogeneous phases in thermodynamic equilibrium) of equal volumes of FC-40, 1,10-dibromodecane, PDMS silicon oil with viscosity 10 cSt, and 4% water in acetonitrile. Small amount of dyes (Light Green S.F. and Sudan I) were added to facilitate identification of the layers: transparent fluorinert FC-40 (density 1.85 g/mL at 25 °C), orange dibromodecane with acetonitrile (1.145 g/mL), pale yellow silicone oil (0.998 g/mL), and green acetonitrile with dibromodecane and water (0.886 g/mL). During the transformations from **Figure S13** surface area of interfaces increased about 23× and the thickness of intermediate layers (orange and yellow) decreased from 31.8 and 11.8 mm to, respectively, 0.98 and 0.40 mm in **Figure S13a** and from 6.6 and 8.8 mm to 0.22 and 0.30 mm in **Figure S13c**.

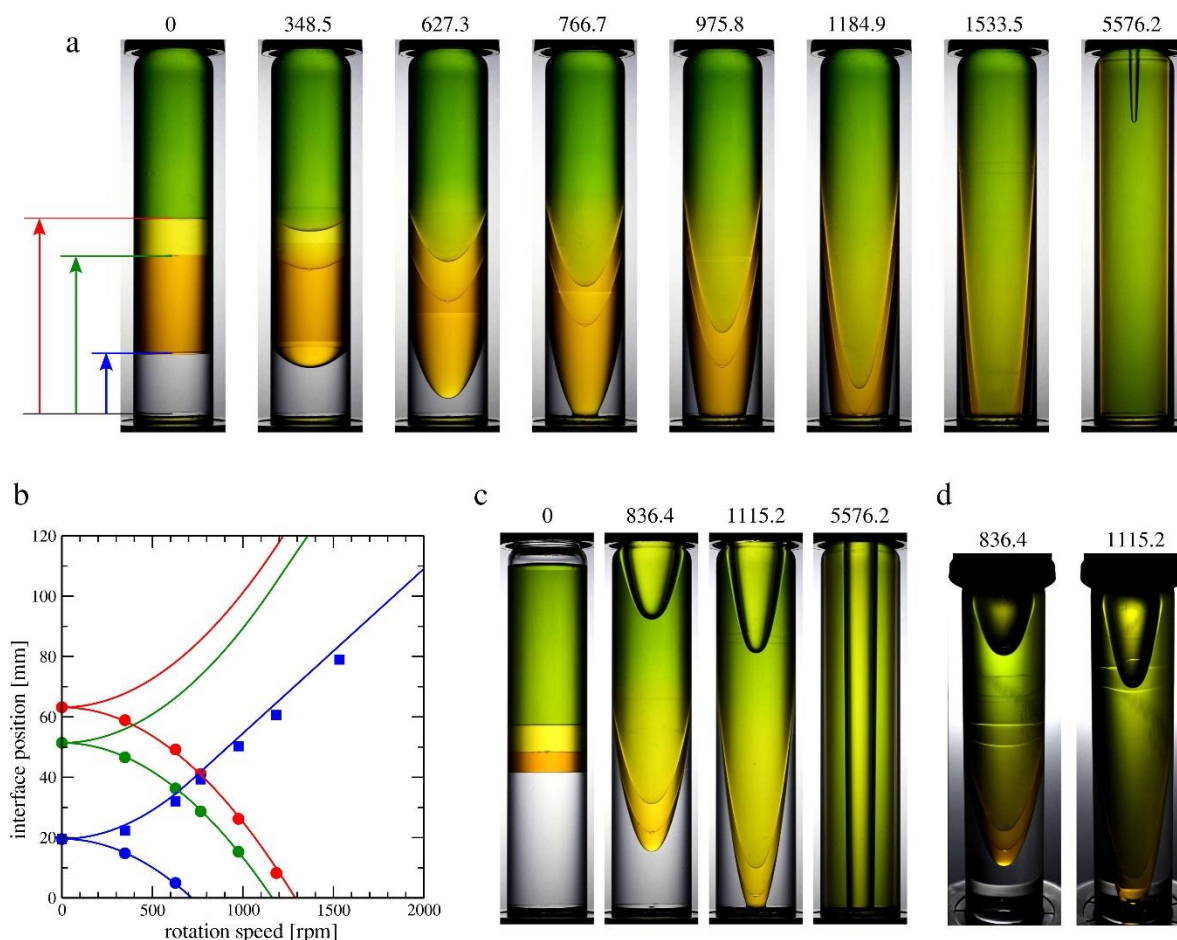


Figure S13. Continuous topological transformation of layers in elongated rotating tubes. **a**, Stationary state of the system comprised of 8.36, 13.59, 5.03 and 27.01 mL of mutually immiscible liquids (from the densest to the lightest, composition described in the text), for increasing ω_c (given in rpm above the snapshots). **b**, Positions of interfaces (highest and lowest points, as indicated by arrows in **(a)**, with corresponding colors) as a function of ω_c . Points are taken from the measurements on the recorded snapshots, curves represent theory – eqs. 24-28 in **Section 4.3.4**. Discrepancies for top positions of interface between FC-40 and dibromodecane/acetonitrile can be attributed to the meniscus at line of contact with glass. **c**, The same as **(a)**, yet with different volumes of liquids (18.51, 2.80, 3.76, 21.91, plus 16.39 mL of air) and hence thinner intermediate layers. Top positions of interfaces (lines of contact with glass) are barely visible in these snapshots, but can be identified upon moving camera and changing the incidence angle of light: **d**, two of the three interfaces become illuminated. See also **Supplementary Movie S8**.

In further experiments, described in **Figures S14, S15 and S16** we focus on situations in which the continuous transitions between stacked disks and concentric cylindrical layers is not possible without local rearrangements of neighborhood – if initially separated liquids were mutually miscible, they would coalesce during such transformation due to holes or discontinuities emerging in layers separating them. The rotor in these experiments is the same as in **Figures S9c and S13**, yet without epoxy filling (so that now liquids occupy the whole volume of the tube, including the invisible part inside the rotating spindle). Liquids used in these demonstrations have higher interfacial tensions than in **Figure S13**, they are: fluorinated

oils (FC-40 and HFE7500 mixed in equal volumes), DMSO with 1% Congo Red and n-decane with trace amount of Sudan Blue II. The intermediate layer of DMSO was deliberately chosen to be very thin, as we were especially interested in limiting cases of not-fully closed layers (as in the main text **Figure 2d-f**) and their dynamical rearrangement when condition (34) required to continuously maintain integrity of layers at all ω is not met. For instance, in **Figure S14b**, the middle layer (red) does not reach the edges of the tube, since reaching the edges would impose a layer thickness $d = 0.34$ mm near the wall, which is smaller than its theoretical minimum stable thickness $d_{\min} = 1.3$ mm near the wall for such a low ω , according to expressions (29)-(30).

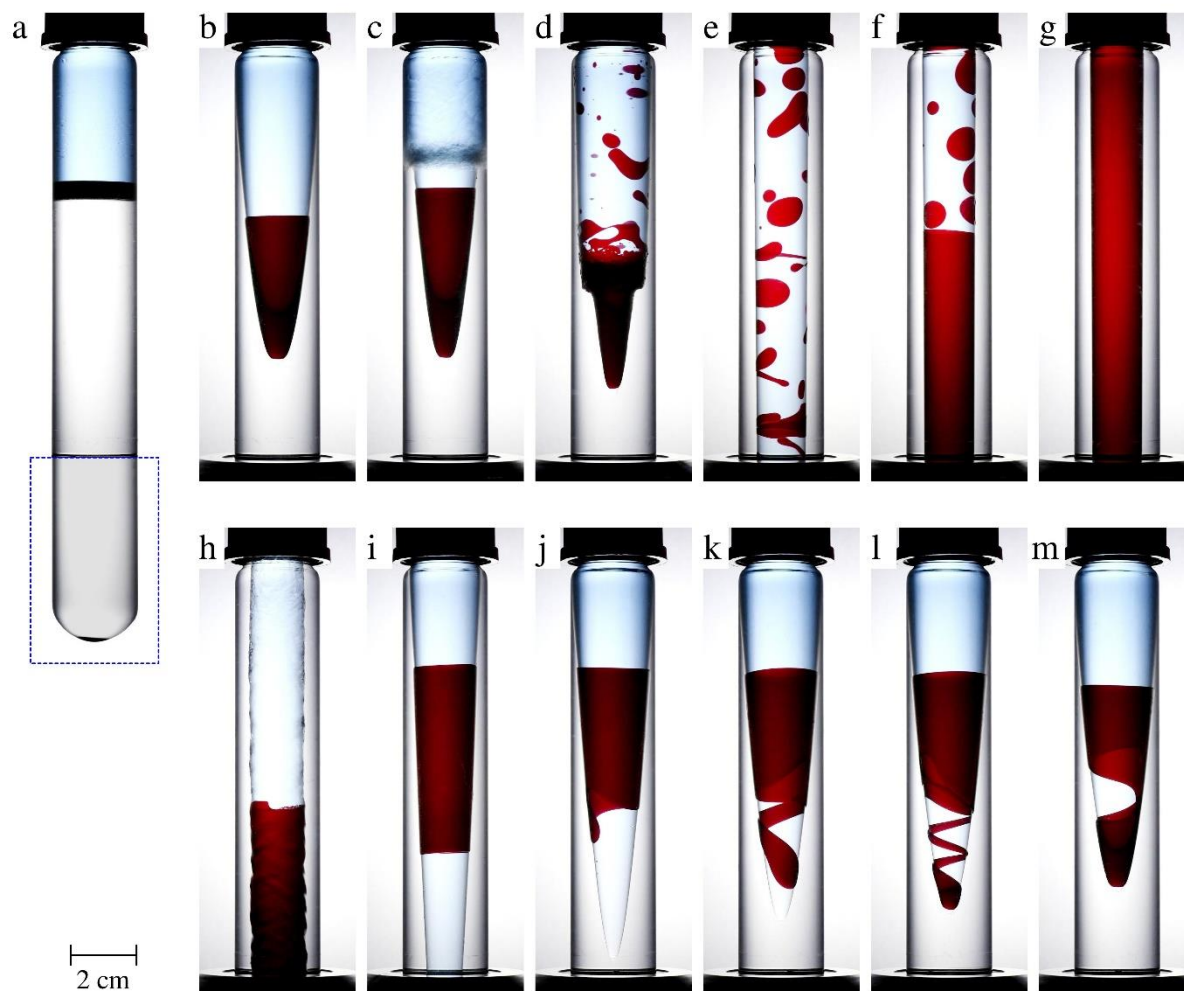


Figure S14. Discontinuous transitions between vertical stack and concentric cylindrical layers in a narrow tube. Tightly closed glass tube (O.D. 26 mm, I.D. 23.32 mm, c.a. 195 mm long, silanized with 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl-trichlorosilane), contains 54 mL of fluorinated oil (FC-40 and HFE-7500, 1:1 w/w), 2.5 mL DMSO (with 1% Congo Red dye), and 22 mL n-decane with trace amounts of Sudan Blue II. There is no room for extra air in the tube. **a**, Positions of liquids in a non-rotating tube. Rectangle at the bottom indicates section used for mounting of the tube in a rotary spindle (not visible in the remaining snapshots). These snapshots show transitions between stationary states at 1145 and 5576 rpm (top row) and back to 1145 rpm (bottom row). **b**, At 1145 rpm, layer of DMSO does not touch the wall of the rotor, so that both oils have common interface. Immediately after taking this photograph, the rotor starts to rotate, reaching 5576 rpm within less than one second. Counting from the instance of

starting acceleration, subsequent photographs are made after: **c**, 0.8 s, **d**, 2 s, **e**, 8 s, **f**, 11 s and **g**, 25 s – the last snapshot was taken c.a. one second after closing the layer of DMSO, so that both oils became fully separated. One minute after snapshot (**a**), the rotor rapidly (below one second) decelerated back to 1145 rpm, resulting in transient configurations shown in the bottom row, at times: **h**, 1.6 s after beginning of deceleration, **i**, after 6 s, **j**, 12 s, **k**, 15.6 s, **l**, 16.6 s and **m**, 21.6 s. After another few seconds, the system comes back to the state shown in (**a**).

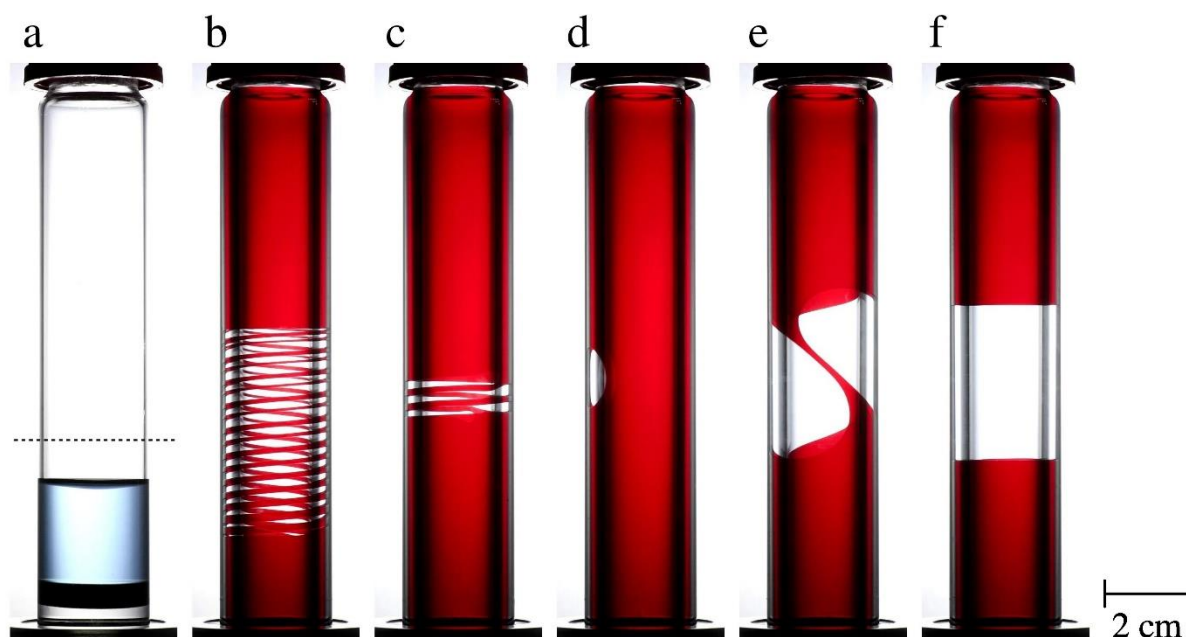


Figure S15. Controlled partitioning of liquid between two cylindrical rims. A three-phase system of 22 mL fluorinated oil, 2.5 mL red dyed DMSO and 10 mL n-decane (composition of liquids and dimensions of the container are the same as in **Figure S14**) undergoes controlled transformation from an almost motionless state **a**, 100 rpm (the dashed line denotes half length of the tube, whose bottom part is hidden inside a rotary spindle), via transient states **b** and **c**, to the stationary state for 5576 rpm, **d**, in which the DMSO layer is stretched to a cylinder having a small “opening” in its side (left). Further, upon decreasing speed of rotation to 4500 rpm, this side hole grows and deforms reaching the transient state **e**, and finally the stationary configuration **f**, in which DMSO is divided between two cylindrical rims. Repeating this experiments many times (for the same program of varying ω_c in time) leads to very different transient states, but final division of DMSO between two separate rims does not significantly change.



Figure S16. Formation and stretching of a cylindrical rim of an “intermediate” liquid (DMSO) between two immiscible oils. Details of liquids and container are the same as in **Figures S14** and **S15**, yet the total amount of DMSO (red) is decreased to 0.5 mL. **a**, Steady-state at 70 rpm – such a slow speed of rotation does not visibly affect the shape of layers, but keeps DMSO in the center. **b**, at 750 rpm, DMSO finds its place around paraboloid interface of decane and air, but does not form a fully closed ring. **c**, at 3000 rpm both layers of oils are stretched along entire length of the tube, but for the layer of DMSO, due to its small volume, adapting such a configuration would require thickness below 45 μm , much lower than its capillary length. Instead, DMSO forms a cylindrical rim, with average thickness 0.49 mm. As a result of increasing rotational speed – accompanied by transient states **d**, and **e**, – to 4500 rpm, the rim changes position and stretches further, so that its thickness decreases to 0.33 mm in snapshot **f**. Note that ratio of thicknesses of this layer in stationary states (**c**) and (**f**), 0.49/0.33, as well as the ratio of its vertical height (from which the thicknesses were calculated) is almost equal to the ratio of rotational speeds, 1.5 – in accordance with the model described in **Section S4.2**. In contrast to the rims in **Figure S15f**, vertical position of rims in (**c**) and (**f**) are not fixed with respect to the ends of the tube. Depending on the history of ω vs. time, the rims may form at different vertical positions and even for constant ω they may slowly migrate along the tube – although it is not clear whether they do so to minimize total surface energy, or in response to random external factors, including vibrations or thermal drifts.

Section S5. Synthetic and spectroscopic details.

S5.1 Materials and equipment.

All compounds and solvents used for synthesis in our rotating reactors were purchased from Sigma-Aldrich and Alfa Aesar. For thin liquid chromatography, silica gel on TLC Al foil 60/F254 was used (Sigma-Aldrich No. 60778). For flash column chromatography, silica gel 60 Å 220-440 mesh was used (Sigma-Aldrich No. 60738). ^1H and ^{13}C NMR spectra were acquired on 400 MHz FT-NMR Agilent 400-MR DD2 or 400 MHz FT-NMR Bruker Avance III HD spectrometers. Mass spectra were acquired on Bruker 1200 series & HCT Basic System.

S5.2. Three-phase synthesis of 1,4-phenylene-diacrylic acid dimethyl ester (main-text Figures 3a-c).

All experiments were performed at the same temperature, for the same time and the same rotational speed in a rotor made entirely from quartz (inner diameter 120 mm, height 8 mm). Two parameters that were varied were the layer thickness and concentration (0.1 M, 0.25 M and 1 M) of triphenylphosphine (and methyl bromoacetate) in toluene solutions (**3'**) + (**3''**). Regarding layer thickness, we considered two systems: in the first one, all layers were ~1.5 mm thick and the volume of solvent used in (**1**), (**2**) and (**3'** + **3''**) solutions was 4 mL; in the second one, layers were 3.5-4.5 mm thick and the volume of solvent in each layer was 10 mL.

The procedure described here is for the 0.25 M (**3'**) + (**3''**) solution (concentration of triphenylphosphine and methyl bromoacetate in toluene) and ~1.5 mm layer thickness; procedures for other concentrations/layer thicknesses were analogous. First, four solutions were prepared separately. Solution (**1**): Terephthalaldehyde (67 mg, 0.5 mmol) was dissolved in dichloromethane (4 mL). Solution (**2**): Potassium carbonate (207 mg, 1.5 mmol) was dissolved in water (4 mL). Solution (**3'**): Triphenylphosphine (262 mg, 1 mmol) was dissolved in toluene (3 mL). Solution (**3''**): Methyl bromoacetate (93 μL , 1 mmol) was dissolved in toluene (1 mL). All solutions were injected to the rotating reactor (1000 rpm) in the order: (**1**), (**2**), (**3'**) and (**3''**) causing formation of three ~1.5 mm layers with densities increasing outwards (i.e., $\rho((\mathbf{3}') + (\mathbf{3}'')) < \rho(\mathbf{2}) < \rho(\mathbf{1})$). After addition of the last solution (**3''**), white precipitate formed almost immediately, indicating start of the reaction. Rotor was kept rotating for 72 h at room temperature. Afterwards, the reactor was stopped and its contents were transferred to a separator. Organic phase was separated and water phase was extracted with dichloromethane (2 \times). Combined organic extracts were dried by MgSO_4 and solvent was evaporated under reduced pressure. Remaining residue was analyzed by ^1H NMR spectroscopy to obtain the ratio of terephthalaldehyde/**P**₁/**P**₂ components and to estimate the ratio **P**₁/**P**₂ of (E)-methyl 3-(4-formylphenyl)acrylate to dimethyl-1,4-phenylenediacrylate products. This estimation was based on the integrals of the characteristic signals in NMR spectra: for terephthalaldehyde and **P**₁, we compared -CHO proton shifts (protons colored blue in the spectra below); to estimate the **P**₁/**P**₂ ratio, we compared doublets of olefinic protons (protons colored green in the spectra below).

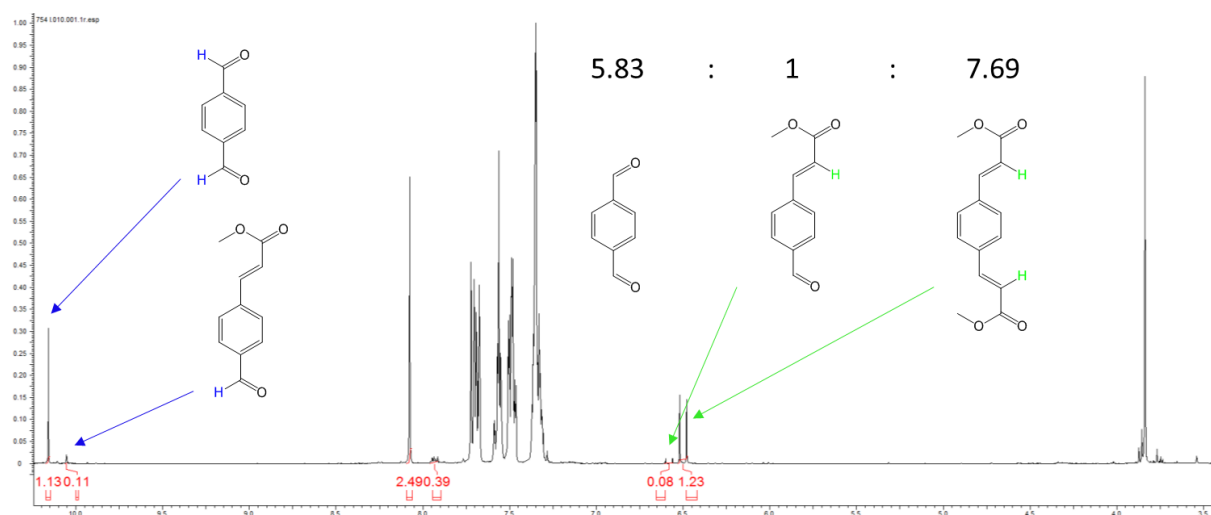


Figure S17. ^1H NMR spectrum of reaction mixture (for 0.25 M ($\mathbf{3}'$) + ($\mathbf{3}''$)) solution and ~ 1.5 mm layer thickness) with characteristic signals integrated and indicated by arrows and with the ratios of substrate to products (i.e., terephthalaldehyde : P_1 : P_2) indicated in the upper-right portion.

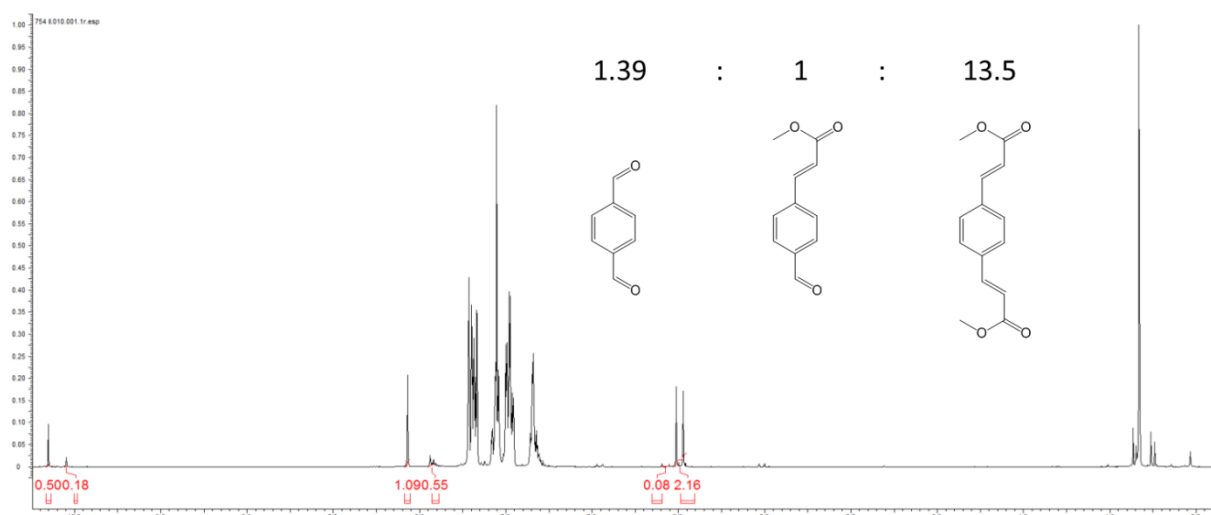


Figure S18. ^1H NMR spectrum of reaction mixture (for 1 M ($\mathbf{3}'$) + ($\mathbf{3}''$)) solution and ~ 1.5 mm layer thickness) with characteristic signals integrated and with the ratios of substrate to products (i.e., terephthalaldehyde : P_1 : P_2) indicated in the upper-right portion.

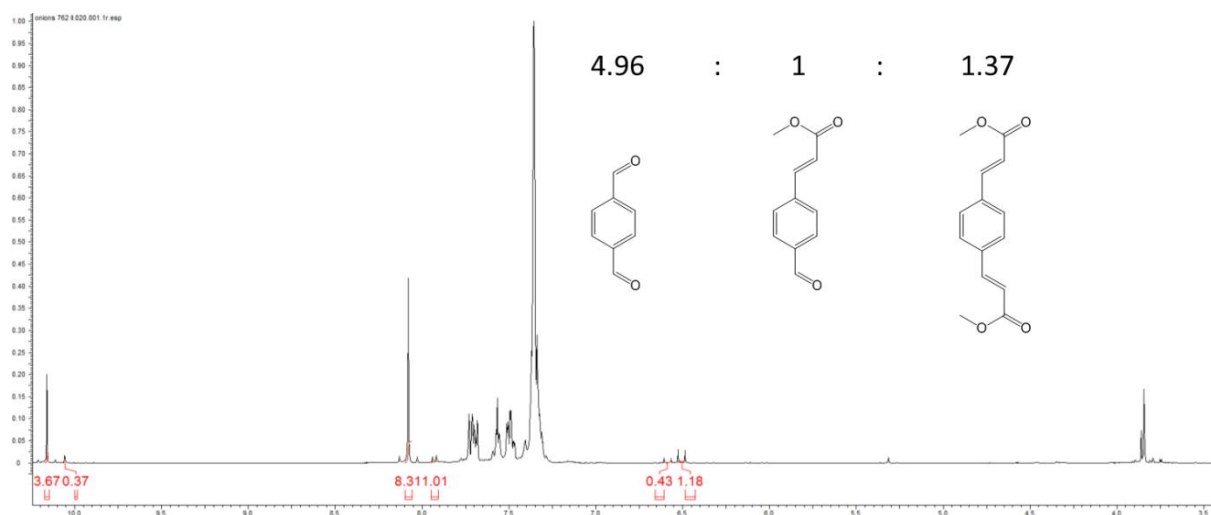


Figure S19. ^1H NMR spectrum of reaction mixture (for 0.1 M (**3'**) + (**3''**) solution and ~ 1.5 mm layer thickness) with characteristic signals integrated and with the ratios of substrate to products (i.e., terephthalaldehyde : **P**₁ : **P**₂) indicated in the upper-right portion.

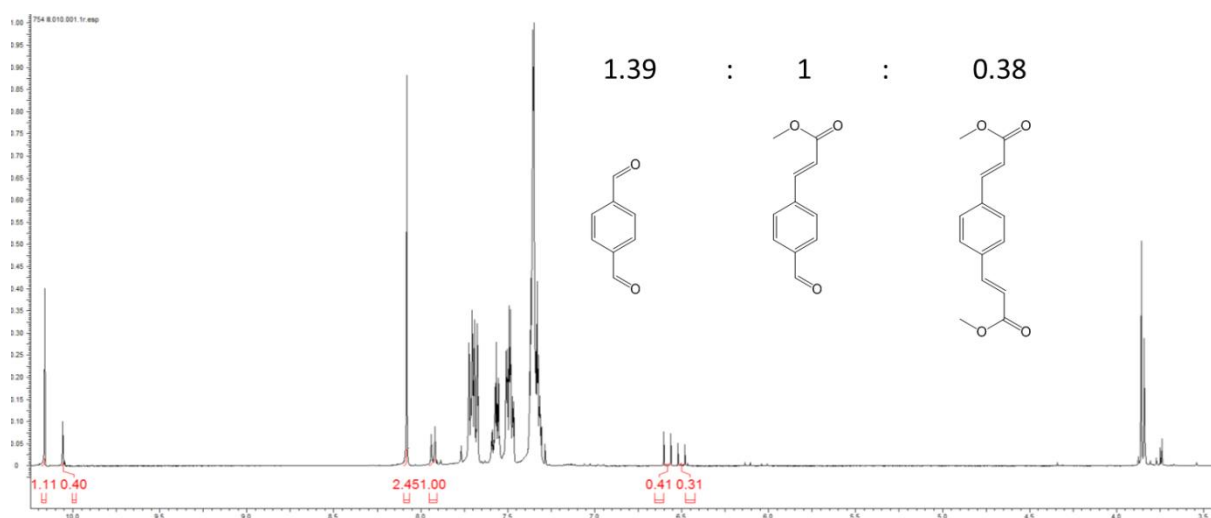


Figure S20. ^1H NMR spectrum of reaction mixture (for 0.1 M (**3'**) + (**3''**) solution and 3.5-4.5 mm layer thickness) with characteristic signals integrated and with the ratios of substrate to products (i.e., terephthalaldehyde : **P**₁ : **P**₂) indicated in the upper-right portion.

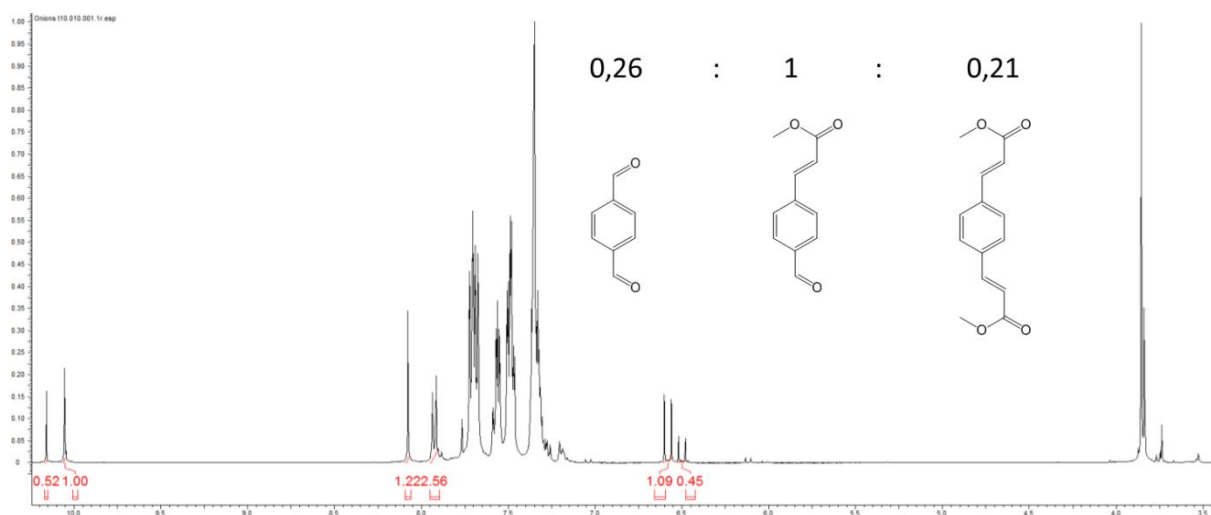


Figure S21. ^1H NMR spectrum of reaction mixture (for 0.25 M (**3'**) + (**3''**) solution and 3.5-4.5 mm layer thickness) with characteristic signals integrated and with the ratios of substrate to products (i.e., terephthalaldehyde : **P**₁ : **P**₂) indicated in the upper-right portion.

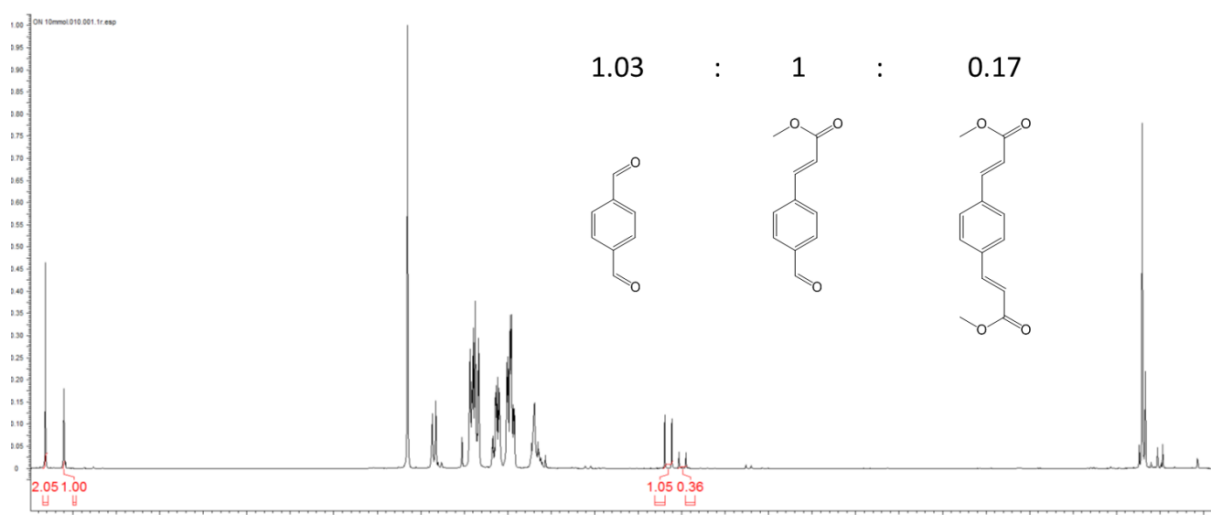


Figure S22. ^1H NMR spectrum of reaction mixture (for 1 M (**3'**) + (**3''**) solution and 3.5-4.5 mm layer thickness) with characteristic signals integrated and with the ratio of substrate to products (i.e., terephthalaldehyde : **P**₁ : **P**₂) indicated in the upper-right portion.

S5.3. Three-phase, three-step synthesis of *N*-(4-ethoxyphenyl)acetamide (phenacetin; main-text Figure 3d).

Three solutions were initially prepared in three separate flasks: (**1**): Ethyl iodide (1 mL, 12.4 mmol) was dissolved in tetrachloroethylene (14 mL); (**2**): Potassium carbonate (1.0 g, 7.24 mmol) and tetrabutylammonium bromide (32 mg, 0.1 mmol, 17 %mol) were dissolved in water (15 mL); (**3**): Aminophenol (66 mg, 0.6 mmol) was sonicated in ethyl acetate (15 mL) and then acetic anhydride (57 μl , 0.6 mmol) was added thereto. These solutions were injected into the Teflon-quartz reactor shown in **Figure S1c** (inner diameter 74 mm, height 15 mm), rotating at 850 rpm, in the (**1**), (**2**), (**3**) order. The layered system thus created was kept rotating at room temperature (suitable for the acylation step) for 2 h and then heated by an externally positioned

heat gun to ca. 60 °C for 20 h. During that time, the rotational speed of the container was changing every 5 s between 850 and 750 rpm to cause slight mixing of neighboring layers near their interfaces (but not of non-neighboring layers). Afterwards, the contents were transferred into a separator, organic phase was separated and water phase was extracted with dichloromethane (2×). Combined extracts were dried over MgSO₄ and solvents evaporated under reduced pressure. Crude mixture was purified by flash column chromatography on silica gel (hexane/ethyl acetate, 1:1, v/v) to obtain phenacetin (51,5 mg, 48 % sequence yield) as a white powder.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.38 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.01 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.40 (t, 3H). ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): 168.2, 155.9, 130.8, 121.9, 114.7, 63.7, 24.3, 14.8. MS *m/z*: 180.102 (M⁺).

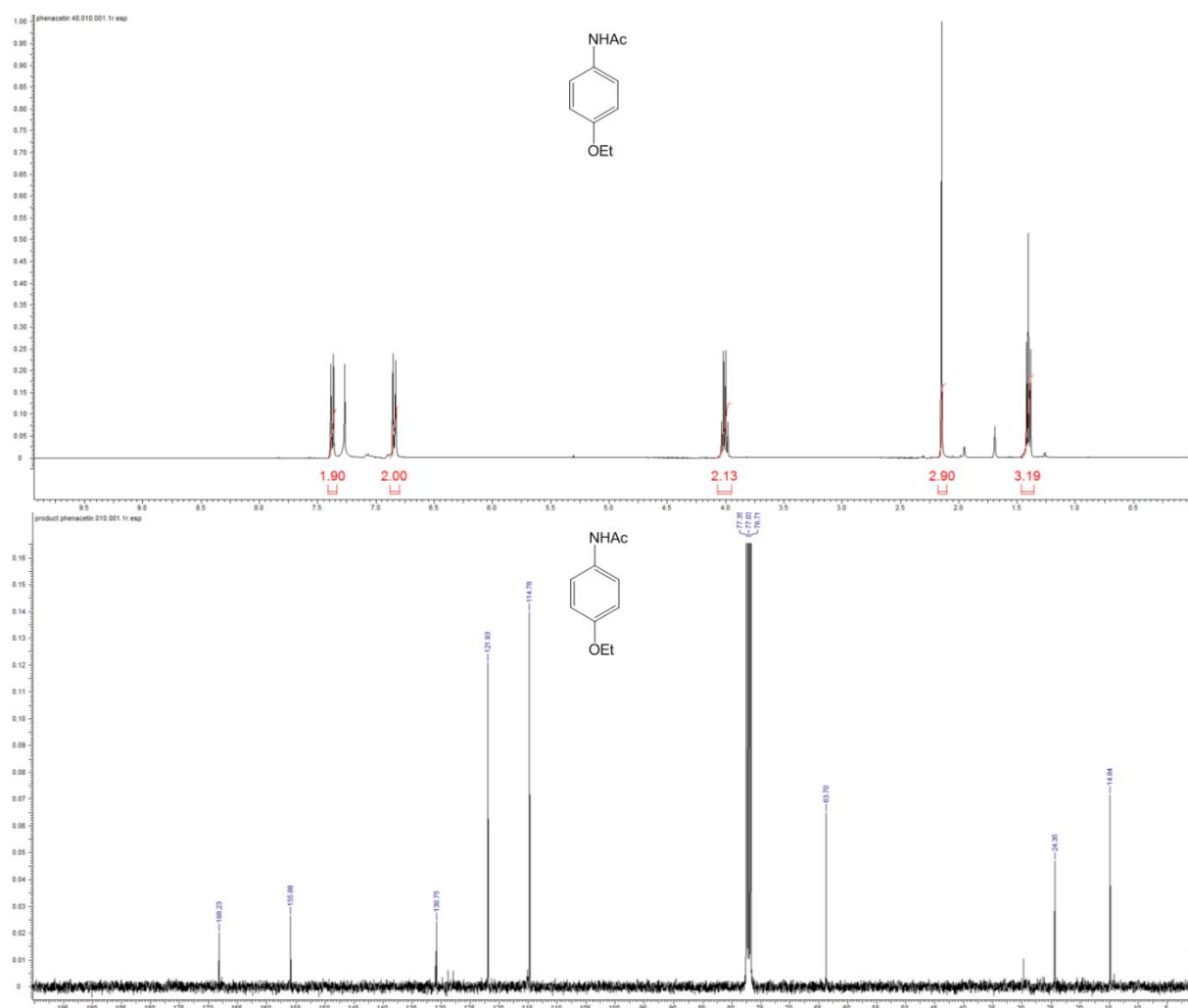


Figure S23. ¹H NMR (top) and ¹³C NMR (bottom) spectra of phenacetin.

S5.4. Four-phase, four-step synthesis of 4-(2,2-dichloro-N-methylacetamido)phenyl furan-2-carboxylate (diloxanide furoate; main-text Figure 3e).

Five solutions were initially prepared in five separate flasks: **(1)**: furoyl chloride (100 μ L, 1 mmol) in chloroform (5 mL), **(2)**: MgSO₄ (3.17 g), K₂CO₃ (138 mg, 1 mmol) and tetrabutylammonium bromide (32 mg, 0.1 mmol) in water (9 mL), **(3)**: dichloroacetyl chloride (96 μ L, 1 mmol) in a 1/9 v/v mixture of hexane/dichloromethane (9 mL), **(4')**: 4-(methylamino)phenol sulfate (172 mg, 0.5 mmol) in water (4 mL), and **(4'')**: potassium carbonate (138 mg, 1 mmol) in water (1 mL). These solutions were injected into the Teflon-quartz reactor shown in **Figure S1c** (inner diameter 75 mm, height 11 mm), rotating at 850 rpm, starting from **(1)** (most dense) to **(4)** (least dense). Right after addition and formation of all layers, the reactor's controller was set to change its rotational speed between 750 and 850 rpm every 5 seconds to allow slight mixing in the vicinity of layer boundaries (but not between non-neighboring layers). The mixing was essential and in its absence only traces of product were obtained. The system was kept on rotation for 4 h and afterwards, the chloroform phase (**1**) and small fraction of phase (**2**) were removed – when the system was still rotating – through an internal channel below the reactor's bottom surface. Both phases were diluted with water and dichloromethane and then water phase was extracted by dichloromethane twice. Combined extracts were dried with MgSO₄ and solvents evaporated under vacuum. Final compound, diloxanide furoate, was isolated after flash column chromatography (chloroform/methanol = 99/1, v/v) as a white solid (83 mg, 25 %).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.74-7.71 (m, 1H), 7.43 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.37 (s, 4H), 6.64 (dd, *J* = 3.6, 1.7 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 3.37 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 164.0, 156.4, 150.4, 147.7, 143.4, 139.2, 128.4, 123.6, 120.2, 112.4, 63.5, 38.7. MS *m/z*: 328.2 (M).

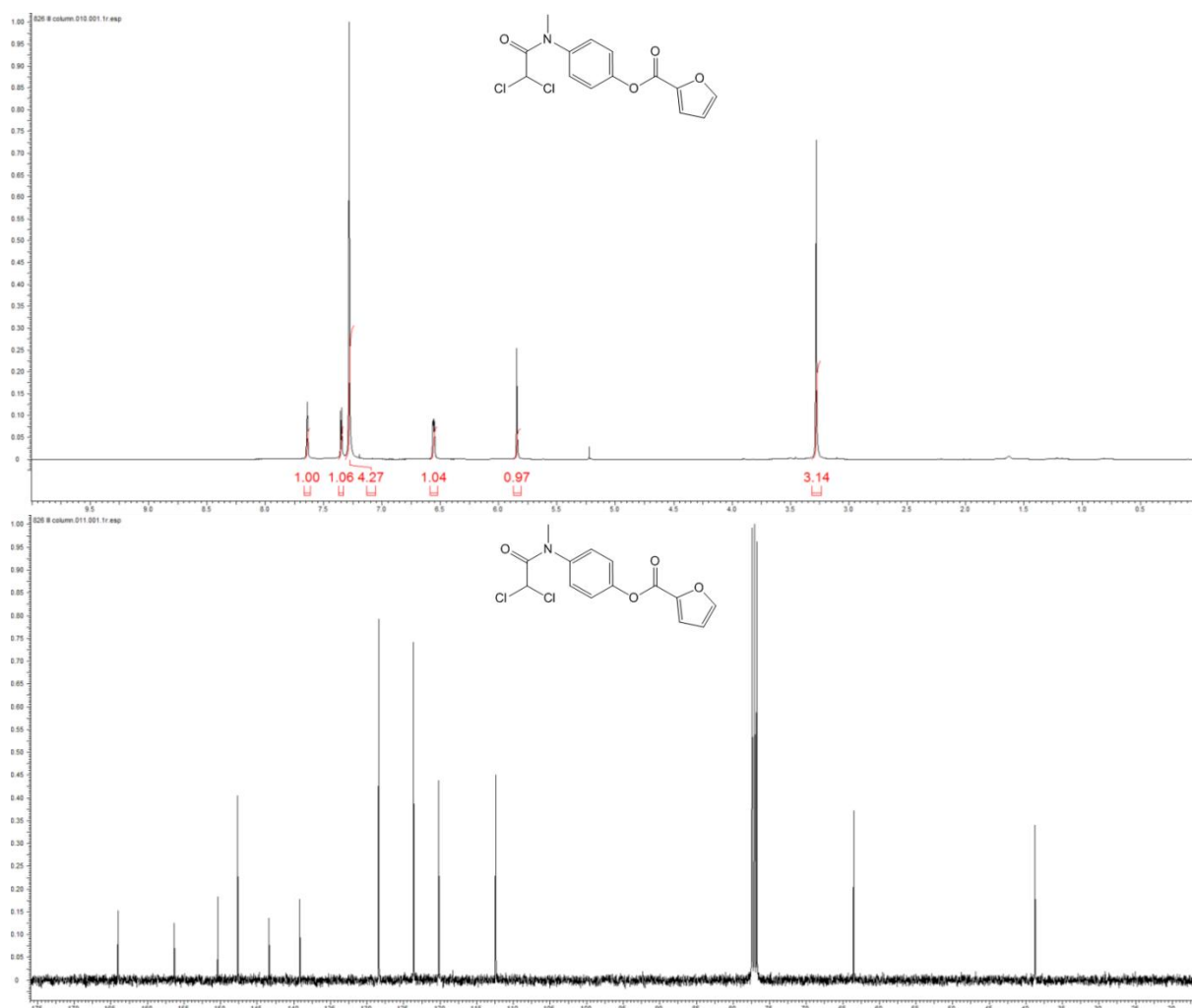


Figure S24. ^1H NMR (top) and ^{13}C NMR (bottom) spectra of diloxanide furoate.

S5.5. An unsuccessful three-phase synthesis of aripiprazole.

Naturally, organic or nano syntheses in layered liquids are not free of limitations, in large part due to our inability to *a priori* predict intermediates' solubility in different layers. As a case in point, **Figure S25** shows a non-standard synthesis – through a water-soluble spiro salt – of an antipsychotic/antidepressant blockbuster drug, Aripiprazole (AbilifyTM; ref. ⁶). In this design, the synthesis of the spiro compound proceeded smoothly in the outer CHCl_3 phase (**1**) and the product gradually transferred to the 84:16 $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ phase (**2**). In the third, innermost phase (**3**), we planned to place the 7-hydroxy-3,4-dihydroquinolinon, but it turned out that the compound is not soluble in any organic solvent apart from DMSO, DMF, or methanol – all of which are miscible with phase (**2**), thus ruining the envisioned sequence. Unfortunately, methods for accurate solubility predictions in different solvents are not yet available and their development remains one of interesting challenges beyond our current work and with repercussions for physical-organic and medicinal chemistries at large.

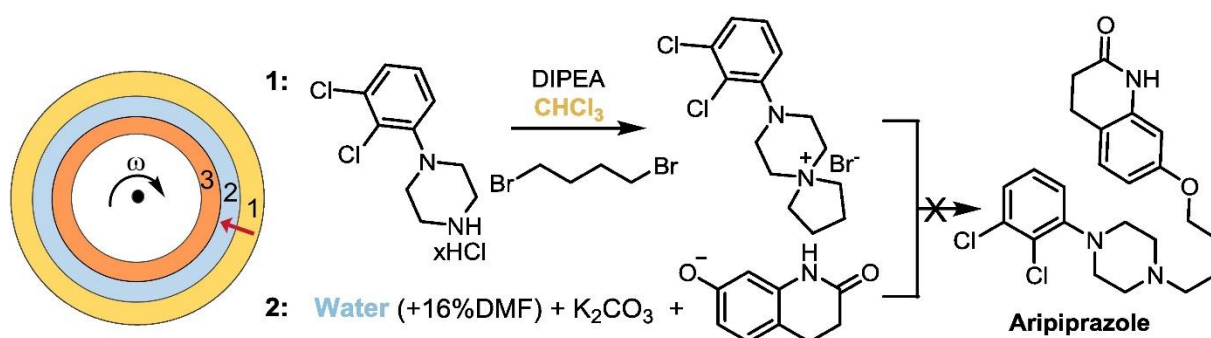


Figure S25. Scheme of a failed three-step, three-phase synthesis of aripiprazole. Red arrow in the inset scheme indicates that in this example, the sequence was intended to progress from the outermost to the innermost phases.

S5.6 Simultaneous acid/base separation of a quinine 4-nitrobenzoate salt (main-text Figure 4a).

Three solutions were initially prepared in three separate flasks: (1) NaOH (200 mg) was dissolved in 10 mL of aqueous solution of $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (density 1.16 g/mL); (2) quinine (227.1 mg, 0.70 mmol) and 4-nitrobenzoic acid (117.1 mg, 0.70 mmol) were dissolved in chlorobenzene (12 mL) with addition of DMSO (0.9 mL); (3) 10 mL of 0.5 M $\text{HCl}_{(\text{aq})}$. These solutions were injected into the Teflon-quartz reactor shown in **Figure S1c** (inner diameter 74 mm, height 15 mm), rotating at 950 rpm, in the (1), (2), (3) order. The layered system was kept rotating at room temperature for 1 h. During that time, the rotational speed of the container was changing every 10 s between ~1100 and 1130 rpm to promote mixing. Afterwards, the layers were collected and 2.0 mL portions of every layer were evaporated in round bottom flasks. All residues were dissolved in 0.7 mL $\text{DMSO-}d_6$ for NMR analysis – to each sample, 0.08 mL *t*-BuOH was also added as an internal standard to determine quantities of separated compounds.

S5.7 Selective extraction of phenylalanine from a fermentation-like broth (main-text Figure 4b).

Three solutions were initially prepared in three separate flasks: (1) phenylalanine (Phe) (99.1 mg, 0.6 mmol) was dissolved in 10 mL of water solution of $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ containing glucose (162.1 mg, 0.9 mmol) and lactic acid (81.1 mg, 0.9 mmol) (pH = 3.8); (2) bis(2-ethylhexyl) phosphate (D2EHPA) (0.70 mL) was dissolved in the mixture of *n*-hexane (4 mL) and tetrachloroethylene (3 mL); (3): 10 mL of 1.0 M $\text{HCl}_{(\text{aq})}$. These solutions were injected into the Teflon-quartz reactor shown in **Figure S1c** (inner diameter 74 mm, height 15 mm), rotating at 950 rpm, in the (1), (2), (3) order. The layered system was kept rotating at room temperature for 24 h. During that time, the rotational speed of the container was changing every 10 s between ~1100 and 1130 rpm to promote mixing. 2 mL samples of layer (3) were collected after 1 h, 2 h, 3 h, 4.5 h, 7 h and 24 h. After collection of each sample, layer (3) was replenished with 2 mL of 1.0 M $\text{HCl}_{(\text{aq})}$. Collected samples were placed in round bottom flasks, evaporated and the residues were dissolved in 0.7 mL $\text{DMSO-}d_6$ for NMR analysis – to each sample, 0.08 mL *t*-BuOH was also added as an internal standard to determine the yield of Phe extraction. Extraction of Phe to layer (3) was 76% after 7 h and 77% after 24 h.

S5.8 Selective extraction of phenylalanine from a complex, 11-component mixture (Figure S26).

Three solutions were initially prepared in three separate flasks: **(1)**: phenylalanine (Phe) (99.1 mg, 0.6 mmol) was dissolved in 10 mL water solution of $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ containing glucose (216.2 mg, 1.2 mmol), 2-propanol (18.0 mg, 0.3 mmol), allyl alcohol (69.7 mg, 1.2 mmol), cholic acid (2.5 mg, 0.006 mmol), (1*S*)-(+)-10-camphorsulfonic acid (1.4 mg, 0.006 mmol), citric acid (63.0 mg, 0.3 mmol), D-(-)-tartaric acid (90.0 mg, 0.6 mmol), D-(-)-ribose (90.0 mg, 0.6 mmol), LiCl (25.4 mg, 0.6 mmol) and $\text{KF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (56.5 mg, 0.6 mmol) (pH = 3.8); **(2)** bis(2-ethylhexyl) phosphate (D2EHPA) (0.70 mL) was dissolved in the mixture of *n*-hexane (4 mL) and tetrachloroethylene (3 mL); **(3)** 10 mL of 1.0 M $\text{HCl}_{(\text{aq})}$. These solutions were injected into the Teflon-quartz reactor shown in **Figure S1c** (inner diameter 74 mm, height 15 mm), rotating at 950 rpm, in the **(1)**, **(2)**, **(3)** order. The layered system was kept rotating at room temperature for 7 h. During that time, the rotational speed of the container was changing every 10 s between ~1100 and 1130 rpm to promote mixing. After 7 h, 2 mL sample of layer **(3)** was collected, placed in a round bottom flask, evaporated, and the residue dissolved in 0.7 mL $\text{DMSO-}d_6$ for NMR analysis – to this sample, 0.08 mL *t*-BuOH was also added as an internal standard to determine the yield of Phe extraction. Extraction of Phe to layer **(3)** was 62% after 7 h.

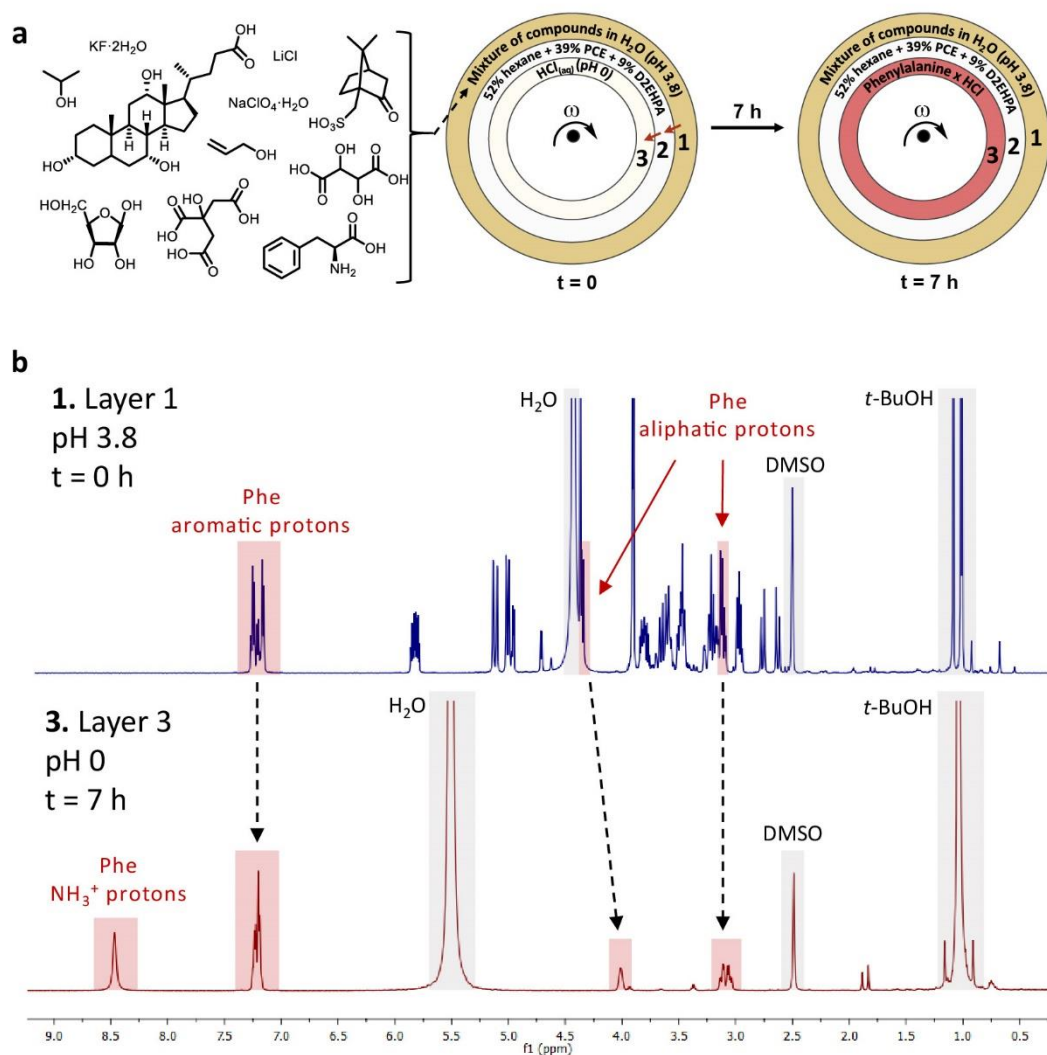


Figure S26. Phenylalanine dissolved in acidic (pH 3.8) aqueous layer 1 containing complex mixture of 11 chemicals is selectively extracted into aqueous layer 3 via organic layer 2

supporting the D2EHPA shuttle. a, The compositions of layers are: (**1**) phenylalanine, glucose, 2-propanol, allyl alcohol, cholic acid, (1*S*)-(+)-10-camphorsulfonic acid, citric acid, D-(-)-tartaric acid, D-(-)-ribose, LiCl, NaClO₄·H₂O and KF·2H₂O (densest and outermost, pH = 3.8); (**2**) bis(2-ethylhexyl) phosphate (D2EHPA) (0.70 mL) in the mixture of *n*-hexane (4 mL) and tetrachloroethylene (3 mL); (**3**) 10 mL of water HCl solution (pH ~ 0). **b, top spectrum:** ¹H NMR (DMSO-*d*₆) of the mixture of compounds in layer **1** at *t*₀ of the experiment; *bottom spectrum:* ¹H NMR (DMSO-*d*₆) of phenylalanine (Phe) extracted to phase **3** after 7 h.

S5.9. Synthesis of fluorescent silver nanoclusters and their three-layer phase transfer (main-text Figure 5a-f).

Polydisperse silver nanoparticles were prepared by adding, in sequence, 1.2 mL of 50 mM GSH, 0.8 mL of freshly prepared reducing solution (26.6 mg NaBH₄ and 49.5 mg NaOH in 10 mL H₂O) and 1 mL of 20 mM AgNO₃ to 12 mL of water under intense stirring / homogenization). Intervals between adding subsequent reagents to the reaction mixture, as well as times of pipetting them, were kept as short as possible. The reaction mixture turned dark brown immediately after addition of AgNO₃ and was subsequently stirred for at least 5 hours during which time its color became more pale.

The first transfer of nanoparticles to the organic phase was performed as follows: 15 mL of water phase with nanoparticles was mixed with 25 mL of CTAB/NaOH in ethanol (25 mM CTAB, 4 mM NaOH). After no more than one minute, 25 mL of a 64:36 wt% toluene/chloroform mixture was added and vigorously shaken with water phase / CTAB / NaOH in a closed container. Subsequently, the container was left for phase separation or, if the reaction was performed in a rotary chamber, was centrifuged.

For the second phase transfer (in the rotary chamber, see main-text **Figure 5a-f**), 25 mL of organic phase containing Ag nanoclusters was placed in the rotary chamber rotating with moderate speed (high enough to make a concentric layer, typically 1500 rpm), followed by gentle injection of 25 mL of “densified TMAD/TMAH”, prepared by mixing of 100 mM TMAD in water with 1 M TMAH in water and Ludox SM-30 in volumetric proportion 80:8:12 (80 parts 100 mM TMAD in water, 8 parts 1 M TMAH in water and 12 parts of Ludox SM-30, which is a 30 wt% suspension of colloidal SiO₂ in water). TMAD was prepared by mixing equal volumes of 1 M solution of decanoic acid in methanol with 1 M solution of TMAH in methanol and removing methanol and water in a rotary evaporator to obtain dry, white, extremely hygroscopic powder with smell of gray soap (upon contact with humid air, this powder immediately turns into a viscous pulp). Note: “Gentle injection” means that solution of TMAD/TMAH/Ludox is slowly added through the holes in the side walls of the rotor in such a way that it does not reach the (inner) interface of organic phase and air (to prevent contamination of the final water/AgNC phase that later forms).

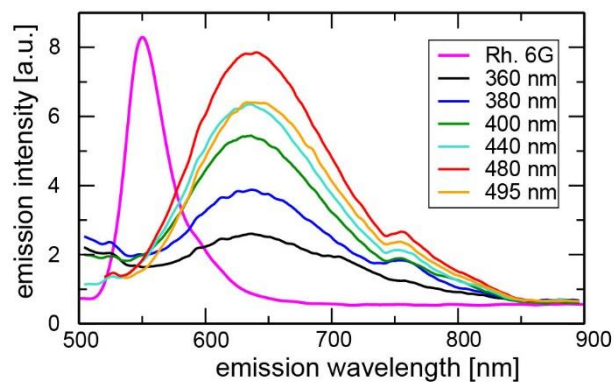


Figure S27. Fluorescence spectra of the collected nanoclusters in water with varying excitation wavelength and, as a reference, spectrum of 30 nM ethanolic solution of rhodamine 6G (excited with 467 nm).

Section S6. Experiments with bacteria.

S6.1. The use of rotors in bacterial extractions and communication. Rotating liquid stacks also open interesting avenues for applications in biotechnology and for studying chemical communication between biological components confined to different layers and separated by selective liquid “membranes”. In this context, **Figure S28a,c** is a proof-of-the concept three-layer system in which the outer layer **1** of fluorinated oil FC-40 serves as a reservoir of oxygen⁷ (pre-saturated prior to experiment to an extent corresponding to the amount of oxygen in 55 mL of air or 1.1 L of fresh broth under standard conditions), layer **2** houses a genetically modified strain of *E. coli* DH10B carrying plasmid BBa_J72114-BBa_J72090⁸, and the innermost layer **3** is tributyrin with 33.3 vol.% of *n*-dodecane. The bacteria produce violacein, a violet dye and potent antibiotic of commercial and therapeutic interest⁹⁻¹¹. As the time-course images (quadrants I-IV in the **Figure S28c**) show, the produced violacein is systematically extracted into layer **3**, while mixing, caused by cyclic changes of ω_c , keeps the bacteria dispersed within the layer. However, upon stopping the stirring – as shown in quadrants II and III – bacteria are pushed to the **1/2** interface (see also **Figure 2b**). This controllable and reversible pelleting at the interface can be used for replenishing the broth and reusing the bacteria, which – in contrast to traditional extraction methods which lyse the bacteria¹² – remain viable in layer **2** (see **Supplementary Section 6.4**).

Moreover, similar systems can be used to study communication between physically separated but chemically-connected cells. **Figure S28d** shows a five-layer rotating stack in which “sender” *E. coli* MG1655/pAmCyan bacteria contained in aqueous broth layer **4** produce an acylhomoserine lactone (AHL, here 3-oxo-C6-homoserine), a quorum sensing hormone that diffuses through an oil layer **3** to a density-adjusted, aqueous layer **2** containing “receiver” *E. coli* DH5a/pSB401 bacteria (outermost FC-40 layer **1** serves as oxygen reservoir, and the silicone oil layer **5** prevents evaporation and contamination while also permitting oxygen transport; for all technical details, see **Supplementary Section 6.2**). The receiver bacteria then respond to the incoming AHL by expressing bioluminescent proteins to produce light. In effect, the liquid membrane supports selective molecular communication while preventing bacterial cross-contamination, which can be a problem in traditional agar-based systems housing co-existing bacterial colonies. Beyond current experiments, we envision how adjusting membrane width could be used to control the flux of “messenger” molecules (cf. **Figure 3a-c**) or how such liquid membranes could be helpful in studying communication between bacteria grown in different broths (e.g., with mutually incompatible antibiotics or at different pH, supporting bacteria of different acidophilicities).

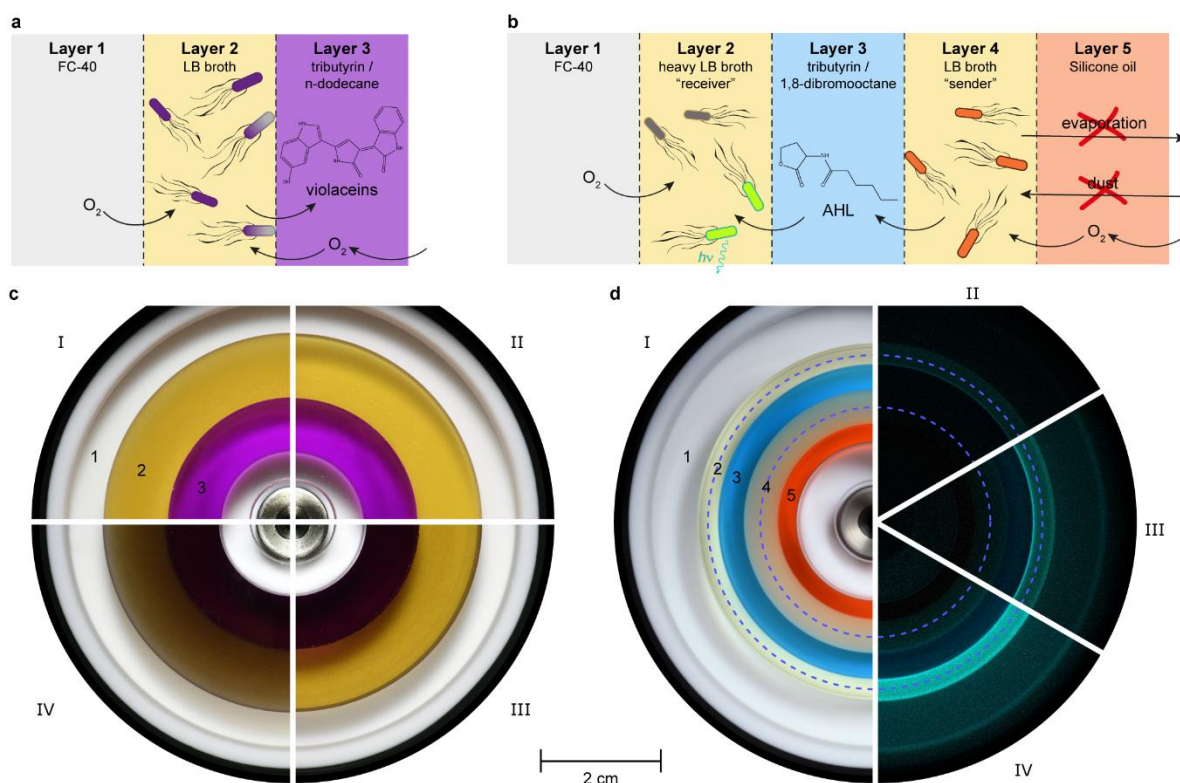


Figure S28. Applications of rotating liquid stacks in biology. **a**, Scheme and experimental demonstration, **c**, of extraction of violacein from live bacteria (*E. coli* dVio, in layer marked as **2**), as well as reversible transitions between suspension of bacteria in the broth and sedimentation at the interface. Quarters numbered I to IV correspond to, respectively, 15:00, 15:02, 23:30 and 24:00 hrs. Rotor performed inertial stirring by varying ω_c (1500-1125 rpm every 6 seconds) for almost all this time expect for 2 min periods preceding photographs II and III, so that the quarters on the left show mixed state and on the right – centrifugated state (i.e., with bacteria collected at the **1/2** interface). Similar to **Figure 2b**, transitions between these states are reversible and do not harm bacteria, see also **Supplementary Sections 6.4-6.5** for details. *Note*: IV is significantly more turbid than I due to the growths of bacterial culture from 15 to 23 hrs. **b**, Scheme and **d**, images of a five-layer system supporting communication between “sender” (*E. coli* MG1655/pAmCyan, layer **4**) and “receiver” (*E. coli* DH5a/pSB401, layer **2**) bacteria. For details on layer compositions and bacterial growth, see **Supplementary Section 6.2**. Left semicircle (I) shows the rotor in ambient light at the beginning of experiment. Wedge-shaped regions marked II, III, IV are cut from subsequent photographs performed in the darkness at times: 9:00 (II), 15:00 (III), and 16:00 (IV) hrs. At time 15:30 about half of FC-40 in the outermost layer **1** was replaced by freshly oxygenated FC-40. In response to increased oxygen the bacteria produce more light and become distributed more uniformly. Photographs II to IV were taken with identical camera settings, so that the bioluminescence at different times can be compared directly. Superimposed dashed lines help to trace both bacteria-containing layers.

S6.2. Bacterial strains and growth.

The bacterial strains used in this study are listed in **Table S1**. All strains were grown from 25% glycerol stocks stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ on Lysogeny Broth (LB) agar plates containing the appropriate antibiotics. Each strain was struck out on LB agar plates and grown at $37\text{ }^\circ\text{C}$ overnight. A single colony was transferred to a sterile 70 mL cell culture flask with vented cap (BD Falcon 353109),

containing 10 mL of LB broth (Difco, USA, or Sigma, product number L3522) with the antibiotic added. This culture was grown at 30 °C and 120 rpm overnight before being diluted (1% v/v, 200 µL) into 20 mL of fresh LB broth in a sterile 125 mL polycarbonate Erlenmeyer flask with vented cap (Triforest Labware, product FPC0125S or FBC0125S). The diluted culture was grown under the same conditions for 20 to 24 hours, and further used as the inoculum for the multilayer system. While working with LB broths from different sources, we found that their colors vary from canary yellow (for Difco) to almost transparent (for LB broth prepared by mixing tryptone, yeast extract and sodium chloride, all from Sigma Aldrich) – and it affects the color of layers in the figures. Difco LB was used for **Figure S28c**, Sigma Aldrich LB for layer **4** in **Figure S28d** and custom made LB for **Figure 2b**. Broths for layers of increased density were obtained by mixing concentrated aqueous solution of tryptone (10% w/w) and yeast extract (5% w/w) with OptiPrep (60% w/v water solution of iodixanol, Sigma Aldrich) in such a proportion that volumetric content of both nutrients in the final broth was the same as in standard LB broth. Osmolarity of such a mixture was then adjusted to 410 mOsm/L by adding NaCl. Nontoxicity and fitness of this heavy medium was tested in separate experiments – see **Section S6.3**.

S6.3. Construction of the AHL-producing plasmid.

To construct the 3-oxo-C6-homoserine lactone-producing plasmid pAmLux7, an 821-bp region containing the *luxI* gene of pTD103luxI_sfGFP¹³ was amplified by PCR using the following primers:

LuxI-FBI (GCAGGATCCATTAAAGAGGAGAAAGG) and

LuxI-REI (GTGGAATTCCGTATTACCGCCTTTG), where the restriction sites for *Bam*HI and *Eco*RI are shown underlined, respectively. This PCR product was digested using these restriction enzymes. In parallel, the *cfp* gene within pAmCyan (Clontech, USA) was digested out using the same restriction enzymes and replaced with the *luxI* fragment from above, placing the *luxI* expression under the control of the *lac* promoter (P_{lac}) present in pAmCyan. Several clones using *E. coli* MG1655 as the host elicited strong bioluminescent response from *E. coli* DH5 α /pSB401 and one was designated as *E. coli* MG1655/pAmLux7. The presence of the *luxI* gene within this plasmid was confirmed both by PCR and sequencing.

Table S1.

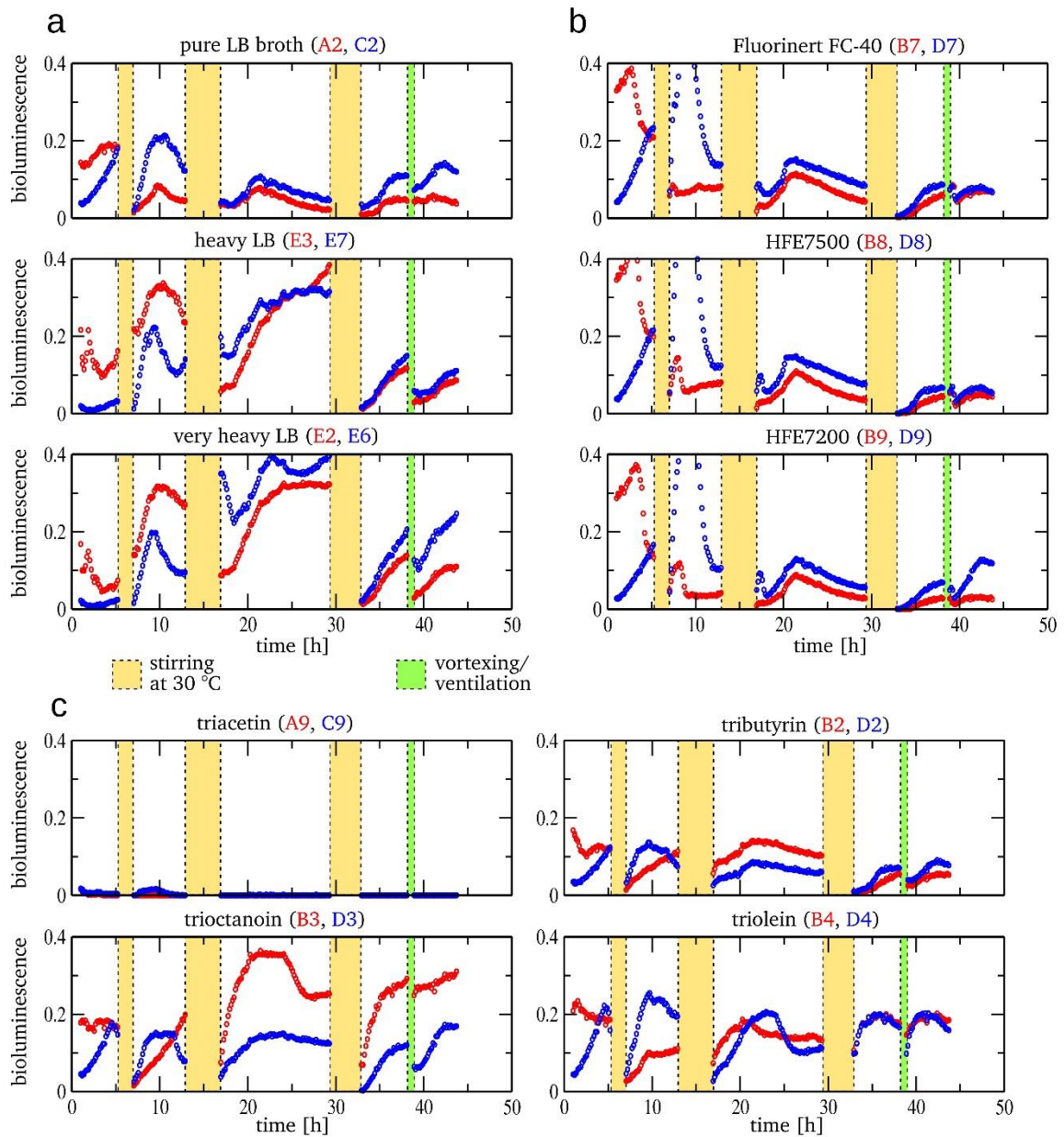
Strains	Description	Reference
<i>E. coli</i> MG1655	Common lab strain	
<i>E. coli</i> DH10B	Common lab strain	
<i>E. coli</i> DH5 α	Common lab strain	
Plasmids		
BBa_J72114-BBa_J72090	<i>vioABCDE</i> ; Deoxyviolacein; Cm ^R	8
pUCDK	<i>luxCDABE</i> ; Bioluminescence; Amp ^R	14
pAmCyan	CFP-producing plasmid; Amp ^R	Clontech
pTD103luxI_sfGFP	<i>luxI/luxR</i> plasmid; Kan ^R	13
pAmLux7	AHL producing plasmid; Amp ^R	This study
pSB401	AHL sensing plasmid; Bioluminescence; Tet ^R	15

S6.4. Toxicity tests of oils and weighing agents.

Both oils and weighing agents for aqueous phases intended for multilayer systems with live microorganisms must be non-toxic for these organisms. In contrast to systems used in general demonstrations and chemical syntheses, significant regulation of broth density cannot be accomplished by simply adding an inorganic salt (due to problems with osmotic pressure). Polymers could be used instead, but at required concentrations, their solutions become impractically viscous. Thus, our attention turned to substances used in density gradient centrifugation of cells and organelles: sodium polytungstate, iohexol (Nycodenz) and iodixanol (Optiprep). Among them, only Optiprep supported long-term (over a day) culturing of bacteria. Its effect on bioluminescence of growing cultures of *E. coli* pUCDK is summarized in **Figure S29a**. The remaining panels, **Figure S29b-g**, show growing the same bacteria on standard LB broth in contact with different non-aqueous liquids, considered for use as water-immiscible layers in multilayer systems, including: fluorinated liquids as oxygen reservoirs, lipids for extraction of hydrophobic compounds, or as intermediate layers between different bacteria, silicone oils for preventing evaporation and contamination by dust, assuring undisturbed transport of oxygen and evacuation of gaseous metabolites (solubility of these gases in low MW polydimethylsiloxanes is almost as high as in fluorinated liquids). Alkanes and brominated oils were tested for potential use mainly as weighing agents, to modify the density of lipid layers. They could be used for any other purpose as well, yet the solubility of most substances of interest – including violacein – is much lower in these oils than in short-chain lipids.

Initially we planned to perform these toxicity tests in standard well plate reader capable of measuring bioluminescence. Unfortunately, standard plastic plates with black walls were not resistant to oils. Moreover, vapors of volatile oils could affect bacteria in neighboring wells. Therefore we used 5×8 vial rack with tightly closed, 40 mL glass vials as “wells”, placed in the field of view of a camera in a dark room and photographed every 10 minutes from the bottom – then the averaged intensity of exposed pixels was used as a measure of bioluminescence in **Figure S29**. For testing toxicity of oils, vials were filled with 5 mL broth with bacteria and 1 mL of the tested oil (remaining 34 mL of air in each vial was, after 38 hours, replaced with pure oxygen). Red points in **Figure S29b-g** are for bacteria taken from 6-hours-old culture in LB broth (i.e., a culture that was diluted 1:100 from overnight culture in fresh LB-broth with

ampicillin six hours before starting the toxicity test and then incubated in shaking incubator for 6 hours at 30 °C). Blue points are for bacteria diluted 1:100 from the solution used for red points (i.e., from 6-hours-old culture diluted 1:100 just before starting toxicity tests). For testing broths of different density (**Figure S29a**), sterile broths intended for the test were poured into aforementioned vials (5 mL per vial) and mixed with 1 mL of 6-hours-old bacteria (red dots) or with 1 mL of the same bacteria diluted 1:100 immediately before the test (blue dots). During the photo session in the dark room at 24 °C bacteria were not shaken, however, at intervals indicated in **Figure S29** by yellow rectangles, the whole rack with vials was moved to a shaking incubator and incubated at 30 °C and 120 rpm – during these sessions, photographs were not taken. All photographs from the recorded session were then collected into a video movie, available as **Supplementary Movie S9**. The differences between large and small initial concentrations of bacteria are much more meaningful than just few hours of time delay in growth, because water-oil interface may trap bacteria, so that for low concentration it is much more likely that the vast majority of bacteria are trapped and their further growth becomes linear rather than exponential. Among the tested substances, triacetin, 1,6-dibromohexane, n-octanol and tetralin were toxic, whereas the remaining ones did not show toxic effects – bacteria were able to grow in media with these liquids, producing similar or larger amount of bioluminescence than the control culture in pure LB-broth (**Figure S29a**).



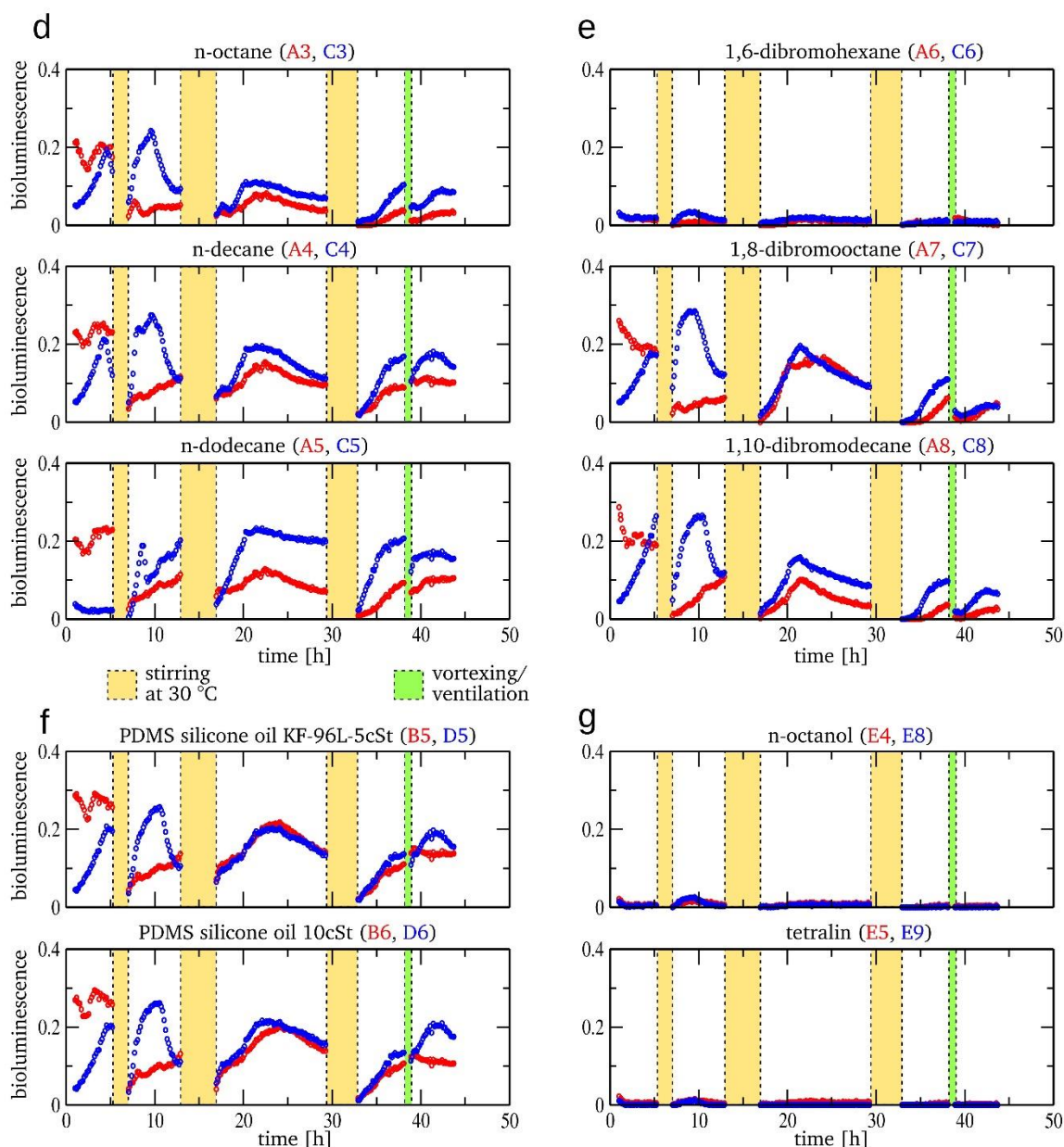


Figure S29. Toxicity assay of modified broths and oils. Evolution of bioluminescence of *E. coli* pUCDK grown in: **a**, plain LB broth and its heavy counterparts with density tuned by Optiprep to 1160 g/L (heavy LB) and 1226 g/L (very heavy LB), and in plain LB accompanied by water immiscible phases: **b**, fluorinated oils, **c**, triglycerides, **d**, linear alkanes, **e**, dibrominated linear alkanes, **f**, silicone oils, and **g**, others. Red color stands for larger initial concentration of bacteria: 5 mL bacteria from 6-hours-old culture (shaking incubator, LB, 30 °C) per 1 mL of the tested substance. Blue color: 50 μ L bacteria in 4.95 mL fresh LB broth per 1 mL of the tested substance. Data points are collected during the periods without stirring, at room temperature, interspersed with periods of shaking in the incubator (120 rpm, 30 °C – yellow color) or emulsifying in vortex emulsifier after replacing gas in the vials by oxygen.

S6.5. Assessment of viability of bacteria grown in rotating multilayer system.

In order to assess viability and general characteristics of bacteria grown in rotating multilayer systems, we performed various control experiments, in which bacteria originating from the same mother culture were cultured in parallel in the rotor and in a classical shaking incubator, and then compared for physical appearance (presence and amount of macroscopic structures, clumping), turbidity, ability to establish new cultures upon dilution in fresh media, and level of oxygenation. We did not observe any substantial differences between these cultures, except for poorly mixed systems with low initial concentration of bacteria – these grew slower in multilayer systems, because most bacteria got trapped at interfaces and their growth curves were linear rather than exponential¹⁶. In well-mixed systems, however, bacteria could be removed from interfaces by accelerations/deceleration cycling in a fully reversible way – as demonstrated in the main-text **Figure 2b**. Such repeated cycles of sedimentation on interfaces and redispersion in broth did not affect viability of bacteria, even in the case of bacteria producing violacein (whose interaction with oils is stronger due to the presence of hydrophobic spots of violacein on their surfaces) and even if the oil dissolves their violacein, as in **Figure S28a,c**. Below, in **Figure S30**, we demonstrate the viability of dVIO bacteria measured in two different ways: by evolution of turbidity in a colony inoculated by bacteria removed from the rotor (diluted 1:10 with fresh LB broth), and by counting their CFU on agar plates – both compared to control culture that was started from the same bacteria under identical conditions, but grew in a shaking incubator. Both methods showed only small differences between post-extractive and control culture and hence similar viability of bacteria cultured in the rotor and by traditional means, in a shaking incubator. Yet another set of experiments compared pH of supernatants obtained by centrifugating bacteria (i) from the rotor vs. (ii) grown in a shaking incubator. No significant differences were observed. Of note, in this simple way cultures may be tested for aeration: mature *E. coli* cultures in LB broth are acidic when grown in anaerobic conditions, neutral for poor aeration (and poor evacuation of gaseous metabolites), and basic (pH between 8.5 and 9 – and both the compared cultures had pH in this range) for good aeration¹⁷.

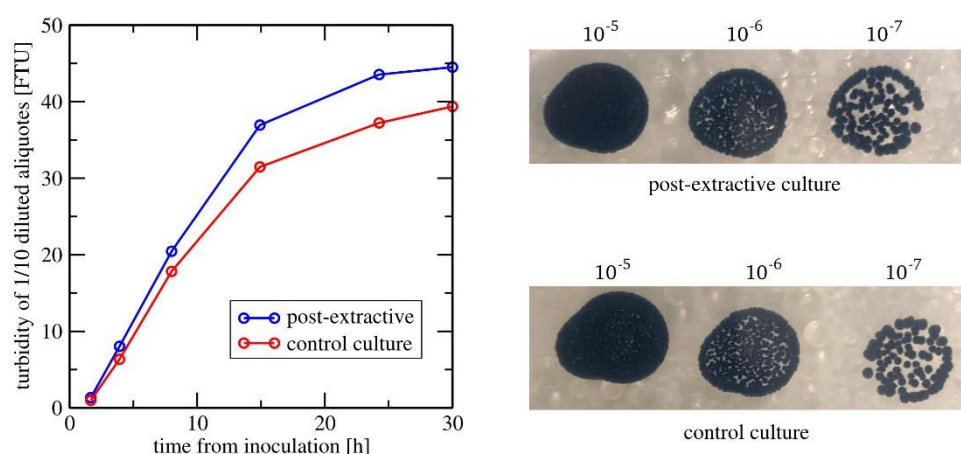


Figure S30. Testing the viability of bacteria removed from the rotor. Mother culture of *E.coli* dVIO was divided into two subcultures, and one of them was grown in the rotor, as in **Figure S28a,c**, while the second one was grown at the same temperature in a shaking incubator (30 °C, 120 rpm). Samples of both cultures were collected after this experiment and used simultaneously for inoculation of new cultures (1:100 in LB broth) in a shaking incubator

(growth of these cultures was monitored by turbidity measurements – shown in the left panel) and for serial dilutions followed by spotting on LB agar plates with chloramphenicol (right panel). None of these two methods showed significant differences in viability of post-extractive bacteria from rotor and from the control culture.

S6.6. Efficiency of extraction of violacein from living bacteria.

In this section, we quantify amounts of violacein transferred from bacteria cultures (see **Figure S28a,c** and description in the **Section S6.1**) to water immiscible solvents during extraction. Blue curve in the left panel of **Figure S31** corresponds to absorbance of phase **3** removed from the rotor after experiment shown in **Figure S28a,c** and diluted 1:10 v/v with ethanol (same for other solutions analyzed in this figure). By comparing to a known concentration of violacein (black curve in the right panel, 200 mg/L before dilution), we can estimate that the concentration of violacein in phase **3** in quadrant IV of Figure 5 was 163 mg/L – not far away from maximum available concentration, 245 mg/L, for this solvent (2:1 v/v tributyrin/ n-dodecane), represented by brown curve in the right panel of **Figure S31**. Pure tributyrin (grey curve) would allow dissolving up to 429 mg/L, yet its density is too close to the density of broth. Other methods of conservative extractions (i.e., extractions preserving viability of bacteria) yielded 128 mg/L for the same solvent (light blue curve), yet used in a less effective way: by shaking two volumes of control bacteria culture (of the same origin and age as the culture in the rotor) with one volume of oil, or 25 mg/L for similar shaking with 2:1 v/v mixture of trioctanoin and n-dodecane (green curve).

For comparison, “lethal extractions” to bacteriotoxic solvents of high violacein solubility (here: n-butanol, 2-pentanol and triacetin, represented by pink, orange and red curves, correspondingly) all gave similar concentration of violacein – 350 mg/L (for 2:1 volume ratio of broth to solvent, the same as for all the other extractions shown in this graph, including extraction in the rotor), yet the bacteria were killed during extraction and could not be reused. Unlike the most often applied extractions to ethanol, all the aforementioned methods are much cleaner in terms of amount of impurities transferred to the final solution of violacein (none of the spectra in the left panel of **Figure S31** required filtration or purification of the solution), yet their high boiling points may be a hindrance in further processing.

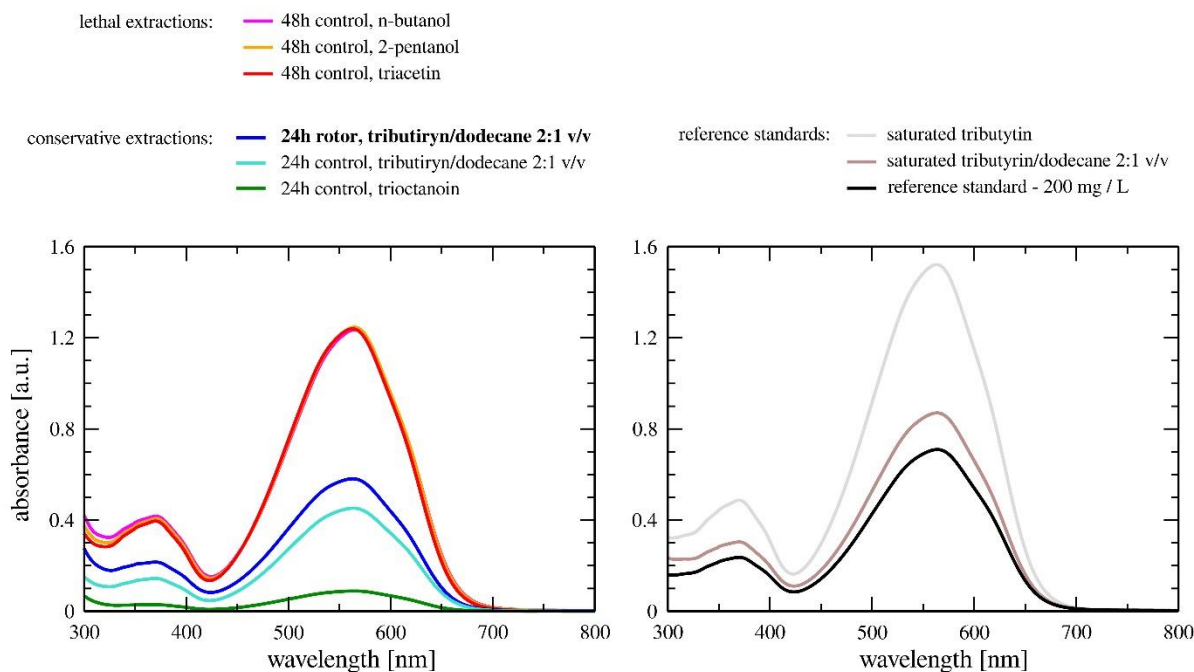


Figure S31. Absorbance spectra of extracted violacein solutions. All absorbances are measured after dilution of evaluated solution 1:10 v/v in anhydrous ethanol. **Left panel** shows absorbances of violacein extracts obtained 48 hours after inoculation of cultures (for “lethal extractions” in which bacteria are lysed by solvents) or 24 hours after inoculation for “conservative” extractions, in which bacteria do not lose their viability. **Right panel** shows reference standards on the same scale of absorbance: saturated solutions of violacein in solvents used for extractions and – as an absolute reference – 200 mg/L of violacein in anhydrous ethanol (due to the mentioned dilution, actual concentration during measurement of absorbance is 10 times lower, 20 mg/L).

Section S7. Captions to supplementary movies.

All videos were recorded under stroboscopic light, synchronous (or almost synchronous) with both the speed (frames per second) of the camera and the rotational speed of the chamber, ω_c (or if the rotational speed was changing to accelerate mixing, with one of the limit values). In this way, the apparent rotation of the chamber, $\omega_{app} = \omega_c - \omega_{str}$, was much slower than actual rotation, ω_c , or the frequency of stroboscope flashes, ω_{str} .

Movie S1. Sequential loading of liquids by deposition on the floor of the rotating chamber. Video (at 10× acceleration) of injecting seven pair-wise immiscible liquids (specified in the description of **Figure S1**) into an initially empty rotor. Liquids are dispensed from syringes pointing towards the floor of the rotating chamber. Due to the combination of centripetal and Coriolis forces, droplets or jets of these liquids are spread over a large area of the bottom surface of the chamber before contacting the liquid layers already formed – this spreading prevents thin layers from being penetrated/disrupted by impact of larger droplets, but also poses a risk of depositing liquid or solid residues on the floor (and ceiling) of the chamber, especially when volatile solvent evaporate from droplets. This technique of building multilayer liquid assembly is suitable for very thin layers, but suboptimal in terms of avoiding cross-contamination (between liquids that are not intended for direct contact) or keeping strictly prescribed amounts of liquid from escaping the chamber by evaporation.

Movie S2. Demonstration of different ways of delivering or drawing liquids to and from a rotating chamber. Four different techniques are shown: **(i)** The same as in **Movie S1**, but real-time: shown is the process of adding one layer to three existing layers. **(ii)** Supplying the liquids through a system of branching channels, shown in **Figure 1c** and discussed in the main text. The newly introduced liquid moves rapidly through the unoccupied part of the main, straight channel (flowing mostly along one of the side walls of this channel) and, when in the occupied part, turns to the first branch whose outlet is submerged (i.e., already covered by previous liquids in the chamber). This method is cleaner than **(i)**, but less general, as the minimum thickness of layer is limited by the distance between outlets of branching channels. **(iii)** Injecting the liquid to one of the already existing layers via single channel embedded in the floor of the chamber. The liquid is pipetted into the O-ring sealed port at the axis of the rotor. **(iv)** Using the same port to withdraw liquids from the chamber.

Movie S3. Mixing the liquids within layers, without disrupting the layers. When the chamber rotates with constant velocity, the multilayer assembly of liquids rotates as a rigid body, limiting any mixing within layers to slow diffusion. However, rapid changes in the rotational speed of the rotor (shown is a rapid decrease of the speed from 3600 rpm to about 3000 rpm and increase back to 3600 rpm) combined with the inertia of the rotating liquids, creates eddies that mix the content of layers, yet keep the integrity of stack (unless the acceleration of the rotor is too high).

Movie S4. Demonstration of a very thin liquid layer forming between two immiscible phases of both larger and smaller densities. Real-time video of three mutually immiscible liquids (FC-40, hexadecane and orange dyed water – see main-text **Figure 3c,d**) in the rotor (the same as in **Figure 2a-d**) accelerating from 0 to 3600 rpm within about 2 seconds. Initially, all three phases (including the tiny amount of water) disperse due to high shear forces, yet

almost as soon as the rotor stops accelerating, the liquids form a three-layer system, with thickness of the water layer ~150 μm .

Movie S5. Injecting a new, immiscible layer into the middle of an existing, continuous (single-phase) density gradient. Initially, the rotor contains two mutually miscible liquids: dibromomethane (density 2.48 g/mL) and tetralin (1,2,3,4-tetrahydronaphthalene, 0.973 g/mL); their mutual boundary is already blurred due to diffusion and convective mixing caused by flows of liquid during filling of the chamber (by pipetting them sequentially on the floor of the rotor rotating at 1080 rpm). The new, immiscible liquid is delivered through the hole in the floor, located at the presumed mid-point of the original density gradient, i.e., at the zone of density ~1.73 g/mL, matching the density of the newly injected liquid (water solution of CsCl dyed with Alizarin Red S). This new liquid is initially fragmented, but as its volume increases, it assembles into a full ring separating the lighter and heavier parts of the original organic phase.

Movie S6. Injecting a new, miscible liquid into the middle of an existing continuous density gradient. The system is as in **Movie S5** but the injected fluid of density ~1.73 is miscible with both the original organic liquids forming the initial density gradient (in fact, this newly pumped liquid is 50/50 v/v mixture of these liquids dyed with Oil Red EGN). The ring of the injected liquid is thinner than in the case of **Movie S5** but due to diffusion, it slowly fades out, as seen at the end of the movie (forwarded by 20 minutes).

Movie S7. Converting one-phase system into five-layer two-phase system and further operations (addition and mixing) on one of its layers. The movie complements experiments described in **Section S2** and **Figures S3** and **S4**. It is divided into 11 short sections preceded by intertitles and corresponding one-to-one to panels of **Figure S3a-f** and **Figure S4a-e**.

Movie S8. Collage of three videos (5 times accelerated) showing continuous, reversible transition from stack to concentric layers and back to stack. The experimental system as in **Figure S13a**, with different ways of illumination: narrow back light (on the left), wide back light (center) and stroboscopic light (on the right) synchronized to the camera framerate - 25 frames per second. In real time rotation speed varies from 0 to 5576 rpm within 150 seconds and then comes back to 0 within another 150 seconds.

Movie S9. Toxicity test of density-modified broths and oils considered for the use with bacteria in rotating layers. Detailed information is provided in **Section S6.3**. Labels enumerating vials in the video are also given above graphs in **Figure S29**; red color for larger and blue for smaller initial concentration of bacteria.

Section S8. Supplementary references

1. Sharpe, P. T. *Methods of cell separation*. (Elsevier Science, 1988). doi:10.1007/978-1-4684-3662-4.
2. de Gennes, P.-G. *et al.* Capillarity: Deformable Interfaces. in *Capillarity and Wetting Phenomena* (eds. de Gennes, P.-G., Brochard-Wyart, F. & Quéré, D.) 1–31 (Springer New York, 2004). doi:10.1007/978-0-387-21656-0_1.
3. Borra, E. F. The liquid-mirror telescope as a viable astronomical tool. *J. R. Astron. Soc. Canada* **76**, 245–256 (1982).
4. Tremblay, G. & Borra, E. F. Optical tests of a 37-m-diameter liquid mirror: behavior under external perturbations. *Appl. Opt.* **39**, 5651 (2000).
5. Hickson, P. *et al.* The Large Zenith Telescope: A 6 m Liquid-Mirror Telescope. *Publ. Astron. Soc. Pacific* **119**, 444–455 (2007).
6. Wu, Y. J. Heterocycles and Medicine. A Survey of the Heterocyclic Drugs Approved by the U.S. FDA from 2000 to Present. in *Progress in Heterocyclic Chemistry* vol. 24 1–53 (Elsevier Ltd, 2012).
7. Junker, B. H., Hatton, T. A. & Wang, D. I. C. Oxygen transfer enhancement in aqueous/perfluorocarbon fermentation systems: I. experimental observations. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 578–585 (1990).
8. Kittleson, J. T., Deloache, W., Cheng, H. Y. & Anderson, J. C. Scalable plasmid transfer using engineered P1-based phagemids. *ACS Synth. Biol.* **1**, 583–589 (2012).
9. Choi, S. Y., Yoon, K. H., Lee, J. Il & Mitchell, R. J. Violacein: Properties and production of a versatile bacterial pigment. *Biomed Res. Int.* **2015**, 465056 (2015).
10. Ferreira, C. V. *et al.* Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood* **104**, 1459–1464 (2004).
11. Rodrigues, A. L. *et al.* Microbial production of the drugs violacein and deoxyviolacein: Analytical development and strain comparison. *Biotechnol. Lett.* **34**, 717–720 (2012).
12. Rettori, D. & Durán, N. Production, extraction and purification of violacein: An antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 685–688 (1998).
13. Prindle, A. *et al.* A sensing array of radically coupled genetic ‘biopixels’. *Nature* **481**, 39–44 (2012).
14. Mitchell, R. J., Hong, H. N. & Gu, M. B. Induction of kanamycin resistance gene of plasmid pUCD615 by benzoic acid and phenols. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 1125–1131 (2006).
15. Winson, M. K. *et al.* Construction and analysis of luxCDABE -based plasmid sensors for investigating N -acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing . *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 185–192 (1998).
16. Deng, J., Molaei, M., Chisholm, N. G. & Stebe, K. J. Motile Bacteria at Oil–Water Interfaces: *Pseudomonas aeruginosa* . *Langmuir* (2020) doi:10.1021/acs.langmuir.9b03578.

17. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. & D'Ari, R. Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* **189**, 8746–8749 (2007).

May 2022 volume 7 no. 5
www.nature.com/natrevmats

nature reviews materials





Materials, assemblies and reaction systems under rotation

Bartosz A. Grzybowski^{1,2,3}✉, Yaroslav I. Sobolev¹, Olgierd Cybulski¹
and Barbara Mikulak-Klucznik^{1,3}

Abstract | When liquids or solid materials rotate, they impart centrifugal and/or shear forces. This Review surveys rotary devices and systems in which such forces control small-scale flows, self-organization phenomena, materials synthesis or chemical reactivity at molecular and macro-molecular levels. Centrifugal forces directed away from the rotation axis enable various separations or lab-on-a-disc systems and can shape interfaces or deposit thin films of functional materials. When these forces act on particles lighter than the rotating fluid, they can provide the basis for colloidal crystallization or trapping; when the direction of rotation changes, they can simulate microgravity conditions and affect motility patterns of living organisms. Shear forces, by contrast, can promote crystallization, couple to molecular-scale assembly and affect its chiral outcomes. Combining centrifugal and shear forces is useful in establishing rotating reactors to accelerate reaction kinetics, modulate chemical reactivity, enable multistep syntheses or support complex extractions. Through these and other examples, we illustrate that rotating reaction vessels can enable new types of chemical experimentation, with outcomes that are not always understood. We argue that rotating systems for studying such processes will become more common given advances in remotely controlled sensors and spectrometers that can monitor the contents of rotating vessels.

Although rotational motion and effects associated with it are ubiquitous — such as in shaping astronomical objects^{1,2}, driving cars or trains, or powering various turbines, drills, machines or biological and molecular motors^{3,4} — they have, arguably, been used more sparingly in modern materials synthesis or as a means to control material systems or assemblies. Examples such as glass-blowing or wheel-throwing pottery, in which a material's cohesion is balanced against centrifugal forces to impart axisymmetrical shapes, the use of lathes to shave off thin flakes of material to produce solids of revolution, or rifling to impart rotational motion on cannonballs (to stabilize them in flight) constitute historical technological advances but do not embody modern materials science. Instead, one could argue that rotating systems are today often abandoned in favour of easier-to-control stationary architectures. A case in point is the historical progression from gramophone records to magnetic tape recorders, CD-ROMs and hard disk drives — all rotating — to modern solid-state information storage devices^{5,6} in which there are no rotating parts. Yet, a conclusion that rotary systems are outdated and not useful is, we believe, premature. The main thesis of this Review is that, by making liquid or solid materials rotate, one can impart forces — either

centrifugal or shear — that could be hard to apply and/or maintain in stationary frames of reference and, through such forces, control the outcomes of chemical processes or the properties and internal organization of various material systems. As we show, these forces are useful in a range of modern technologies, including separations, the fabrication of defect-free silicon wafers, the preparation of high-performance solar cells or extremely large telescope mirrors and lab-on-a-disc microfluidics. In addition, we discuss less known and more recent examples in which centrifugal and shear forces serve to establish chemical reactors and extractors, increase reaction yields, accelerate crystal growth, enable chiral selection, simulate microgravity conditions and can be engineered to impose confinement and drive dynamic self-assembly in two or three dimensions. These newer results point to exciting and, in many cases, still unexplored opportunities that arise when chemical processes or the synthesis or assembly of materials are transplanted from static into rotating settings.

In this Review, we focus on situations in which an entire homogeneous material or all discrete components of a material system of interest are under globally imposed rotation and, thus, experience centrifugal and/or shear forces. We start with a synopsis of the physics

¹IBS Center for Soft and Living Matter, Ulsan National Institute of Science and Technology, Ulsan, Republic of Korea.

²Department of Chemistry, Ulsan National Institute of Science and Technology, Ulsan, Republic of Korea.

³Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland.

✉e-mail: nanogrybowski@gmail.com

<https://doi.org/10.1038/s41578-021-00404-x>

10. Oświadczenia współautorów

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, **2020**, 588, 83-88.

Był następujący:

Wykonałam syntezę totalną (*R,R,S*)-takamonidyny, według analizy retrosyntetycznej wygenerowanej przez program Chematica/Synthia™, począwszy od reakcji usunięcia pomocnika chiralnego RAMP aż do uzyskania końcowego produktu (*R,R,S*)-takamonidyny. Brałam udział w pracach nad pisaniem publikacji.

Cybulski, O., Dygas, M., Mikulak-Klucznik, B., Siek, M., Klucznik, T., Choi, S. Y., Mitchell, R. J., Sobolev, Y. I., Grzybowski, B. A. Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation. *Nature*, **2020**, 586, 57-63.

Był następujący:

Brałam udział w pracach nad opracowaniem procesu ekstrakcji kwasowo-zasadowej soli organicznych z wykorzystaniem rotacyjnego reaktora do syntezy i separacji. Z wykorzystaniem tego samego rotacyjnego reaktora, opracowałam metodę zautomatyzowanej, selektywnej separacji fenyloalaniny z użyciem przenośnika kationowego D2EHPA. Brałam udział w pracach nad pisaniem publikacji.

Grzybowski, B. A., Sobolev, Y. I., Cybulski, O., Mikulak-Klucznik, B. Materials, assemblies and reaction systems under rotation. *Nature Reviews Materials*, **2022**, 7, 1-17.

Był następujący:

Brałam udział w pracach nad pisaniem publikacji ze szczególnym uwzględnieniem sekcji dotyczących reaktorów SDR (ang. *spinning disc reactors*) i reaktorów VFD (ang. *vortex fluidic devices*) oraz części dotyczącej przeprowadzenia syntezy organicznej oraz separacji z wykorzystaniem rotacyjnego reaktora do syntezy i separacji opisanego w sekcji *Multilayered rotating systems for chemical synthesis and separations*.

Mgr inż. Barbara Mikulak-Klucznik



Powyższy opis wkładu doktorantki w powstanie artykułów jest zgodny ze stanem faktycznym.



Prof. dr Bartosz A. Grzybowski

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, **2020**, *588*, 83-88.

Był następujący:

Opracowałem koncepcję programu Chematica i byłem odpowiedzialny za całokształt rozwoju projektu. Prowadziłem nadzór merytoryczny nad syntezą (*R,R,S*)-takamonidyny oraz przeprowadzeniem testu Turinga, a także za napisanie manuskryptu z uwzględnieniem wkładu poszczególnych współautorów.

Cybulski, O., Dygas, M., Mikulak-Klucznik, B., Siek, M., Klucznik, T., Choi, S. Y., Mitchell, R. J., Sobolev, Y. I., Grzybowski, B. A. Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation. *Nature*, **2020**, *586*, 57-63.

Był następujący:

Byłem odpowiedzialny za całokształt rozwoju projektu. Prowadziłem nadzór merytoryczny nad eksperymentami opisanymi w artykule oraz byłem odpowiedzialny za napisanie manuskryptu z uwzględnieniem wkładu poszczególnych współautorów.

Grzybowski, B. A., Sobolev, Y. I., Cybulski, O., Mikulak-Klucznik, B. Materials, assemblies and reaction systems under rotation. *Nature Reviews Materials*, **2022**, *7*, 1-17.

Był następujący:

Byłem odpowiedzialny za napisanie manuskryptu z uwzględnieniem wkładu poszczególnych współautorów.

Prof. dr Bartosz A. Grzybowski



Warszawa, 28.02.2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, 2020, 588, 83-88.

Był następujący:

Brałam udział w pracach nad synteza lamellozydyny A.

Dr Patrycja Gołębiowska



February 10, 2022

TO WHOM IT MAY CONCERN

Statement of contribution

Hereby, I would like to claim my contribution to the paper:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, **2020**, 588, 83-88.

I synthesized dauricine.

Dr. Alison A. Bayly

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alison Bayly', with a stylized, cursive script.

Warszawa, 5.02.2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, **2020**, 588, 83-88.

Był następujący:

Brałem udział w pracach nad syntezą lamellozydyny A.



dr Oskar Popik

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, 2020, 588, 83-88.

Był następujący:

Brałem udział w pracach nad syntezą takamonidyny począwszy od reakcji hydrolizy laktonu **11**, do reakcji asymetrycznego alkilowania Endersa związku **15** (bez usunięcia pomocnika chiralnego RAMP). Brałem też udział w pracach nad rozwojem bazy reakcji programu Chematica oraz w pracach nad pisaniem manuskryptu.

Cybulski, O., Dygas, M., Mikulak-Klucznik, B., Siek, M., Klucznik, T., Choi, S. Y., Mitchell, R. J., Sobolev, Y. I., Grzybowski, B. A. Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation. *Nature*, 2020, 586, 57-63.

Był następujący:

Brałem udział w zaprojektowaniu oraz wykonaniu eksperymentów związanych z ekstrakcją chininy.

Dr inż. Tomasz Klucznik



Oświadczenie

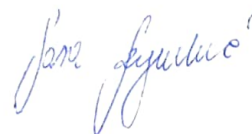
Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, **2020**, 588, 83-88.

Był następujący:

Byłam jedną z głównych osób odpowiedzialnych za całokształt rozwoju programu Chematica. Brałam udział w implementacji testu Turinga oraz w pracach nad pisaniem manuskryptu.

Dr inż. Sara Szymkuć



Warszawa, 5.02.2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, 2020, 588, 83-88.

Był następujący:

Byłam jedną z głównych osób odpowiedzialnych za rozwój bazy reakcji programu Chematica.
Brałam też udział w implementacji testu Turinga.

Ewa Gajewska
Dr inż. Ewa P. Gajewska

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, 2020, 588, 83-88.

był następujący:

- byłem jedną z głównych osób odpowiedzialnych za opracowanie algorytmów programu Chematica. Brałem też udział w przygotowaniach testu Turinga.

Piotr Dittwald
Dr Piotr Dittwald

Oświadczenie

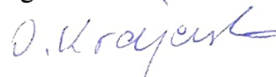
Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, 2020, 588, 83-88.

Był następujący:

Określiłam strukturę i konfigurację względną związków **(R,R)-21**, **(R,S)-21** oraz **(R,R,S)-takamonidyny**.

Dr Olga Staszewska-Krajewska



Warszawa, 22.01.2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, 2020, 588, 83-88.

Był następujący:

Przeprowadziłem statystyczną analizę wyników testu Turinga.

Dr inż. Wiktor L. Beker



Warszawa, 05.02.2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, 2020, 588, 83-88.

Był następujący:

Byłem jedną z głównych osób odpowiedzialnych za opracowanie algorytmów programu Chematica.

Dr Tomasz Badowski

Tomasz Badowski

Karl A. Scheidt, Ph.D.
Professor
Department of Chemistry
Department of Pharmacology, Feinberg School of Medicine
Executive Director, Newcures Accelerator

Northwestern

Office address:
3613 Silverman Hall
2170 Campus Drive
Evanston, IL 60208

Phone: 847-491-6659
Email: scheidt@northwestern.edu
Group: <http://sites.northwestern.edu/scheidt/>

Mailing address:
Department of Chemistry
2145 Sheridan Road
Evanston, Illinois 60208

February 5, 2022

TO WHOM IT MAY CONCERN

Statement of contribution

Hereby, I would like to indicate my primary contribution to the paper:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, **2020**, 588, 83-88.

I supervised the synthesis of dauricine.

Sincerely,



Karl Scheidt
Professor of Chemistry,
Professor of Pharmacology, Feinberg School of Medicine

Warszawa, 28.02.2022

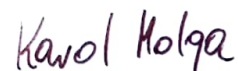
Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, **2020**, 588, 83-88.

Był następujący:

Byłem jedną z głównych osób odpowiedzialnych za całokształt rozwoju programu Chematica. Brałem udział w implementacji testu Turinga oraz w analizie jego wyników, a także w pracach nad pisaniem manuskryptu.



Mgr inż. Karol Molga



Warszawa, 31 stycznia 2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, 2020, 588, 83-88

był następujący:

prowadziłem nadzór merytoryczny nad realizacją syntezy lamellozydyny A.

Jacek Młynarski

May 5, 2022

TO WHOM IT MAY CONCERN

Statement of contribution

Hereby, I would like to indicate my contribution to the paper:

Mikulak-Klucznik, B., Gołębiowska, P., Bayly, A. A., Popik, O., Klucznik, T., Szymkuć, S., Gajewska, E. P., Dittwald, P., Staszewska-Krajewska, O., Beker, W., Badowski, T., Scheidt, K. A., Molga, K., Młynarski, J., Mrksich, M., Grzybowski, B. A. Computational planning of the synthesis of complex natural products. *Nature*, 2020, 588, 83-88.

I supervised the synthesis of dauricine.



Dr. Milan Mrksich

TO WHOM IT MAY CONCERN

Statement of contribution

Hereby, I would like to claim my contribution to the papers:

Cybulski, O., Dygas, M., Mikulak-Klucznik, B., Siek, M., Klucznik, T., Choi, S. Y., Mitchell, R. J., Sobolev, Y. I., Grzybowski, B. A. Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation. *Nature*, **2020**, 586, 57-63.

I designed the rotors and performed most of the experiments described in the article, except the syntheses of small organic molecules in Fig.3 and separations and extractions in Fig.4. I participated in performing the nanoseparations described in Fig. 5 and experiments with bacteria *E. coli*. I participated in development of theoretical models.

Grzybowski, B. A., Sobolev, Y. I., Cybulski, O., Mikulak-Klucznik, B. Materials, assemblies and reaction systems under rotation. *Nature Reviews Materials*, **2022**, 7, 1-17.

I participated in the writing, editing and discussion of the content of the manuscript, in particular the sections: Lab-on-a-disc systems, Centrifugal casting, Spiral separators, Spin coating, Outlook and figures 2, 4, 6.

Dr. Olgierd Cybulski

Olgierd
Cybulski

Warszawa, 5.02.2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Cybulski, O., Dygas, M., Mikulak-Klucznik, B., Siek, M., Klucznik, T., Choi, S. Y., Mitchell, R. J., Sobolev, Y. I., Grzybowski, B. A. Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation. *Nature*, **2020**, 586, 57-63.

Był następujący:

Byłem odpowiedzialny za wykonanie syntez estru dimetylowego kwasu 1,4-fenylendiakrylowego, fenacetyny oraz furoinianu diloksanidu.

Dr Mirosław Dygas



Ulsan, 9.02.2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

Cybulski, O., Dygas, M., Mikulak-Klucznik, B., Siek, M., Klucznik, T., Choi, S. Y., Mitchell, R. J., Sobolev, Y. I., Grzybowski, B. A. Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation. *Nature*, 2020, 586, 57-63.

Był następujący:

Brałam udział w zaprojektowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów związanych z separacją nanocząstek.

Dr Marta Siek



George Island, February 8, 2022

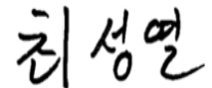
TO WHOM IT MAY CONCERN

Statement of contribution

Hereby, I would like to claim that my contribution to the paper:

Cybulski, O., Dygas, M., Mikulak-Klucznik, B., Siek, M., Klucznik, T., Choi, S. Y., Mitchell, R. J., Sobolev, Y. I., Grzybowski, B. A. Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation. *Nature*, **2020**, 586, 57-63.

I participated in performing experiments with bacteria *E. coli* (extraction of violacein).



Dr Seong Yeol Choi

February 7, 2022

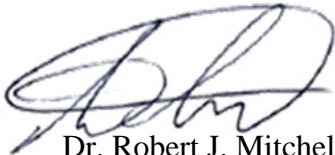
TO WHOM IT MAY CONCERN

Statement of contribution

Hereby, I would like to claim that my contribution to the paper:

Cybulski, O., Dygas, M., Mikulak-Klucznik, B., Siek, M., Klucznik, T., Choi, S. Y., Mitchell, R. J., Sobolev, Y. I., Grzybowski, B. A. Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation. *Nature*, **2020**, 586, 57-63.

I participated in performing experiments with bacteria *E. coli* (extraction of violacein).



Dr. Robert J. Mitchell

February 9, 2022

TO WHOM IT MAY CONCERN

Statement of contribution

Hereby, I would like to claim my contribution to the papers:

Cybulski, O., Dygas, M., Mikulak-Klucznik, B., Siek, M., Klucznik, T., Choi, S. Y., Mitchell, R. J., Sobolev, Y. I., Grzybowski, B. A. Concentric liquid reactors for chemical synthesis and separation. *Nature*, **2020**, 586, 57-63.

I participated in development of theoretical models described in the article.

Grzybowski, B. A., Sobolev, Y. I., Cybulski, O., Mikulak-Klucznik, B. Materials, assemblies and reaction systems under rotation. *Nature Reviews Materials*, **2022**, 7, 1-17.

I contributed the initial drafts of the following sections: underlying physics, shaping of telescope mirrors, microgravity simulators, self-assembly in confining rotary flows, crystal growth in shear flow. I've drawn Figures 1, 3a, 3f, 4e, 5. I participated in the writing, editing and discussion of the content of the final version of the manuscript.

Dr Yaroslav I. Sobolev



Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.439/22



10000000110010