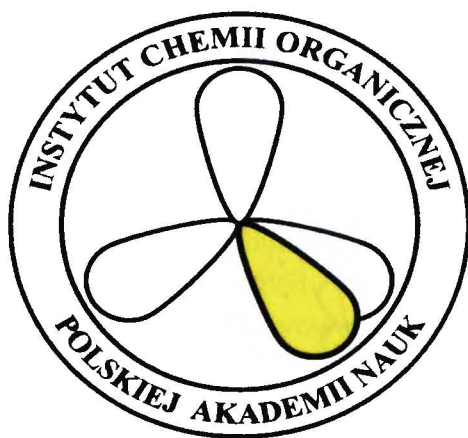


ROZPRAWA DOKTORSKA

Michał Wierzbicki

INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ
Polskiej Akademii Nauk



A-21-6
K-c-119
K-c-130
K-g-152

ROZPRAWA DOKTORSKA

w formie spójnego tematycznie cyklu artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych

mgr inż. Michał Wierzbicki

**Synteza nowych chiralnych kawitandów i kontenerów
molekularnych sterowana asocjacją i rozpoznaniem oraz
badanie ich struktury**

Promotor: dr hab. Agnieszka Szumna

Warszawa 2016

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.382/16





B. Org. 382/16

STRESZCZENIE

Chemicy specjalizujący się w chemii supramolekularnej od lat starają się tworzyć związki występujące w postaci kapsuł molekularnych i kawitandów. Kapsuły takie mogą być zdolne do kompleksowania określonych małych cząsteczek, co prowadzi do oddzielania ich od środowiska zewnętrznego. Cecha ta pozwala na zastosowanie tych związków jako sensorów, do przechowywania reaktywnych cząsteczek, a nawet w charakterze nanoreaktorów.

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy badań nad syntezą nowych chiralnych kawitandów i kapsuł molekularnych. Jako podstawowy blok budulcowy stosowałem rezorcyn[4]aren, bardzo popularny w konstrukcji kapsuł i kawitandów ze względu na sztywną strukturę i łatwość modyfikacji. Opierając się na osiągnięciach zespołu IX IChO przeprowadziłem syntezę nowych chiralnych kapsuł molekularnych drogą reakcji Mannicha. Otrzymałem zarówno kapsuły homochiralne, jak i hybrydowe kapsuły heterochiralne (z czego te ostatnie w procesach częściowo odwracalnych). Dokonałem szczegółowej analizy przebiegu reakcji i wyjaśniłem przyczyny powstawania konkretnych produktów. Trudności jakie napotkałem w trakcie wyznaczania struktur kapsuł w fazie stałej spowodowały, że podjąłem próby wykorzystania metod krystalografii białek, a w szczególności algorytmów Molecular Replacement (MR). Zastosowanie programu PHASER pozwoliło mi na rozwiązanie struktury jednej z kapsuł, która nie mogła być rozwiązana tradycyjnymi metodami. Następnie sprawdziłem możliwości tego programu pod kątem rozmiarów modelu potrzebnego do rozwiązania struktury.

Mając na celu wykorzystanie reakcji odwracalnych w tworzeniu kapsuł przeprowadziłem syntezę nieznanego dotąd bloku budulcowego – tetraformylrezorcyn[4]arenu. Następnie w reakcjach pomiędzy nim a aminami pierwszorzędowymi otrzymałem serię inherentnie chiralnych kawitandów zdolnych do efektywnego samosortowania. Stwierdziłem indukcję asymetryczną chiralności inherentnej w przypadku stosowania chiralnych amin. Tetraformylrezorcyn[4]aren posłużył jako podstawa nowych chiralnych kapsuł molekularnych otrzymanych w naszym zespole, dla trzech spośród których wyznaczyłem struktury w fazie stałej za pomocą metodologii MR.

W reakcji pomiędzy tetraformylrezorcyn[4]arenem a hydrazdami aminokwasów i dwupeptydów otrzymałem cztery nowe kapsuły molekularne. Stwierdziłem, że powstają one w procesach dynamicznych i udowodniłem, że są zdolne do chiralnego samosortowania. Przeprowadziłem kompleksowanie fulerenów w kapsułach metodami chemicznymi oraz mechanochemicznymi. Wyznaczyłem struktury dwóch kapsuł, oraz kompleksów fulerenów C_{60} i C_{70} metodami krystalograficznymi z wykorzystaniem pomiarów synchrotronowych oraz technik Molecular Replacement.

ABSTRACT

For many years supramolecular chemists have been trying to obtain chemical compounds in the forms of molecular capsules and cavitands. Such capsules may be capable to complex small molecules, which leads to their separation from the outside environment. This allows for their application as sensors, for storage of reactive molecules and even as nanoreactors.

The present dissertation concerns research on the synthesis of novel chiral molecular capsules and cavitands. Throughout the presented work I have used resorcin[4]arene as a fundamental building block, due to its rigid structure and ease of modification. Based on the accomplishments of the research group IX at the Institute of Organic Chemistry PAS, I have conducted the synthesis of novel molecular capsules through the Mannich reaction. I have obtained both homochiral and hybrid heterochiral capsules (the latter in partially reversible processes). I have carefully analyzed the course of the reaction and explained the reasons for the formation of particular products. The obstacles encountered during the determination of solid-state structures have caused me to turn to the methods of protein crystallography, especially the Molecular Replacement (MR) algorithms. Employment of the PHASER computer program has allowed to solve the structure of one of the capsules, which was impossible to solve using traditional methods. I have then explored the capabilities of the program regarding the size of the model required for obtaining a successful solution.

In order to use reversible reactions in the synthesis of capsules I have performed the synthesis of a previously not known building block – tetraformylresorcin[4]arene. Subsequently in the reactions between this new compound and primary amines I have obtained a set of inherently chiral cavitands capable of effective self-sorting. I have observed asymmetric induction in case of chiral amines. Tetraformylresorcin[4]arene has served as a scaffold for novel chiral molecular capsules synthesized in our research group. I have determined solid-state structures for three of them with help of the MR methods.

In reactions between tetraformylresorcin[4]arene and amino acid hydrazides I have obtained four new molecular capsules. I have found that they are formed in dynamic processes and I have proven that they are capable of chiral self-sorting. I have performed complexation of fullerenes inside the capsules through chemical and mechanochemical methods. I have determined the structures of two of the capsules as well as C₆₀ and C₇₀ complexes in the solid state using synchrotron radiation sources and Molecular Replacement methods.

SPIS TREŚCI

Lista publikacji.....	6
Udział w konferencjach i warsztatach	7
Wprowadzenie.....	9
Hipoteza badawcza i szczegółowe cele pracy.....	11
Badania własne	14
Sterowana asocjacją synteza hybrydowych kapsuł molekularnych	14
Badania strukturalne kapsuły otrzymanej z alaniny	19
Synteza tetraformylozorcyn[4]arenu i jego reakcje z aminami pierwszorzędowymi	23
Struktury peptydowych kapsuł molekularnych w ciele stałym	28
Synteza i badania strukturalne kapsuł molekularnych opartych na motywie acylohydrazonu. ...	33
Podsumowanie	42
Bibliografia	43
Przedruki publikacji wchodzących w skład rozprawy	47

LISTA PUBLIKACJI

Publikacje wchodzące w skład rozprawy:

1. "Mechanochemical Encapsulation of Fullerenes in Peptidic Containers Prepared by Dynamic Chiral Self-sorting and Self-assembly" M. Szymański, M. Wierzbicki, M. Gilski, H. Jędrzejewska, M. Sztylko, P. Cmoch, A. Shkurenko, M. Jaskolski, A. Szumna, *Chem. Eur. J.*, **2016**, przyjęta do druku.
2. "Dynamic Formation of Hybrid Peptidic Capsules by Chiral Self-sorting and Self-assembly" H. Jędrzejewska, M. Wierzbicki, P. Cmoch, K. Rissanen, A. Szumna, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 13760-13764.
3. "Experiences with applications of macromolecular tools in supramolecular crystallography" M. Wierzbicki, M. Gilski, K. Rissanen, M. Jaskólski, A. Szumna, *CrystEngComm*, **2014**, 16, 3773-3780.
4. "Inherently Chiral Iminoresorcinarenes through Regioselective Unidirectional Tautomerization" M. Grajda, M. Wierzbicki, P. Cmoch, A. Szumna, *J. Org. Chem.*, **2013**, 78, 11597-11601.
5. M. Wierzbicki, H. Jędrzejewska, A. Szumna, "Chemistry, Molecular Sciences and Engineering" edited by Jan Reedijk, Elsevier, **2013**, chapter "Chiral calixarenes".
6. "Assembly-driven synthesis of hybrid molecular capsules controlled by chiral sorting" M. Wierzbicki, A. Szumna, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 3860-3862.

Pozostałe publikacje:

1. „Synthesis of resorcinarene phosphonium salts and the effect of counteranion on their structure” W. Iwanek, K. Stefańska, A. Szumna, M. Wierzbicki, *Tetrahedron*, **2016**, 72, 142-147.
2. "Solvent-free synthesis and structure of 2-naphthol derivatives of resorcinarenes" W. Iwanek, K. Stefańska, A. Szumna, M. Wierzbicki, *Tetrahedron*, **2015**, 71, 2222-2225.
3. "Tartaric acid and its *O*-acyl derivatives. 7. Crystal structure of *O*-*p*-anisoyl-D-tartaric acid and its dimethylammonium salt trihydrate" G. Wesela-Bauman, T. Boinski, P. Dominiak, H. Hajmowicz, L. Synoradzki, M. Wierzbicki, B. Woliński, K. Woźniak, K. Zawada, *J. Struct. Chem.*, **2013**, 54, 1, 155-158.

UDZIAŁ W KONFERENCJACH I WARSZTATACH

1. "15th International Seminar on Inclusion Compounds", Uniwersytet Warszawski, 17 - 21 sierpnia 2015, wystąpienie ustne, nagroda za najlepszy plakat, członek komitetu organizacyjnego.
2. "10th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry", Palais des congrès, Strasbourg, Francja, 28 czerwca – 2 lipca 2015, plakat.
3. Multi-Pole Approach to Structural Science, Pałac Staszica, Warszawa, 10 – 13 maja 2015, plakat.
4. Warsztaty "Biocrystallography for the high-throughput era", Uniwersytet w Białymstoku, 1 – 5 lipca 2014, nagroda za najlepszy plakat (drugie miejsce).
5. Warsztaty "International EXPO/SIR Workshop", Uniwersytet Bari, Włochy, 10 – 13 czerwca 2014.
6. "ChemSession'13 – X Warszawskie Seminarium Doktorantów Nauk Chemicznych", Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, 17 maja 2013, plakat.
7. "Self-Assembly & Supramolecular Chemistry" Gordon Research Seminar, Les Diablerets Conference Center, Les Diablerets, Szwajcaria, 4 – 5 maja 2013, plakat.
8. 1st Warsaw-Cambridge Young Scientists Meeting "Breaking Boundaries in Chemistry", Instytut Chemii Fizycznej PAN, Warszawa, 8 – 9 marca 2013, wystąpienie ustne.

WPROWADZENIE

W organizmach żywych zachodzi równocześnie wiele procesów biochemicznych. Niektóre z nich biegną nawet w przeciwnych kierunkach. Każda komórka stanowi oddzielną strefę, w której istnieją dobrze zdefiniowane i funkcjonalne elementy, oraz zachodzą procesy przemiany materii i jej transportu, a także istnieją gradienty stężeń. Trudno to sobie wyobrazić bez fizycznego odseparowania tych zjawisk w przestrzeni. Wiele substratów, produktów przejściowych czy katalizatorów po prostu nie może współistnieć obok siebie (jak na przykład kwasy i zasady). Centra aktywne enzymów pełnią między innymi funkcję oddzielenia substratów od środowiska, co umożliwia przebieg reakcji niezależnie od warunków panujących na zewnątrz i niezależnie od innych procesów. Błony komórkowe spełniają podobną rolę, tzn. ograniczają pewien obszar, w którym mają miejsce konkretne procesy życiowe. Można wręcz stwierdzić, że bez zjawiska separacji przestrzennej życie w ogóle nie byłoby możliwe.

Specjaliści w dziedzinie chemii supramolekularnej od wielu lat próbują, wzorując się na organizmach żywych, konstruować różnego rodzaju kapsuły molekularne i kawitandy, których zadaniem jest oddzielenie fragmentu przestrzeni i zamknięcie w niej określonych cząsteczek. Znane są przykłady stosowania kapsuł molekularnych w charakterze sensorów,¹ w celu przechowywania reaktywnych cząsteczek² oraz jako nanoreaktory.^{3,4,5,6,7} Otrzymywanie tego rodzaju układów jest jednak często trudne ze względu na dużą ilość koniecznych do wytworzenia wiązań chemicznych. Z tego powodu wydajności ich powstawania drogą klasycznej syntezy organicznej są zwykle niskie. Z pomocą może tutaj przyjść zastosowanie procesów równowagowych. Jeżeli substraty zostaną zaprojektowane tak, że reagują ze sobą w sposób odwracalny, to pozostają one w równowadze dynamicznej z powstającymi na początkowym etapie produktami ubocznymi i mogą być przekształcone w pożądany produkt, o ile tylko jest on termodynamicznie stabilny. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie skomplikowanych supramolekularnych asocjatów z wysokimi wydajnościami, niezależnie od ilości koniecznych do utworzenia wiązań. Co więcej, pozwala to na sterowanie przebiegiem reakcji, np. poprzez odpowiedni dobór chiralności substratów lub templatowanie powstawania konkretnego produktu. Analogia do procesów biochemicznych jest w tym przypadku bardzo dobrze widoczna. O tym jak zróżnicowane właściwości mogą mieć układy zdolne do samoasocjacji, sortowania chiralnego i rozpoznania molekularnego świadczy olbrzymia różnorodność form życia i zawarty w nich funkcjonalnych związków chemicznych.

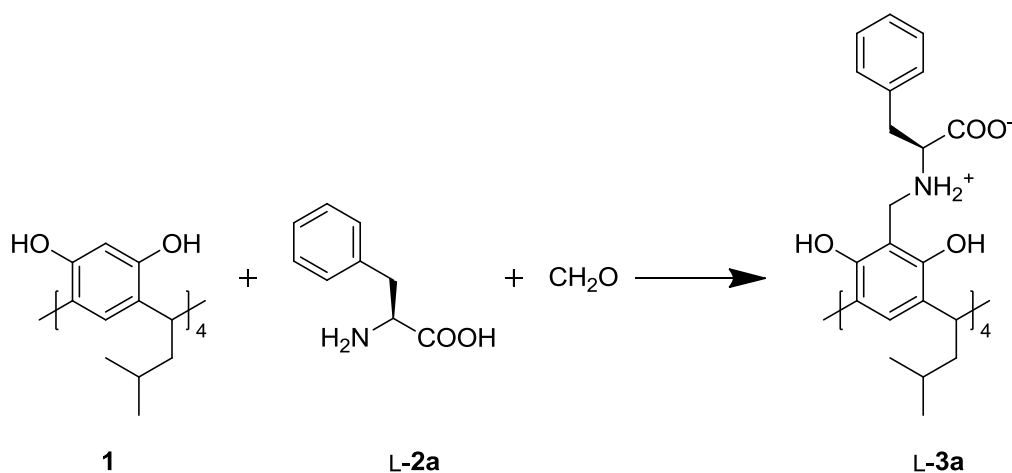
Znane są rozmaite rodzaje kontenerów molekularnych wytworzonych drogą procesów równowagowych, obejmujących: kondensację amin z aldehydami,^{8,9,10,11,12} reakcję metatezy olefin,¹³ syntezę estrów boronowych^{14,15,16} i tworzenie wiązań koordynacyjnych.^{17,18} Kapsuły molekularne można również otrzymać z wykorzystaniem słabych oddziaływań międzycząsteczkowych, takich jak wiązania wodorowe^{19,20,21} czy oddziaływania hydrofobowe.²² Znakomita większość tych kontenerów molekularnych posiada jednak dwie zasadnicze wady. Ze względu na konieczność usztywnienia struktury (dla zachowania jej „sferycznego” kształtu) są one zbudowane w dużej mierze z pierścieni aromatycznych. Z tego powodu są one zwykle achiralne, a ich wnętrza mają charakter hydrofobowy. Cechy te są niepożądane z punktu widzenia zastosowań w kompleksowaniu i katalizie. Większość związków chemicznych o znaczeniu biologicznym posiada polarną budowę, a także wiele reakcji chemicznych zachodzi poprzez polarne stany przejściowe. Z tych powodów zarówno rozpoznanie molekularne jak i kataliza we wnętrzu hydrofobowego kontenera nie są uprzywilejowane. Co więcej, brak chiralności kontenera molekularnego eliminuje możliwość jego wykorzystania w procesach asymetrycznych.

Znakomitymi chiralnymi blokami budulcowymi o polarnym charakterze, możliwymi do zastosowania w chemii supramolekularnej, są aminokwasy białkowe. Są one bardzo łatwo dostępne ze źródeł naturalnych, a ponadto są to związki zaprojektowane przez naturę w konkretnym celu, jakim jest tworzenie skomplikowanych struktur na bazie wiązań wodorowych. Białka funkcjonalne powstają w procesach spontanicznej samoorganizacji, tzn. już w czasie ich biosyntezy formują struktury drugo- i trzeciorzędowe, tworząc sieć oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych stabilizujących konkretne konformacje głównego łańcucha. Najczęściej (ale nie zawsze) sekwencja polipeptydu determinuje jego pełną strukturę. Warto zauważyć, że kluczowe oddziaływania charakteryzują się niewielką energią, przez co ich tworzenie jest odwracalne. W połączeniu z określoną chiralnością aminokwasów prowadzi to do powstania jednego, trwałego termodynamicznie produktu. Zastosowanie krótkich peptydów w tworzeniu układów syntetycznych napotyka jednak na szereg trudności. W przeciwieństwie do naturalnych białek (o dużo większych cząsteczkach) ich struktura drugorzędowa nie jest dobrze zdefiniowana.

Celem mojej pracy było poszukiwanie nowych syntetycznych kapsuł molekularnych opartych na peptydach i blokach makrocyklicznych, jak również sposobów ich wydajnego wytwarzania (zarówno na drodze kowalencyjnej jak i niekowalencyjnej). Szczególnie ważnym elementem moich działań były badania strukturalne, ponieważ poznanie budowy tych skomplikowanych związków pozwala na racjonalne projektowanie kolejnych generacji kontenerów molekularnych i kawitandów. Dlatego istotnym zadaniem podczas mojej pracy był również rozwój narzędzi, które mogą posłużyć określaniu struktur supramolekularnych.

HIPOTEZA BADAWCZA I SZCZEGÓŁOWE CELE PRACY

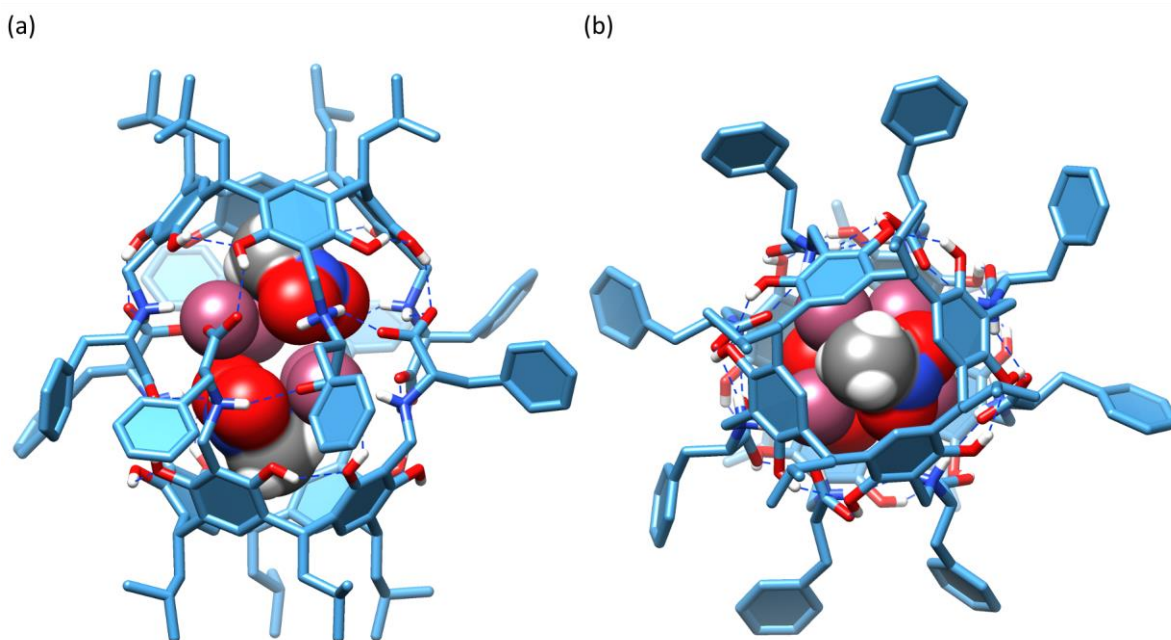
Działalność naukowa zespołu IX w IChO PAN, prowadzonego przez dr hab. Agnieszkę Szumną, skupia się głównie na badaniach nad syntezą i właściwościami kontenerów molekularnych i kawitandów. W ramach tych prac został w roku 2009 zaprojektowany (z udziałem Bogumiła Kuberskiego, który wykonywał wówczas swoją pracę magisterską) związek L-3a (Rys. 1).²³



Rys. 1. Synteza odwróconych kapsuł drogą reakcji Mannicha

Mgr Kuberski przeprowadził jego syntezę w jednym etapie drogą reakcji Mannicha pomiędzy rezorcyn[4]arenem, formaliną i L-fenylalaniną w łagodnych warunkach. Produkt L-3a został wydzielony z wysoką wydajnością (tj. ok. 70%) i charakteryzował się ostrymi sygnałami w widmach ¹H i ¹³C NMR. Ponadto wykazywał on dużą rozpuszczalność w chloroformie. Biorąc pod uwagę liczbę polarnych grup funkcyjnych, sugerowało to strukturę o wysokiej symetrii, w której hydrofobowe łańcuchy boczne osłaniają wewnątrz cząsteczki przed kontaktem z rozpuszczalnikiem. Rentgenowska analiza strukturalna wykazała, że związek ten istotnie występuje w postaci dimerycznej kapsuły molekularnej (L-3a)₂ (Rys. 2).

Budowa kapsuły przypomina odwrócona micelę, tzn. wszystkie grupy posiadające ładunki elektryczne są zlokalizowane wewnątrz, natomiast hydrofobowe łańcuchy boczne są umieszczone na zewnątrz struktury. Jak łatwo zauważyć, oznacza to, że wewnątrz kapsuły cechuje obecność wielu donorów i akceptorów wiązań wodorowych, a co za tym idzie hydrofilowy charakter. Z tych powodów kapsuła (L-3a)₂ jest zdolna do kompleksowania niewielkich polarnych cząsteczek, co zostało dokładnie przeanalizowane i opisane przez dr hab. Agnieszkę Szumną.^{24,25}



Rys. 2. Struktura kapsuły (L-**3a**)₂ w ciele stałym.

Co ciekawe, podczas gdy związek (L-**3a**)₂ posiada w roztworze chloroformowym strukturę o wysokiej symetrii, nieco inaczej zachowuje się on po rozpuszczeniu w toluenie. Widmo ¹H NMR tego związku w toluenie-d₈ różni się znacząco od tego w CDCl₃. Liczba sygnałów ulega zwielokrotnieniu (są one jednak nadal ostre). Jest to spowodowane zakłóceniem czterokrotnej symetrii kapsuły poprzez kompleksowanie jednego z łańcuchów bocznych fenyloalaniny wewnątrz struktury. Potwierdza to zarówno obecność silnie przesuniętych sygnałów pochodzących od jednego z pierścieni aromatycznych w widmie ¹H NMR jak również widma 2D NMR. Istnienie takiej niesymetrycznej struktury można wyjaśnić brakiem kompleksowania toluenu w hydrofilowym wnętrzu kapsuły. Brak zdolności kompleksowania związków aromatycznych został potwierdzony także dla innych gości. Co ważne, nawet w formie „samoenkapsulowanej” kapsuła (L-**3a**)₂ zachowuje swoją zdolność do kompleksowania polarnych cząsteczek i w ich obecności odzyskują symetryczną strukturę.

Dokładna analiza struktury (L-**3a**)₂ prowadzi do wniosku, że łańcuchy boczne sąsiednich aminokwasów znajdują się w bezpośredniej bliskości (Rys. 2) co może generować niekorzystne oddziaływanie steryczne. Doprowadziło to do sformułowania hipotezy, że gdyby kapsuła składała się z dwóch monomerów o przeciwnych konfiguracjach, to taki dimer byłby termodynamicznie trwalszy ze względu na brak zatłoczenia sterycznego. Aby to sprawdzić mgr Kuberski przeprowadził syntezę enancjomeru opisanej kapsuły, (D-**3a**)₂. Następnie podjął próby wymiany monomerów poprzez rozpuszczenie mieszaniny obu enancjomerów w chloroformie. Nie dało to pozytywnych rezultatów mimo ogrzewania roztworu do 60°C przez dwa dni. Powstanie kapsuły heterochiralnej nastąpiło dopiero po potraktowaniu mieszaniny metanolem (w ilości 10% v/v), odparowaniu i ponownym rozpuszczeniu w chloroformie. Ilościowe powstawanie kapsuły heterochiralnej (L-**3a**)(D-**3a**) potwierdziły analizy NMR, w tym DOSY.

Biorąc pod uwagę opisane powyżej wyniki badań nad kapsułami molekularnymi, prowadzonych w Zespole IX IChO PAN, oraz aktualny stan wiedzy na temat chiralnych pochodnych rezorcynarenów,^{*} postawiłem sobie następujące **szczegółowe cele badawcze**:

- Synteza nowych chiralnych kapsuł molekularnych w oparciu o rezorcyn[4]aren i hydrofobowe aminokwasy, w tym kapsuł hybrydowych, tzn. zbudowanych z różnych aminokwasów. Liczba obecnych do tej pory w literaturze chiralnych kapsuł była niewielka, natomiast jedyną znaną chiralną kapsułą o odwróconej polarności była (L-**3a**)₂.
- Sprawdzenie, jaki wpływ na przebieg reakcji może mieć asocjacja. Jak dowiodła dr hab. Agnieszka Szumna, asocjacja umożliwia rozpuszczenie kapsuły (L-**3a**)₂ w chloroformie, a zatem ma decydujący wpływ na jej właściwości fizyczne, a być może także na inne jej cechy.
- Próby syntezy kapsuł z wykorzystaniem reakcji odwracalnych. Odwracalność reakcji może pozwolić na tworzenie jednego trwałego termodynamicznie produktu, nawet jeśli możliwe jest teoretycznie powstawanie skomplikowanych mieszanin.
- Ustalenie struktur otrzymanych kapsuł i określenie stabilnych motywów wiążących, wykorzystując szereg metod, ze szczególnym uwzględnieniem metod krystalograficznych. Metody te zajmują szczególne miejsce w chemii supramolekularnej ze względu na możliwość dokładnego badania oddziaływań w obrębie kapsuł, a także pomiędzy kapsułami a cząsteczkami gości.

^{*} Zbiór informacji zawarty w przeglądzie:

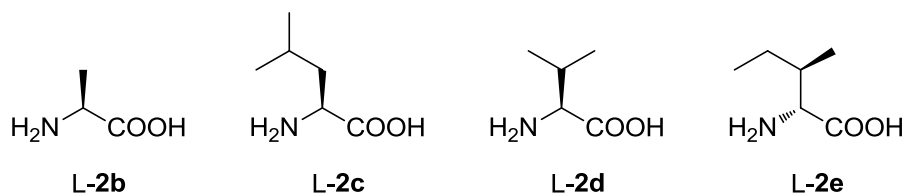
M. Wierzbicki, H. Jędrzejewska, A. Szumna, "Chemistry, Molecular Sciences and Engineering" edited by Jan Reedijk, Elsevier, **2013**, chapter "Chiral calixarenes".



BADANIA WŁASNE

Sterowana asocjacja synteza hybrydowych kapsuł molekularnych*

Moją pracę rozpocząłem od syntezy kapsuł molekularnych analogicznych do (L-3a)₂. Ponieważ motyw wiążący (L-3a)₂ angażuje jedynie główne łańcuchy aminokwasów, spodziewałem się, że możliwe będzie wytworzenie podobnych struktur z wykorzystaniem innych aminokwasów. Ze względu na specyfikę budowy „odwróconych” kapsuł (analogia do odwróconych miceli) w grę wchodziły jedynie te aminokwasy, które posiadają hydrofobowe łańcuchy boczne. Ważnym czynnikiem była dostępność substratów. Dodatkowo, nie brałem pod uwagę aminokwasów o łańcuchach bocznych mogących reagować w warunkach reakcji Mannicha (tj. tryptofanu i tyrozyny). Ostateczny wybór padł na: alaninę (L-2b), leucynę (L-2c), walinę (L-2d) oraz izoleucynę (L-2e, Rys. 3). Przeprowadziłem szereg reakcji pomiędzy każdym z nich a formaliną oraz rezorcyn[4]arenem.



Rys. 3. Wybrane aminokwasy o hydrofobowych łańcuchach bocznych.

W przypadku alaniny L-2b otrzymałem pożądaną kapsułę z zadowalającą wydajnością (tj. 50%). Jej strukturę, oraz ilościowe powstawanie dimerów potwierdziłem metodami ¹H i ¹³C NMR (w tym DOSY) oraz MS. Sygnały w widmach NMR są ostre, a ich liczba wskazuje na taką samą symetrię, jaka cechowała kapsułę (L-3a)₂.

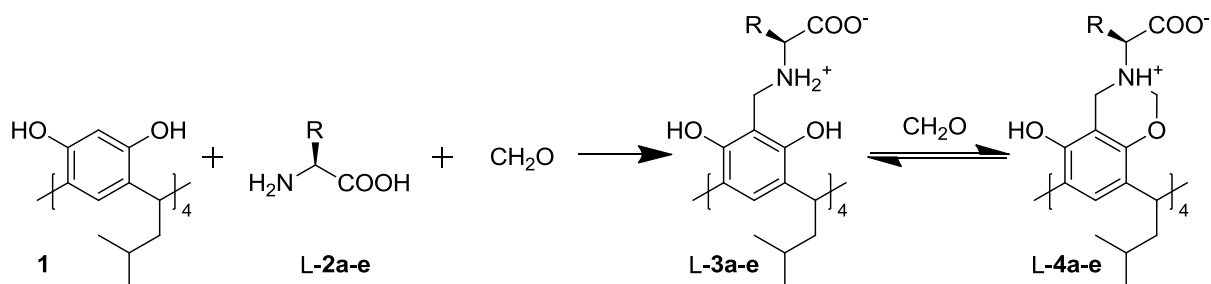
Zastosowanie leucyny L-2c, aminokwasu o dłuższym i bardziej labilnym łańcuchu bocznym, dało zupełnie inny wynik. Widmo ¹H NMR produktu było bardzo skomplikowane i zawierało sygnały grup metylowych przesunięte w kierunku wyższych pól. Jest to zjawisko podobne do tego

* Wyniki opublikowane w:

M. Wierzbicki, A. Szumna, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 3860-3862.

zaobserwowanego wcześniej dla (L-3a)₂ w toluenie i polega w istocie na usytuowaniu jednego z łańcuchów bocznych aminokwasu wewnątrz kapsuły. Stwierdziłem jednak, że w tym przypadku samokompleksowanie łańcucha bocznego nie cofa się w obecności cząsteczek potencjalnego gościa. W przypadku związku (L-3c)₂ nie zaobserwowałem kompleksowania żadnego z gości, które okazały się wcześniej odpowiednie dla (L-3a)₂. Zatem kapsuła oparta na L-leucynie nie posiada luki i występuje w formie posiadającej łańcuch boczny skompleksowany wewnątrz. Taka struktura wydaje się być bardzo stabilna, prawdopodobnie ze względu na możliwe oddziaływania typu CH – π.

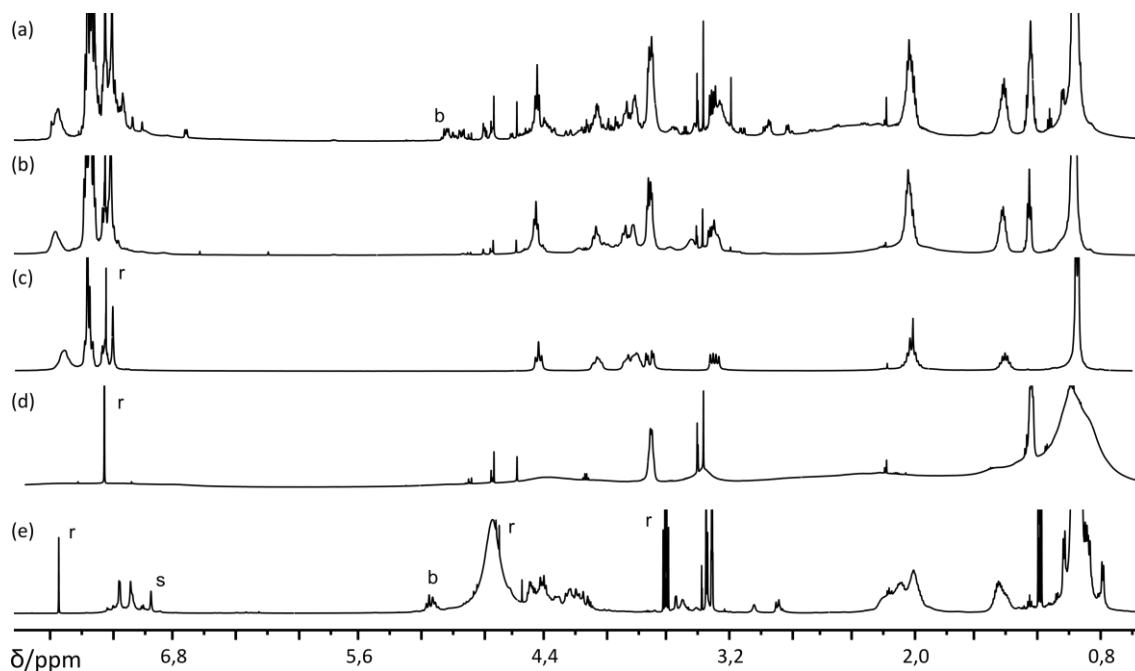
Najbardziej zaskakujące było jednak zachowanie produktu reakcji z walina L-2d. Na pierwszy rzut oka reakcja wyglądała tak samo jak poprzednie, a produkt (o dużej liczbie grup polarnych) był rozpuszczalny w chloroformie, co wskazywało wstępnie na strukturę analogiczną do (L-3a)₂. Chociaż obserwacje wizualne nie są ilościowym narzędziem badawczym, mogą one być bardzo istotne. Liczne doświadczenia wskazują, że w przypadku kawitandów posiadających eksponowane grupy polarne mieszaniny reakcyjne w chloroformie są niehomogeniczne. Zatem obserwacje wskazywały na powstawanie produktów z izolowanymi grupami polarnymi. Jednak widmo ¹H NMR wykonane w CDCl₃ nie przypominało zupełnie widm otrzymanych dotychczas kapsuł. Wszystkie sygnały były znacznie poszerzone, co świadczy o obecności niespecyficznego agregatów. Zatem w tym przypadku w ogóle nie uzyskałem kapsuły. Co więcej, nie byłem w stanie otrzymać nawet monomerycznego produktu reakcji Mannicha, kawitandu L-3d.



Rys. 4. Reakcja Mannicha i następcze tworzenie benzoksazyn.

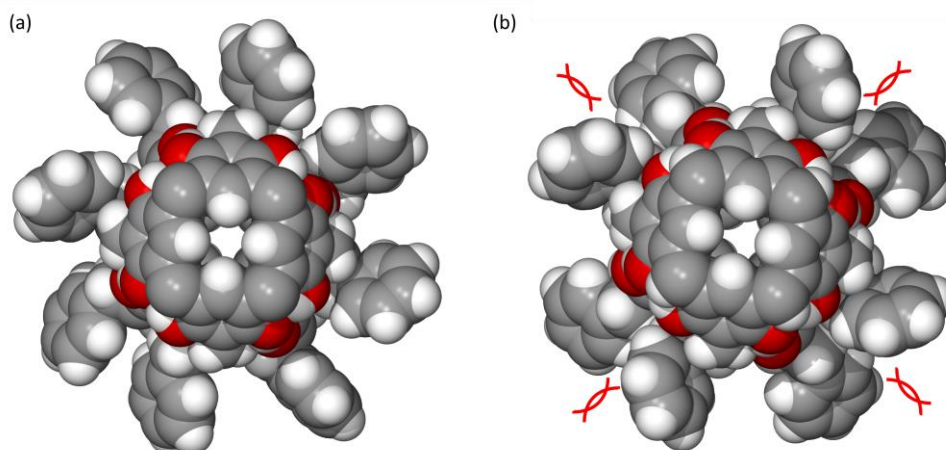
Aby poznać powody tych różnic monitorowałem przebieg reakcji pomiędzy rezorcyn[4]arenem, formaliną i aminokwasami: L-2a i L-2d (reakcje w CDCl₃, temp. pok.) metodą ¹H NMR. W obu przypadkach reakcja początkowo prowadzi do mieszaniny różnego rodzaju benzoksazyn (L-4a i L-4d, Rys. 4). Obecność benzoksazyn potwierdziłem poprzez korelację typu ¹H-¹³C HSQC. Przesunięcia sygnałów grup metylenowych zarówno w widmach ¹H NMR (4,5 – 5,0 ppm, Rys. 5a) jak i ¹³C NMR (80 – 100 ppm) są charakterystyczne dla tego typu związków. Co więcej, tworzenie benzoksazyn w podobnych reakcjach było wielokrotnie udowodnione.²⁶ W przypadku L-2a pojawiające się szybko sygnały benzoksazyn, stopniowo zanikają i mieszanina osiąga po ok. 5 dniach stan równowagi, w którym jako główny produkt występuje (L-3a)₂ w formie kapsuły (Rys. 5b). Natomiast dla substratu L-2d otrzymałem widma o bardzo poszerzonych sygnałach (Rys. 5d), co świadczy o tym, że produkty reakcji nie tworzą ściśle zdefiniowanych układów (kapsuł), ale agregują w sposób całkowicie niespecyficzny. Widmo wykonane w CDCl₃:CD₃OD (1:1) ujawnia skomplikowany skład mieszaniny, w tym sygnały benzoksazyn (Rys. 5e). Przeprowadziłem próby ukierunkowania tej reakcji (tzn. ogrzewanie, kataliza kwasem octowym, dłuższy czas reakcji, dodatek metanolu). Eksperymenty te nie przyniosły zamierzonego efektu. Ważnym wnioskiem z tych obserwacji jest to, że siłą napędową

reakcji i źródłem jej regioselektywności jest proces niekowalencyjnej dimeryzacji. Jeżeli proces ten zachodzi i produkt w formie kapsuły jest trwały, prowadzi to do przesuwania równowagi reakcji tworzenia benzoksazyn L-4 w kierunku substratu, tzn. L-3. Zatem, mimo, że benzoksazyny powstają szybko na wczesnym etapie reakcji, są one przekształcane w pożądaný produkt zgodnie z prawem działania mas. W przypadku L-2d dimeryzacja najwyraźniej nie ma miejsca (a przynajmniej zachodzi jedynie niespecyficzna agregacja), dlatego szybko powstające benzoksazyny nie są przetwarzane w L-3d.



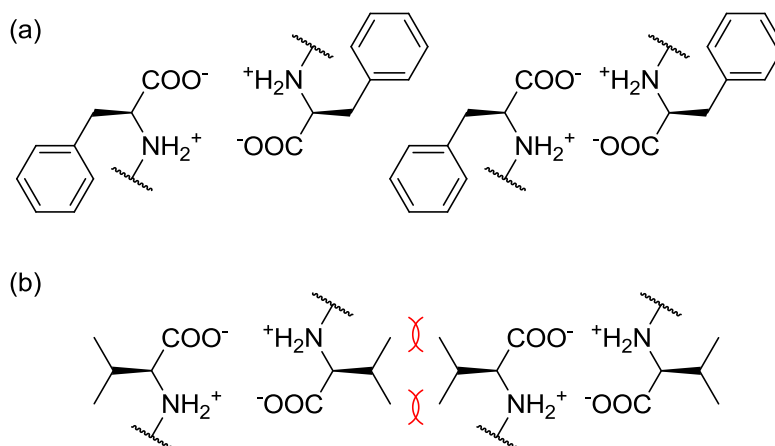
Rys. 5. Widma ^1H NMR w CDCl_3 : (a) reakcja **1** i L-2a po 1 dniu, (b) reakcja **1** i L-2a po 5 dniach, (c) wydzielony produkt $(\text{L-3a})_2$, (d) reakcja **1** i L-2d, oraz (e) reakcja **1** i L-2d w $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1). Na rysunku oznaczone zostały sygnały benzoksazyn, rozpuszczalnika i substratu (odpowiednio b, r i s).

Przy wyjaśnieniu powodów takiego stanu rzeczy, tzn. braku dimeryzacji produktu otrzymanego z L-waliny, z pomocą przyszło mi wyznaczenie struktury kapsuły heterochiralnej $(\text{L-3a})(\text{D-3a})$ w ciele stałym. Kapsułę tę wykrystalizowałem metodą dyfuzyjną, a jej strukturę rozwiązałem metodami bezpośrednimi z użyciem programu ShelXS. Porównanie z poprzednio opisaną strukturą $(\text{L-3a})_2$ pozwala zauważyć, że ułożenie łańcuchów bocznych jest w nich nieco inne. W przypadku $(\text{L-3a})(\text{D-3a})$ pierścienie aromatyczne pochodzące od sąsiednich aminokwasów tworzą układ podobny do śmigła, a zatem są idealnie rozłożone wokół kapsuły (Rys. 6a). Natomiast w strukturze $(\text{L-3a})_2$ są one skierowane „do siebie” w taki sposób, że niekorzystne oddziaływanie steryczne pomiędzy nimi jest znacznie silniejsze (Rys. 6b). Moje badania wyjaśniają zatem obserwacje poczynione wcześniej przez dr hab. Agnieszkę Szumną dotyczące wyższej stabilności kapsuł heterochiralnych niż homochiralnych.



Rys. 6. Porównanie struktur kapsuł (a) (L-3a)(D-3a) i (b) (L-3a)₂, widok „z góry”. Atomy zostały przedstawione w postaci sfer van der Waalsa. Łańcuchy izobutylole dolnej obręczy zostały usunięte dla lepszej czytelności.

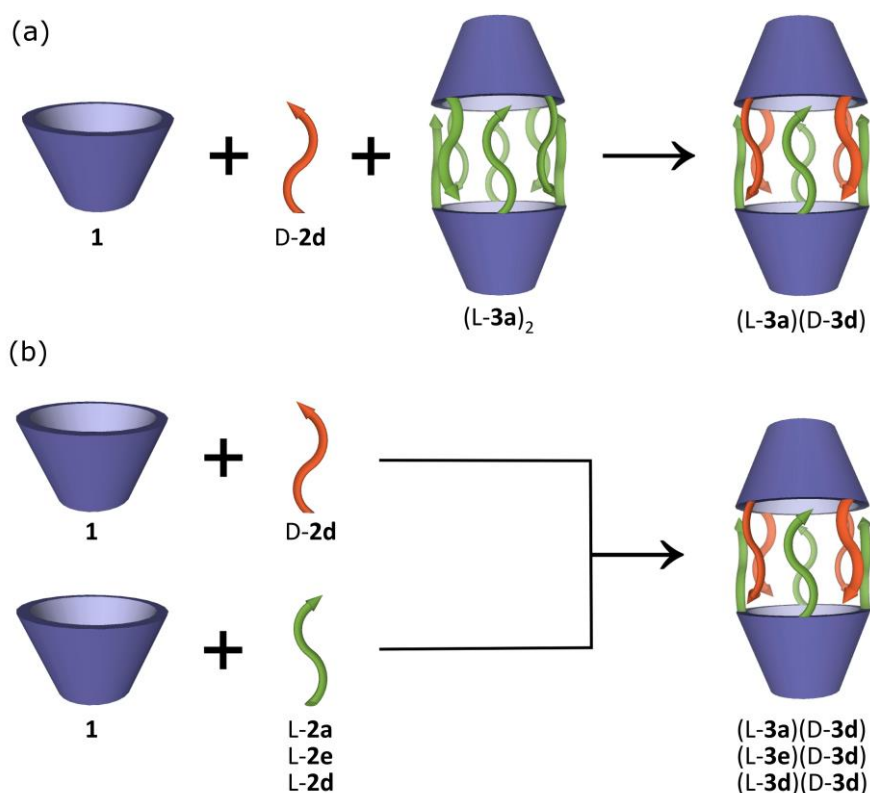
Opisane badania strukturalne dotyczące (L-3a)(D-3a) i (L-3a)₂ pozwoliły mi na wyjaśnienie spostrzeżeń dotyczących tworzenia kapsuł opartych na walinie. W hipotetycznej kapsule (L-3d)₂ łańcuchy boczne waliny znajdowałyby się w bezpośredniej bliskości. Walina jest bardziej zatłoczona sterycznie przy węglu β niż fenyloalanina (obecność dwóch grup metylowych). Zatem, podczas gdy w przypadku (L-3a)₂ grupy benzylole fenyloalaniny „mijają się” (Rys. 7a), to dla grup izopropylowych waliny nie starcza już miejsca (Rys. 7b). Z tego powodu monomery L-3d, które prawdopodobnie w pewnej ilości powstają w mieszaninie reakcyjnej, nie tworzą kapsuły. Wobec tego kluczowy dla całego procesu etap dimeryzacji jest zahamowany, co uniemożliwia selektywną syntezę nawet monomerycznego L-3d.



Rys. 7. Motywy wiążące (a) kapsuły (L-3a)₂ i (b) nieistniejącej (L-3d)₂.

Opierając się na powyższych wnioskach spodziewałem się, że jest możliwe wytworzenie kapsuł heterochiralnych, np. (L-3d)(D-3d), mimo iż nie byłem w stanie otrzymać ani monomeru L-3d, ani też homochiralnej kapsuły (L-3d)₂. Pierwszym pomysłem było wykorzystanie poprzednio utworzonej kapsuły (L-3a)₂ jako templat. Przeprowadziłem reakcję pomiędzy rezorcyn[4]arenem, formaliną i D-waliną (D-2d) w obecności stechiometrycznej ilości (L-3a)₂. Jak się okazało otrzymałem w ten sposób heterochiralną kapsułę hybrydową (L-3a)(D-3d) z wydajnością 45%. Dowiodło to ostatecznie,

że to proces asocjacji steruje przebiegiem reakcji i jest jej siłą napędową. Następnie podjąłem próbę otrzymania analogicznych kapsuł, jednak bez użycia gotowej kapsuły w charakterze templaty. Wykonałem doświadczenia polegające na przeprowadzeniu reakcji Mannicha parami, w osobnych naczyniach: w jednym z enancjomerem L aminokwasu, natomiast w drugim – z enancjomerem D. Następnie łączyłem mieszaniny reakcyjne i mieszałem jeszcze przez jeden dzień dla osiągnięcia stanu równowagi. Tą drogą otrzymałem kapsułę (L-3a)(D-3d), poprzednio wytworzoną metodą templatową, z nieco wyższą wydajnością (51%). Strategia ta okazała się ponadto efektywna w syntezie innych kapsuł: (L-3d)(D-3d) (49%) oraz (L-3e)(D-3d) (62%, Rys. 8). Należy zaznaczyć, że kapsuły te nie są dostępne tradycyjną drogą poprzez syntezę i wydzielenie monomerów, a następnie asocjację. Próby syntezy kapsuł hybrydowych (L-3d)(D-3d), (L-3e)(D-3d) i (L-3a)(D-3d) w reakcjach typu „one pot” dwóch aminokwasów, formaliny i rezorcynarenu nie powiodły się.



Rys. 8. Samosortowanie i synteza kapsuł hybrydowych (a) z użyciem (L-3a)₂ jako templaty i (b) reakcje z udziałem poszczególnych enancjomerów w osobnych naczyniach.

Opisane zjawiska dowodzą, że synteza kapsuł molekularnych może być sterowana asocjacją. Przebieg reakcji chemicznej jest w tym przypadku nierozdzielnie związany z procesem dimeryzacji. W ten sposób możliwe jest uzyskanie hybrydowych kapsuł nawet jeśli nie jest możliwa synteza pojedynczych monomerów. Można stwierdzić, że monomery wzajemnie warunkują swoje istnienie, a właściwość tę można porównać do mutualizmu.

Badania strukturalne kapsuły otrzymanej z alaniny*

Mimo, że struktury opisanych wyżej kapsuł zostały potwierdzone ponad wszelką wątpliwość metodami NMR i spektrometrii mas, starałem się zawsze dla nowych związków otrzymać monokryształy odpowiednie do wyznaczenia struktur metodą dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego. Krystalografia ma wiele zalet jako technika analityczna, pozwala bowiem na ustalenie pełnej trójwymiarowej struktury cząsteczki (lub kilku cząsteczek). Dobrej jakości kryształy kapsuły (L-**3b**)₂ opartej na alaninie uzyskałem z roztworu w acetonie-d₆. Pomiar dyfrakcyjny został wykonany przez pracowników zespołu XII IChO. Wysoka jakość obrazów dyfrakcyjnych ($R_{\text{int}} = 0,0462$; rozdzielczość: 0,9Å) była obiecująca, jednak niespodziewane problemy pojawiły się na etapie rozwiązania struktury. Okazało się, że zastosowanie standardowych algorytmów *ab initio*, tzn. tzw. metod bezpośrednich i charge flipping (zaimplementowanych w programach ShelXS, Sir oraz Superflip) nie dało pożądanych rezultatów. Mimo wielokrotnych prób z użyciem różnych parametrów początkowych nie byłem w stanie rozwiązać struktury. Ponieważ rozwiązywanie struktur dość dużych cząsteczek nie jest zadaniem standardowym, zwróciliśmy się z propozycją współpracy do innych zespołów krystalograficznych zajmujących się krystalografią supramolekularną. Niezależne próby rozwiązania tej struktury zostały przeprowadzone przez zespół prof. Kingi Suwińskiej (IChF PAN) oraz uznanego specjalisty w tej dziedzinie, prof. Kari Rissanena (Uniwersytet Jyväskylä, Finlandia). Wysiłki podejmowane przez te grupy również nie doprowadziły do oczekiwanego sukcesu.

Struktury kapsuł molekularnych, nad którymi pracowałem, posiadają kilka cech, które sprawiają, że ich rozwiązanie, tak jak w przypadku (L-**3b**)₂, może się okazać trudne. Są one chiralne oraz składają się jedynie z lekkich atomów. Eliminuje to możliwość rozwiązania struktur z wykorzystaniem zjawiska rozpraszania anomalnego. Co więcej, ze względu na kształt cząsteczek, zawartość rozpuszczalnika jest zwykle dość duża i jest on słabo uporządkowany. Kryształy hodowane są najczęściej w roztworach w rozpuszczalnikach organicznych, które są lotne, co wywołuje problemy z ich trwałością. Ponadto kapsuły cechuje wysoka symetria. W szczęśliwym przypadku symetria kapsuły pokrywa się z symetrią kryształu (tzn. z elementami symetrii grupy przestrzennej) i wtedy struktura ulega znacznemu uproszczeniu. Jednak często zdarza się sytuacja odwrotna, co prowadzi do problemów związanych z pseudosymetrią i zbliżniaczeniem kryształów (szczególnie biorąc pod uwagę chiralność i słabe oddziaływania między kapsułami).

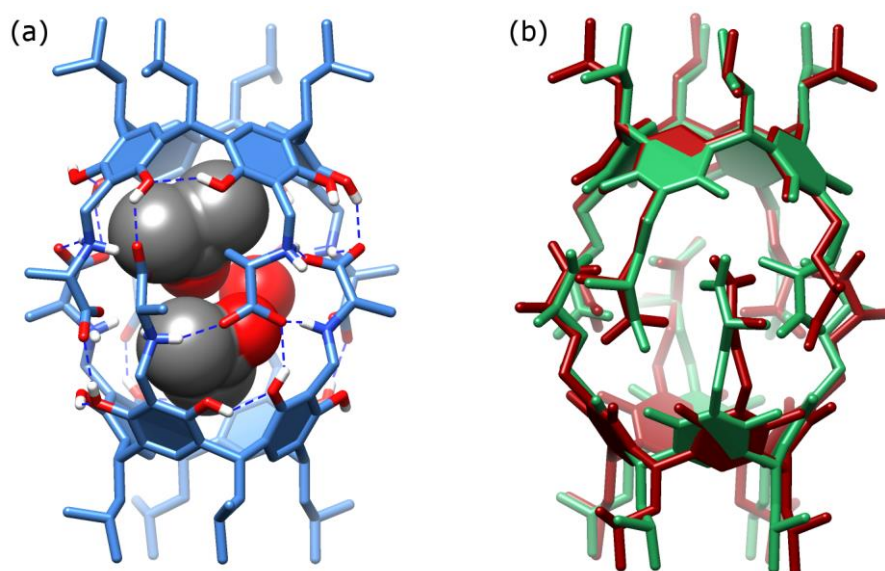
Fiasko dotychczasowych starań sprawiło, że zwróciłem się w stronę metod stosowanych w krystalografii makromolekularnej, zwanej również białkową. Krystalografia białkowa zajmuje się strukturami związków wielokrotnie większych od tych, z którymi ma do czynienia krystalografia tradycyjna. Algorytmy stosowane przy rozwiązywaniu takich struktur mają bardzo duże możliwości, niestety są one często nastawione na wąskie spektrum obiektów (białka i kwasy nukleinowe). Ponieważ nie mieliśmy doświadczenia w ich stosowaniu, podjęliśmy współpracę z prof. Mariuszem

* Wyniki opublikowane w:

M. Wierzbicki, M. Gilski, K. Rissanen, M. Jaskólski, A. Szumna, *CrystEngComm*, **2014**, 16, 3773-3780.

Jaskólskim z UAM w Poznaniu. Wspólnie z profesorem oraz jego współpracownikiem, dr Mirosławem Gilskim, podjąłem próbę rozwiązania naszej problematycznej struktury metodą Molecular Replacement (MR) z użyciem programu PHASER. Jest to metoda stosowana w krystalografii białek w sytuacji, kiedy istnieje wyznaczona wcześniej struktura o dużym podobieństwie (zbliżonej sekwencji aminokwasów) do tej, którą chce się rozwiązać. Tę wcześniej wyznaczoną strukturę program traktuje jako model i znajduje jej optymalne położenie w komórce elementarnej tak, aby eksperymentalny obraz dyfrakcyjny jak najlepiej zgadzał się z tym odpowiadającym modelowi. Ponieważ dysponowałem wyznaczoną przeze mnie strukturą (L-**3a**)₂, liczyłem (zakładając, że nieznaną strukturę różnić się będzie jedynie pozycją łańcuchów bocznych), że zastosowanie MR doprowadzi do oczekiwanego rezultatu.

Jako model w pierwszym podejściu do rozwiązania struktury (L-**3b**)₂ wykorzystaliśmy strukturę (L-**3a**)₂, z której usunęliśmy niepotrzebne pierścienie aromatyczne łańcuchów bocznych oraz grupy izobutylowe pochodzące od rezorcynarenu (Rys. 10a). Jak się okazało, PHASER znalazł rozwiązanie już w tej pierwszej próbie, bez modyfikacji żadnego ze standardowych parametrów. Strukturę tę udokładniłem z użyciem ShelXH do $R_1=0,0995$ (Rys. 9a). Związek (L-**3b**)₂ wykrystalizował jako kapsuła analogiczna do (L-**3a**)₂, w grupie przestrzennej $P2_12_12_1$. Jej symetria w fazie stałej jest zaburzona, ponieważ jedna z grup metylowych alaniny jest skierowana do wewnątrz dimeru (w przeciwieństwie do konformacji stwierdzonej w roztworze, w której wszystkie ramiona są równocenne). Co więcej, wzajemne położenie fragmentów rezorcyn[4]arenu jest inne, tzn. kąt dwuścienny wyznaczony przez odpowiadające sobie atomy i oś kapsuły w (L-**3b**)₂ wynosi 29° (w porównaniu do 44° dla (L-**3a**)₂). Mimo tych znaczących różnic strukturalnych program PHASER znalazł poprawne rozwiązanie, co świadczy dobrze o jego możliwościach. Średnia kwadratowa różnica położenia odpowiadających sobie atomów pomiędzy (L-**3b**)₂ i modelem (tzw. parametr RMSD) wynosi 0,912Å.

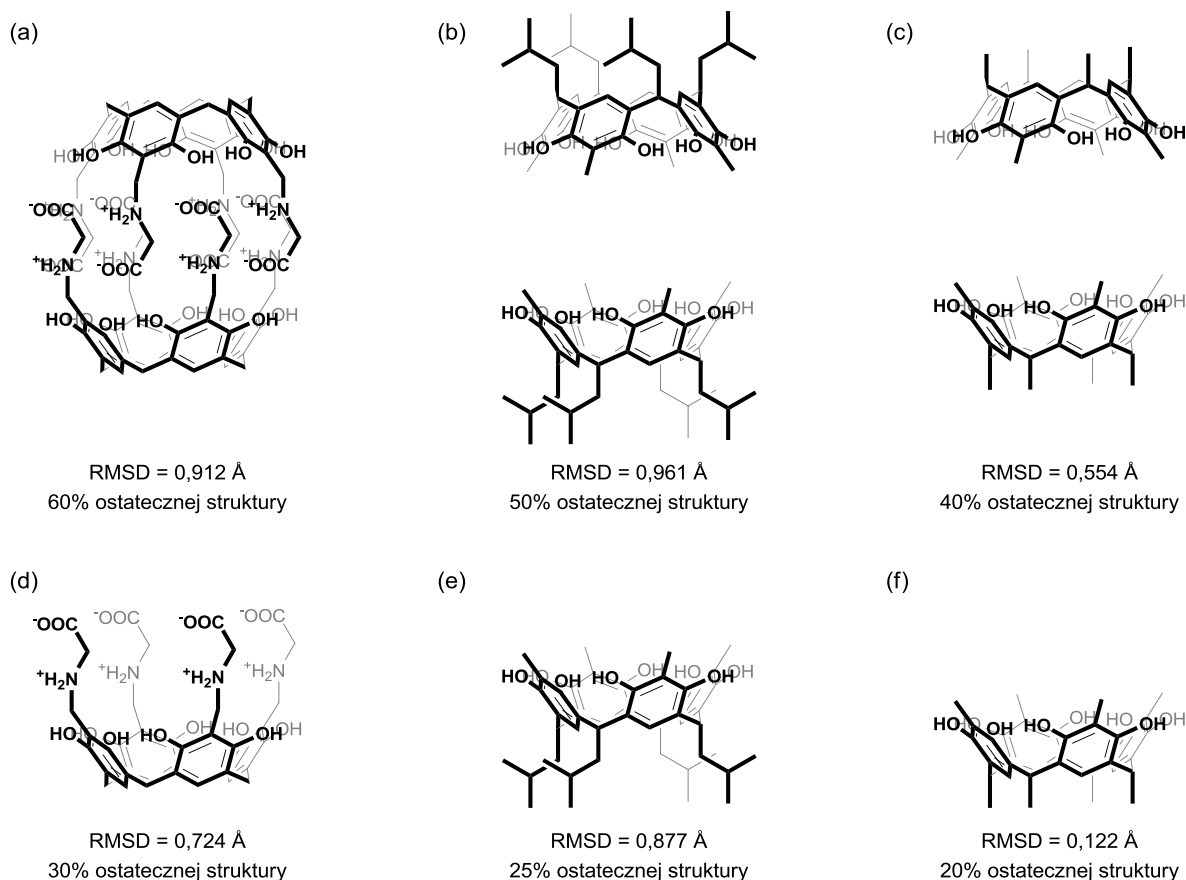


Rys. 9. (a) Struktura (L-**3b**)₂ oraz (b) porównanie konformacji (L-**3b**)₂ (zielony) i modelu (czerwony).

Zachęcony tym sukcesem zdecydowałem się dokładniej sprawdzić możliwości programu PHASER. W szczególności chciałem sprawdzić jak duża część finalnej struktury musi być obecna w modelu, aby było możliwe otrzymanie poprawnego rozwiązania. Uznałem, że jest to istotny

problem z punktu widzenia zastosowania metod krystalografii białek w chemii supramolekularnej. Struktura większości podstawowych bloków budulcowych w chemii supramolekularnej jest dokładnie wyznaczona doświadczalnie. Dlatego istotne jest określenie jaka część struktury powinna być znana, aby można było skorzystać z procedur MR. W przypadku białek i kwasów nukleinowych zależności te zostały dogłębnie przeanalizowane, nie prowadzono jednak tego rodzaju badań pod kątem zastosowań supramolekularnych. Nie można również w prosty sposób przełożyć wniosków wyciągniętych dla makromolekuł na syntetyczne układy supramolekularne, ponieważ różnią się one znacząco pod względem rozdzielczości danych dyfrakcyjnych i stopnia dopasowania modelu.

W tym celu przeprowadziłem próby ponownego rozwiązania struktury (L-3b)₂ korzystając z innych modeli przygotowanych w oparciu o strukturę (L-3a)₂ (Rys. 10b-f) i stosując początkowo tylko standardowe ustawienia oprogramowania.



Rys. 10. Struktury chemiczne modeli używanych przy próbach. Przy każdym modelu podana jest średnia kwadratowa różnica w położeniu odpowiadających sobie atomów (RMSD).

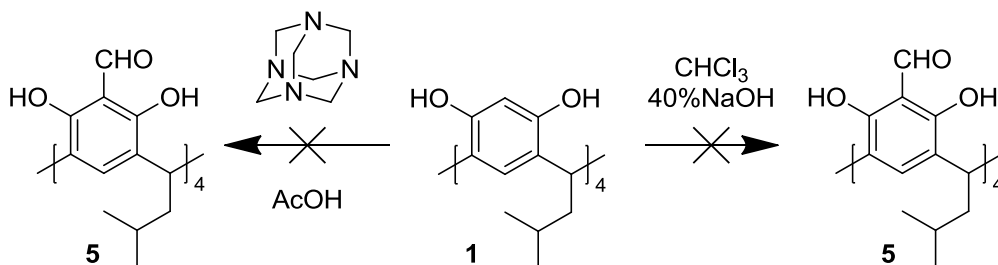
Stopniowo zmniejszając wielkość modelu doszedłem do wniosku, że poprawne rozwiązanie nie jest w prosty sposób zależne od rozmiarów modelu. Struktura została rozwiązana z użyciem modelu składającego się z dwóch rezorcyn[4]arenów, znajdujących się w odpowiedniej odległości od siebie, ale skręconych pod niewłaściwym kątem (Rys. 10c). Również model zawierający jeden rezorcyn[4]aren, ale posiadający nieusunięte grupy izobutylowe (Rys. 10e) pozwolił na rozwiązanie struktury. Natomiast zastosowanie modeli przedstawionych na Rys. 10b, d i f nie doprowadziło do rozwiązania.

Program PHASER standardowo sprawdza dla każdego potencjalnego rozwiązania liczbę zderzeń pomiędzy atomami C_{α} i odrzuca te ze zbyt dużą ich ilością. Ustaliłem, że wyłączenie tej funkcji może zwiększyć szanse powodzenia w przypadku mojej struktury, która nie jest przecież białkiem. Takie podejście pozwoliło na rozwiązanie struktury (L-**3b**)₂ z wykorzystaniem dwóch innych modeli (Rys. 10b i d), dla których nie było to możliwe bez modyfikacji ustawień oprogramowania.

Metody używane w krystalografii białkowej wydają się być niezwykle użyteczne w ustalaniu struktur kryształów supramolekularnych, które bywają dużym wyzwaniem dla tradycyjnej krystalografii. Szczególnie przydatne okazały się algorytmy Molecular Replacement zaimplementowane w programie PHASER, efektywne nawet bez modyfikacji domyślnych ustawień. Wyniki moich prac dowodzą, że są one w stanie rozwiązywać trudne problemy strukturalne wykorzystując modele stanowiące niewielką część (25%) poszukiwanej struktury.

Synteza tetraformylrezorcyn[4]arenu i jego reakcje z aminami pierwszorzędowymi*

Opisane dotąd przeze mnie kapsuły powstawały w procesach tylko częściowo odwracalnych, o czym świadczy sukces syntezy kapsuł hybrydowych. Wydajności ich otrzymywania były zadowalające, o ile wstępny etap został przeprowadzony w osobnych naczyniach. Jednak próby syntezy typu „one pot” drogą reakcji Mannicha nie powiodły się ze względu na nieodwracalne przyłączanie różnych aminokwasów do tego samego szkieletu rezorcyn[4]arenu (pierwszy etap reakcji). Dlatego w następnej fazie badań postanowiłem przetestować możliwość wykorzystania procesu w pełni odwracalnego, jakim jest kondensacja amin z aldehydami i ketonami (często wykorzystywana w dynamicznej chemii kowalencyjnej). Podjąłem więc próby syntezy tetraformylrezorcyn[4]arenu, związku który dałby możliwość odwracalnego przyłączania aminokwasów i peptydów do szkieletu makrocyclicznego. Ponadto mógłby on otworzyć drogę do wielu innych modyfikacji rezorcyn[4]arenu z wykorzystaniem bogatej chemii grupy aldehydowej. Z zaskoczeniem stwierdziłem, że mimo dość prostej budowy związek ten nie był poprzednio opisany w literaturze. Powodem tego stanu rzeczy może być fakt, że wprowadzenie podstawnika do układu makrocyclicznego często okazuje się problematyczne. Aby powstał pożądaný produkt przemiana musi zajść w kilku pozycjach tej samej cząsteczki. Dlatego żeby uzyskać zadowalającą wydajność trzeba wykorzystać reakcję, która zachodzi dobrze w wariantach małowcząsteczkowych.



Rys. 11. Próby syntezy tetraformylrezorcyn[4]arenu.

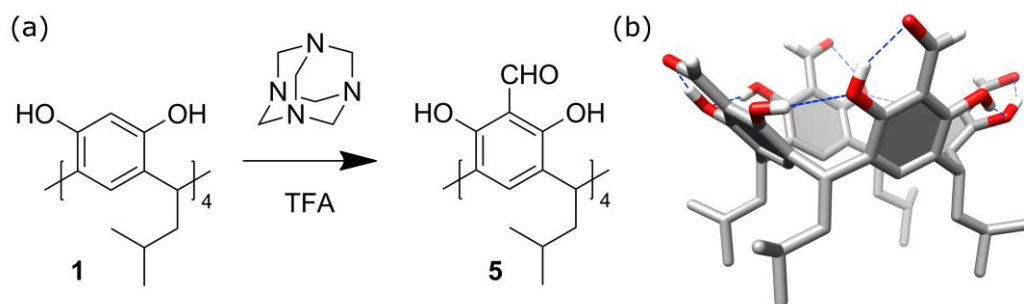
W celu otrzymania tego potencjalnie bardzo użytecznego związku przetestowałem najważniejsze drogi syntezy aromatycznych aldehydów. Jako pierwszą zastosowałem reakcję Reimera-Tiemanna w dwóch wariantach: dwufazowym (CHCl_3 , 40% NaOH , Et_3N) oraz homogenicznym (MeOH , NaOH , stechiometrycznie CHCl_3). W obu przypadkach stwierdziłem skomplikowane mieszaniny produktów oraz niepełną konwersję substratu. Drugą sprawdzaną metodą była reakcja Duffa. W klasycznej wersji polega ona na reakcji fenolu z urotropiną w środowisku kwasu octowego, a następnie hydrolizie kwasem siarkowym, która prowadzi do ostatecznego produktu. W podobnych warunkach obserwowałem całkowitą przemianę substratu, jednak produkt otrzymywałem w formie mieszaniny wielu związków. Podobne rezultaty

* Wyniki opublikowane w:

M. Grajda, M. Wierzbicki, P. Cmoch, A. Szumna, *J. Org. Chem.*, **2013**, 78, 11597-11601.

otrzymywałem stosując metanol lub THF jako rozpuszczalnik i prowadząc reakcję wobec niewielkiej ilości kwasu octowego.

Wykorzystując nowe doniesienia literaturowe na temat formylowania kaliks[4]- i kaliks[5]arenów,²⁷ wspólnie z Marcinem Grajdą, studentem Wydziału Chemii UW, który pracował wówczas pod moją opieką nad swoją pracą magisterską, wprowadziliśmy modyfikacje do zastosowanych wcześniej warunków Duffa. W miejsce kwasu octowego, jako rozpuszczalnik zastosowaliśmy kwas trójfluorooctowy (TFA), a ponadto reakcję prowadziliśmy w reaktorze mikrofalowym (Rys. 12a). Tą drogą otrzymaliśmy związek **5** z wydajnością 48%.



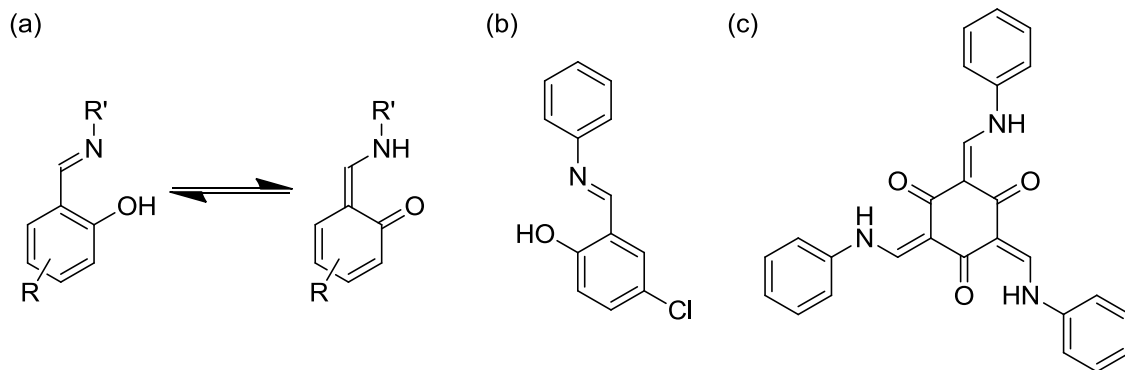
Rys. 12. (a) Synteza związku **5**, oraz (b) jego struktura w cieple stałym.

Strukturę związku **5** potwierdziliśmy ponad wszelką wątpliwość metodami NMR, IR, MS oraz analizy elementarnej. Obecność dwóch sygnałów atomów wodoru grup hydroksylowych (przy 8,4 i 13,1 ppm) w widmie ¹H NMR w CDCl₃ wskazuje na to, że cząsteczka występuje w konformacji o symetrii punktowej C₄. Tak duża różnica przesunięć sugeruje istnienie układu dwóch wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych.²⁸ Co ciekawe prowadzi to również do rozdzielania sygnałów pochodzących od aromatycznych atomów węgla w widmie ¹³C NMR (zaobserwowałem sześć sygnałów). W dużo bardziej polarnym rozpuszczalniku, jakim jest DMSO-d₆, stwierdziłem obecność tylko jednego sygnału pochodzącego od atomów wodoru grup hydroksylowych, oraz czterech sygnałów w zakresie aromatycznym w widmie ¹³C NMR. Świadczy to o szybkiej wymianie (w skali czasu NMR) pomiędzy konformacjami o symetrii C₄ w DMSO oraz o wolnej wymianie w mniej polarnym rozpuszczalniku, jakim jest CDCl₃.

Dodatkowe potwierdzenie struktury uzyskałem dzięki otrzymaniu (drogą powolnej dyfuzji acetonu do roztworu **5** w toluenie) monokryształu tetraformylorzorcyn[4]arenu nadającego się do pomiarów krystalograficznych. Pomiar został wykonany w IChO PAN, a strukturę rozwiązałem bez problemu za pomocą programu ShelXS i ułożyłem przy pomocy ShelXL z wykorzystaniem interfejsu graficznego X-Seed. Jak się okazało, w cieple stałym można zaobserwować istnienie postulowanego układu wiązań wodorowych (Rys. 12b), choć w kryształce cząsteczka przyjmuje symetrię C₂, a nie C₄.

Reakcja związku **5** z aminami pierwszorzędowymi może teoretycznie prowadzić do wielu produktów ze względu na możliwość wytworzenia różnych regioizomerów, a także istnienie równowagi tautomerycznej pomiędzy formą keto-enaminową a enolowo-iminową (Rys. 13a). Przewidzenie kierunku reakcji, a w szczególności położenia stanu równowagi pomiędzy tautomerami, nie jest proste. Opierając się na dotąd opublikowanych przykładach stwierdziłem, że dla prostych

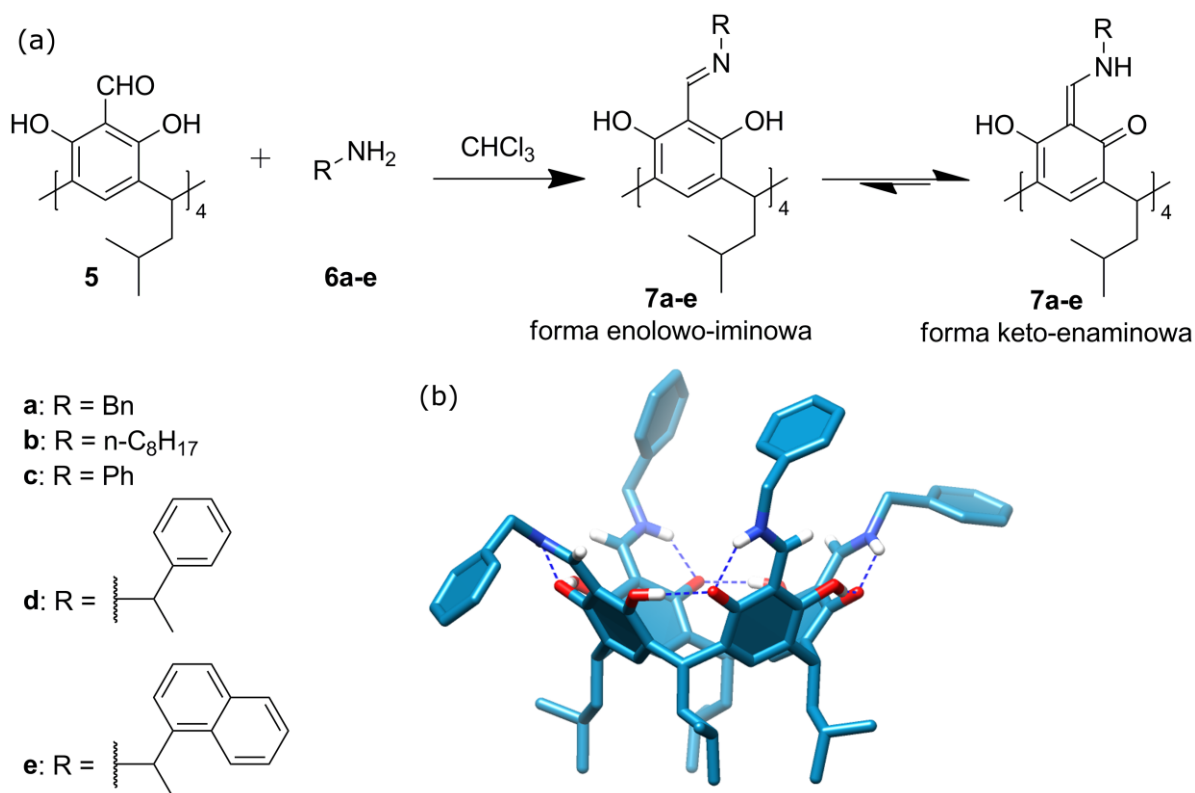
pochodnych aldehydu salicylowego stabilna jest forma enolowo-iminowa (Rys. 13b).²⁹ Z drugiej strony, w przypadku produktów kondensacji amin aromatycznych z triformylofloroglucynolem, trwałe jest tautomer keto-enaminowy (Rys. 13c).³⁰ Nie opublikowano dotąd żadnych danych eksperymentalnych dotyczących produktu kondensacji 2-formylrezorcyny z aminami pierwszorzędowymi, który byłby najbliższym analogiem dla pochodnych rezorcynarenu **5**.



Rys. 13. (a) Równowaga pomiędzy formami tautomerycznymi (enolowo-iminową i keto-enaminową) produktów kondensacji amin pierwszorzędowych z pochodnymi aldehydu salicylowego, oraz (b) i (c) przykłady stabilnych tautomerów.

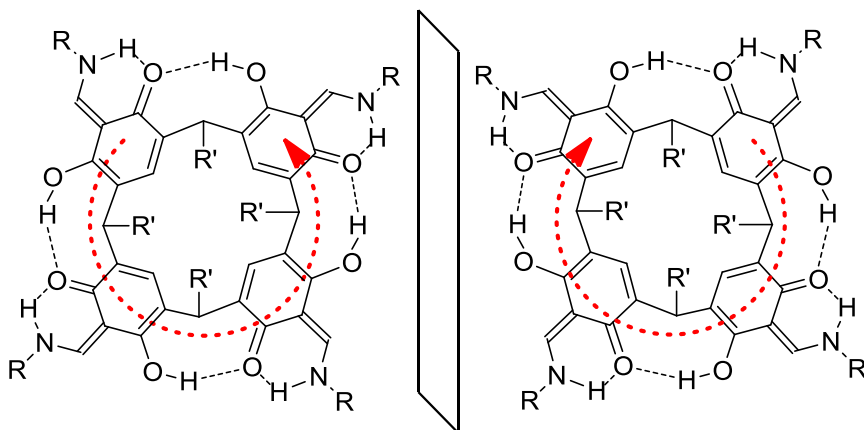
Przeprowadziłem reakcje pomiędzy **5**, a szeregiem amin pierwszorzędowych **6a-e** (Rys. 14a). Tak w przypadku amin alifatycznych jak i aromatycznych zaobserwowałem szybkie klarowanie mieszanin reakcyjnych i zmianę barwy roztworów z żółtej na czerwoną. Produkty **7a-e** wydzieliłem z wysokimi wydajnościami 95-98 %. Wszystkie związki **7a-e** posiadają proste widma ¹H NMR, co świadczy o wysoce symetrycznej budowie cząsteczek oraz o występowaniu pojedynczych regioizomerów i tautomerów. W widmach ¹³C NMR obecnych jest sześć sygnałów pochodzących od aromatycznych atomów węgla (nie licząc sygnałów pochodzących podstawnika przy grupie aminowej, jeśli takie występują), przy czym jeden z nich jest silnie przesunięty w kierunku zakresu karbonylowego (tzn. do ok. 170 ppm). Może to świadczyć o występowaniu związków **7a-e** w formie keto-enaminowej. Obecność tej formy tautomerycznej potwierdziłem dodatkowo poprzez widma korelacyjne ¹H-¹⁵N HSQC i gHMBC. Sygnały jąder azotu w tych widmach występują w zakresie -200 ÷ -180 ppm, charakterystycznym dla atomów azotu w formie keto-enaminowej.³¹ Dla porównania, ugrupowanie enolowo-iminowe daje zwykle sygnały ¹⁵N o przesunięciach w przedziale -90 ÷ -60 ppm.³² Widma HSQC dowiodły również istnienia atomu wodoru związanego z azotem (stała sprzężenia ok. 70 Hz).

Występowanie formy keto-enaminowej potwierdziłem ostatecznie dzięki uzyskaniu struktury związku **7a** w cieple stałym (Rys. 14b). Bezpośrednie wyznaczenie położenia atomów wodoru na podstawie eksperymentalnych map gęstości elektronowej jest często niemożliwe, ponieważ posiadają one tylko po jednym elektronie. Niemniej jednak, można wydedukować który tautomer jest obecny w strukturze, opierając się na długościach odpowiednich wiązań. Stwierdziłem, że w przypadku **7a** występują systematyczne różnice w długościach wiązań pomiędzy węglem a tlenem (cztery wiązania o długościach 1,298 – 1,310 Å oraz cztery o długościach 1,354 – 1,358 Å), co definitywnie dowodzi istnienia formy keto-enaminowej.



Rys. 14. (a) Reakcja tetraformylzorcyn[4]arenu z aminami pierwszorzędowymi, oraz (b) struktura **7a** w ciele stałym (większość atomów wodoru i cząsteczki rozpuszczalnika zostały usunięte dla poprawienia czytelności rysunku).

Kształt cząsteczek produktów **7a-e** przypomina śmigło, co czyni te związki chiralnymi nawet bez potrzeby przyłączenia dodatkowych chiralnych grup (Rys. 15). W przypadku achiralnych amin (**7a-c**) produkty są oczywiście racemiczne. Co za tym idzie, wprowadzenie asymetrycznego podstawnika powinno doprowadzić do wytworzenia diastereoizomerów rozróżnialnych poprzez NMR.



Rys. 15. Enancjomery **7a-c**.

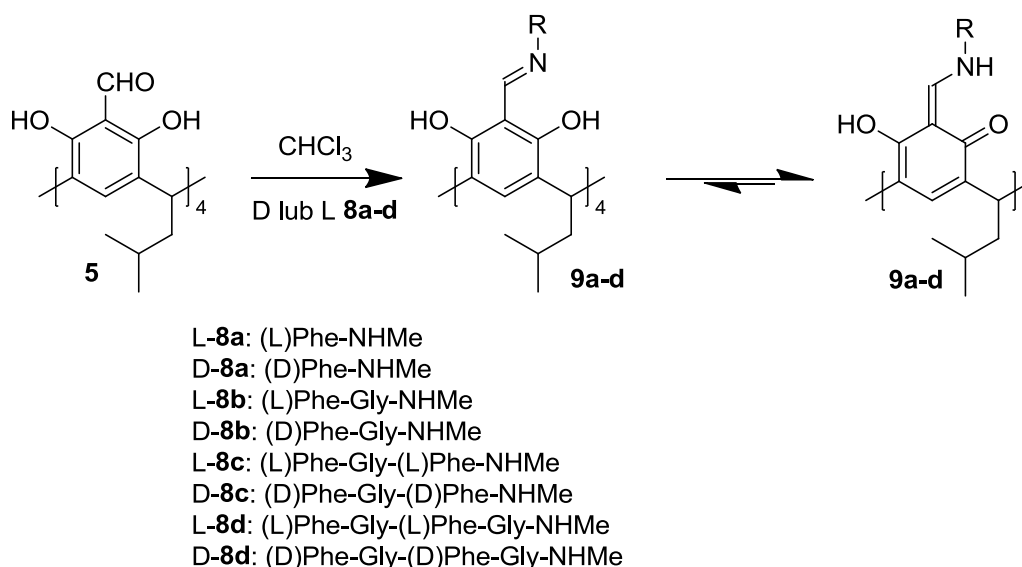
Aby to sprawdzić przeprowadziłem kondensację tetraformylzorcyn[4]arenu z chiralnymi aminami (*R*)-**6d** i (*R*)-**6e**. W obu przypadkach stwierdziłem dwa zestawy sygnałów tak w widmach ¹H jak i ¹³C NMR. Stosunek stężeń diastereoizomerów (wyznaczony na podstawie całkowania widm

^1H NMR) wynosi dla (*R*)-**7d** 55:45, natomiast w przypadku (*R*)-**7e**, produktu bardziej zatłoczonego sterycznie, jest on wyższy i wynosi 68:32. Widma 2D ROESY wykazały dla obu tych związków brak korelacji pomiędzy dwoma zestawami sygnałów, natomiast eksperymenty EXSY wykluczyły jakąkolwiek wymianę pomiędzy diastereoizomerami w skali czasu NMR. Mimo tego, próby rozdzielania izomerów drogą chromatografii nie powiodły się.

Interesujące wyniki dało wykonanie analogicznych eksperymentów z zastosowaniem racemicznych amin *rac*-**6d** i *rac*-**6e**. Dla *rac*-**6d** otrzymałem skomplikowaną mieszaninę keto-enamin bez żadnej widocznej prawidłowości. Jednak w przypadku *rac*-**6e**, otrzymałem mieszaninę identyczną z tą uzyskaną z użyciem optycznie czystej aminy (*R*)-**6e** (oczywiście tutaj w formie racemicznej, o identycznych widmach ^1H i ^{13}C NMR). Świadczy to o dużej zdolności do skutecznego samosortowania, którą zaobserwowałem po raz pierwszy, a która została później wykorzystana w syntezie kapsuł molekularnych w Zespole IX IChO.

Struktury peptydowych kapsuł molekularnych w ciele stałym*

W ramach pracy nad swoją pracą doktorską mgr inż. Hanna Jędrzejewska przeprowadziła syntezę kapsuł molekularnych wychodząc z tetraformylrezorcyn[4]arenu i serii aminokwasów oraz krótkich peptydów o wolnych *N*-końcach (Rys. 16). Kapsuły te powstają w procesach typu „one pot”, w których ważną rolę odgrywają zjawiska chiralnego sortowania, tautomerizacji, chiralnej indukcji i samoasocjacji. Mimo że niezwykle interesujące, zarówno synteza, jak i dynamiczne właściwości tych związków nie są przedmiotem niniejszej rozprawy. Mój wkład w tę pracę był bezpośrednią kontynuacją zainteresowań procesami sortowania oraz wynikiem doświadczeń w rozwiązywaniu struktur metodami białkowymi. Polegał on na pomiarze (w tym również z użyciem synchrotronowych źródeł promieniowania), rozwiązywaniu i analizie struktur peptydowo-rezorcynarenowych kapsuł molekularnych.

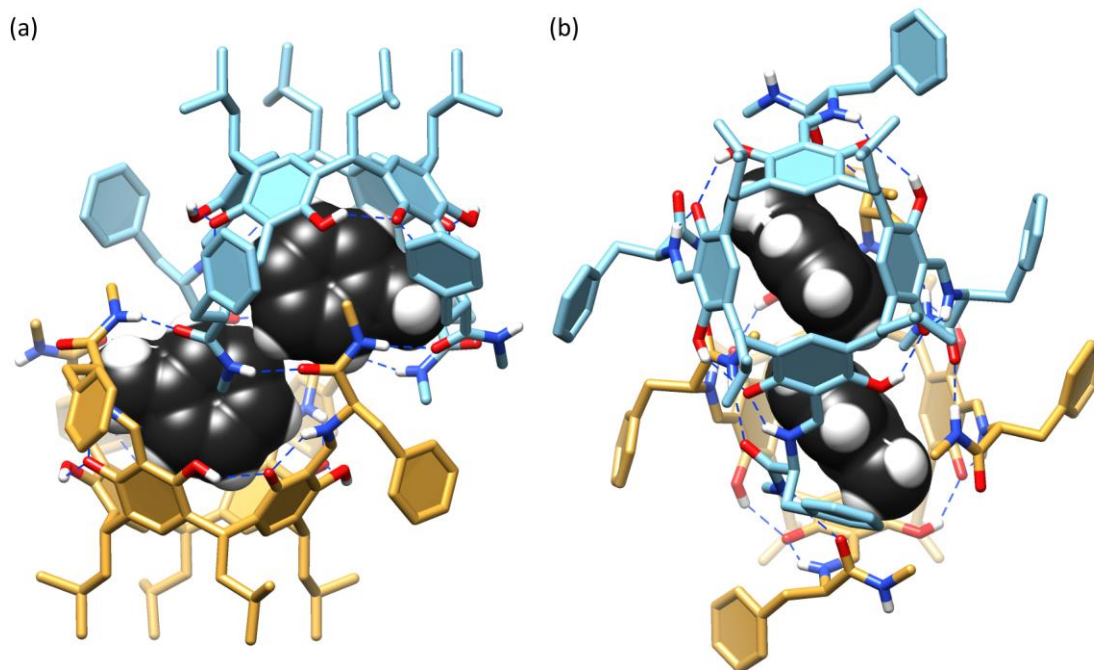


Rys. 16. Dynamiczna synteza kapsuł molekularnych.

Najprostsza z opisywanych kapsuł składa się z dwóch monomerów o przeciwnej chiralności: L-9a i D-9a. Taką budowę (w przeciwieństwie do samego L-9a, który nie tworzy kapsuły) potwierdzają widma NMR, w tym ROESY i DOSY. Ilość sygnałów wskazuje na dimer o symetrii S_8 . Monokryształ tego związku otrzymałem z roztworu w toluenie. Pomiar dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego został wykonany na dyfraktometrze Agilent SuperNova. Strukturę rozwiązałem metodami bezpośrednimi używając programu ShelXS i udokładniłem za pomocą ShelXL.

* Wyniki opublikowane w:

H. Jędrzejewska, M. Wierzbicki, P. Cmoch, K. Rissanen, A. Szumna, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 13760-13764.



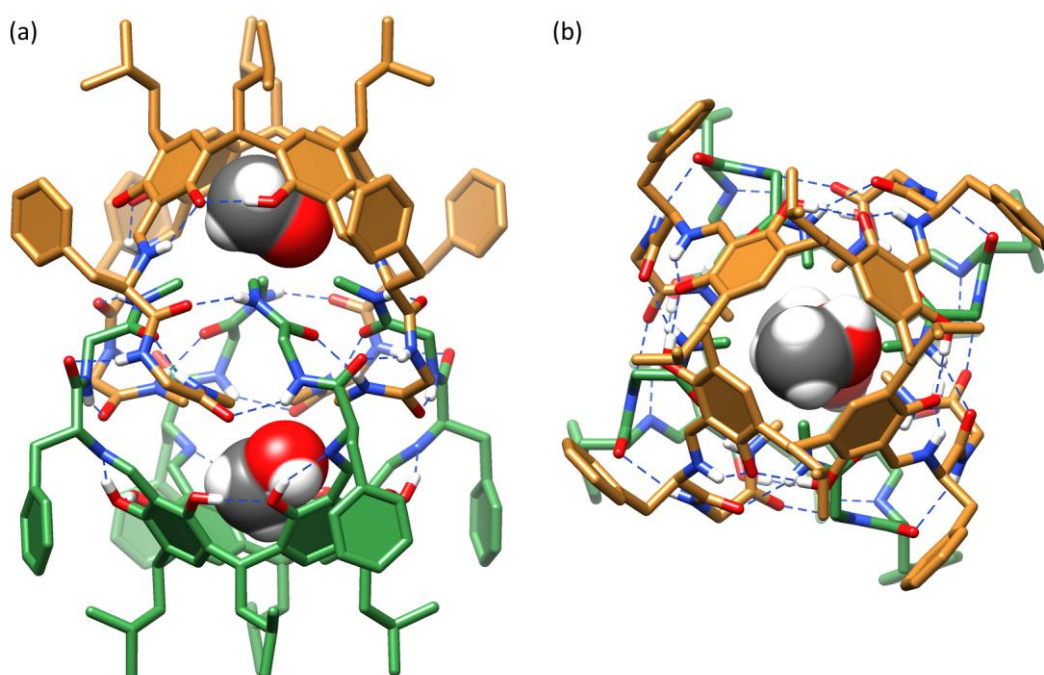
Rys. 17. Struktura (L-**9a**)(D-**9a**). Atomy wodoru niezaangażowane w wiązania wodorowe zostały pominięte dla lepszej przejrzystości rysunku.

Związek (L-**9a**)(D-**9a**) wykrył się w formie kapsuły, jednak jego struktura w ciele stałym różni się nieco od tej zaobserwowanej za pomocą NMR w roztworze (Rys. 17). Jak się okazało, we wnętrzu dimeru ulokowane są dwie cząsteczki toluenu. Rozpuszczalnik, ze względu na swój rozmiar, nie pozwala na utworzenie pełnego zestawu wiązań wodorowych wokół kapsuły. Symetria kapsuły jest z tego powodu zaburzona, choć monomery nadal pozostają w relacji centrosymetrycznej. Co więcej, można przypuszczać, że w roztworze kapsuła występuje w formie bardziej symetrycznej, na co wskazują wyniki badań NMR. Dodatkowo, struktura w ciele stałym potwierdziła występowanie obu monomerów w formie keto-enaminowej, co zaobserwowano również poprzez NMR.

W przeciwieństwie do **9a**, związek **9b** tworzy dimery homochiralne, tzn. złożone z monomerów o tej samej konfiguracji. Co więcej badania NMR wskazują, że monomery te, mimo iż są utworzone z aminokwasów o jednakowej chiralności, nie są identyczne. Widma ^1H i ^{13}C wskazują na to, że monomery występują w dwóch odmiennych formach tautomerycznych. Hipoteza ta znalazła potwierdzenie także w widmach ^{15}N NMR, w których zaobserwowaliśmy zarówno sygnał charakterystyczny dla enaminy ($\delta = -205\text{ppm}$), jak również sygnał azotu iminowego ($\delta = -103\text{ppm}$). Dodatkowo, sygnały grup metylowych pochodzące od amidów metylowych na C-końcach są znacznie przesunięte w kierunku wyższych pól ($\Delta\delta = -1,2\text{ ppm}$).

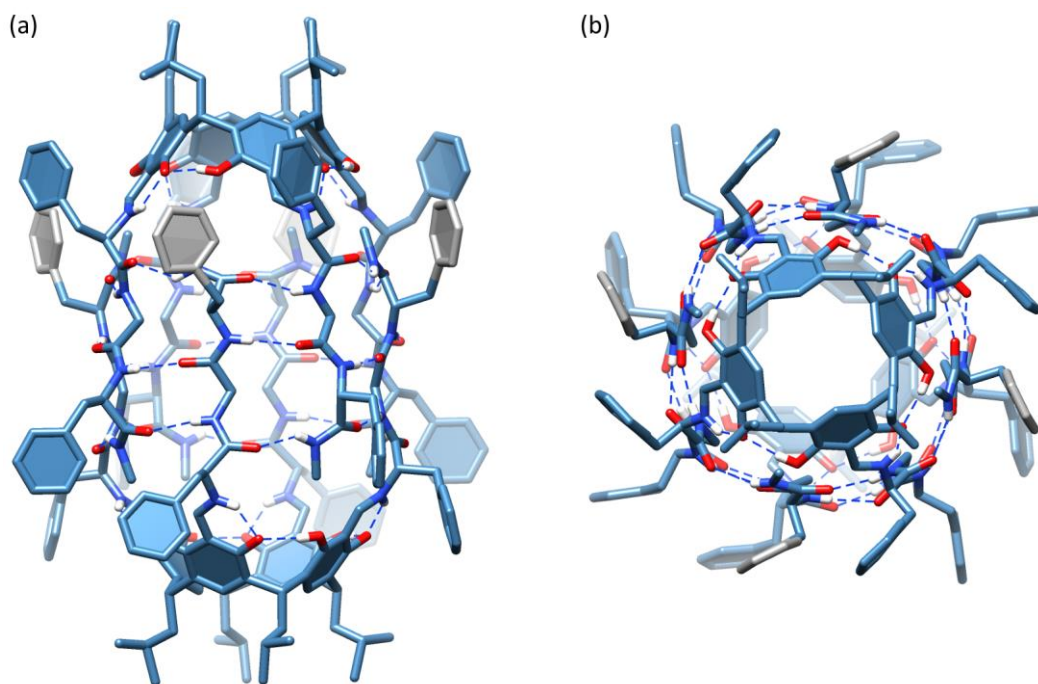
Wytlumaczenie tych obserwacji dała struktura *rac*-(**9b**)₂ w fazie stałej. Monokryształy zostały otrzymane bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej zawierającej **5** i racemiczny **8b**. Pomiar został wykonany w zespole XII IChO PAN. Strukturę rozwiązałem z użyciem metod bezpośrednich (ShelXS) i udokładniłem za pomocą ShelXL. Związek (L-**9b**)₂ w fazie stałej istnieje w formie dimeru (Rys. 18) o budowie potwierdzającej wnioski wyciągnięte z eksperymentów NMR. Długości wiązań we fragmentach pochodzących od rezorcyn[4]arenu wskazują jednoznacznie na występowanie obu

monomerów w różnych formach tautomerycznych. W szczególności dla wiązań pomiędzy węglem a tlenem stwierdziłem długości 1,292Å i 1,365Å (forma keto-enaminowa) oraz 1,376Å i 1,367Å (forma enolowo-iminowa). Mimo tego, że kryształ został otrzymany z racemicznych substratów (i sam jest w istocie racemiczny), to zawiera on jedynie kapsuły homochiralne, tzn. (L-**9b**)₂ i (D-**9b**)₂. Co ciekawe, kapsuła (**9b**)₂ nie jest znacząco wydłużona w porównaniu z (L-**9a**)(D-**9a**), pomimo, że jest zbudowana z peptydu o większej długości łańcucha. Co więcej, ułożenie łańcuchów peptydowych w (**9b**)₂ jest inne niż we wszystkich pozostałych opisywanych przeze mnie przypadkach. Monomery są związane ze sobą poprzez skomplikowany układ dwunastu wiązań wodorowych, a łańcuchy peptydowe przyjmują konformacje, które skutkują umieszczeniem amidowych grup metylowych wewnątrz dimeru. Wyjaśnia to nietypowo niskie przesunięcia chemiczne atomów wodoru tych grup w widmie ¹H NMR.



Rys. 18. Struktura (L-**9b**)₂ w ciele stałym. Atomy wodoru niezaangażowane w wiązania wodorowe zostały pominięte dla lepszej przejrzystości rysunku.

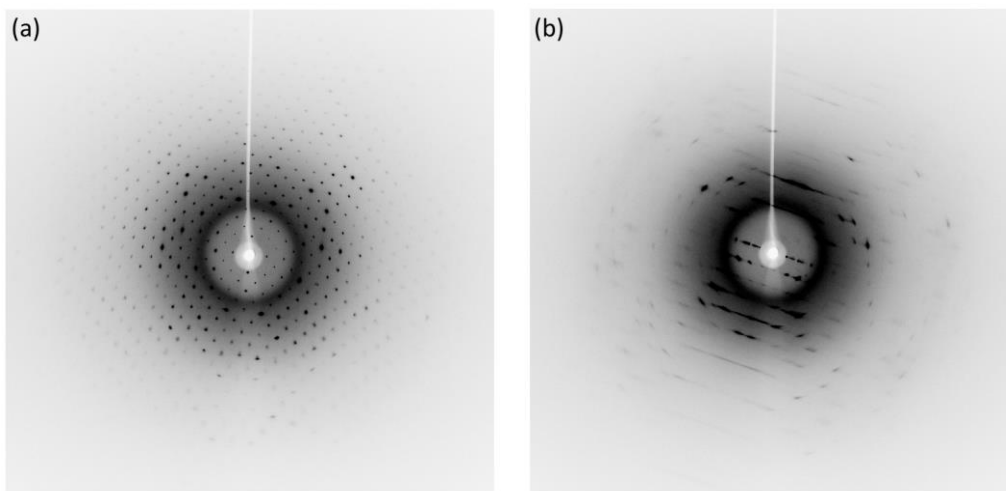
W reakcji typu one-pot z użyciem **5** i racemicznego **8c** został otrzymany związek (L-**9c**)(D-**9c**). Na jego dimeryczną budowę wskazują widma NMR, w szczególności DOSY i ROESY. Monokryształ tego związku otrzymałem poprzez powolne odparowanie roztworu w mieszaninie chlorku metylenu i cykloheksanu. Pomiar krystalograficzny został wykonany w laboratorium prof. Kari Rissanena na Uniwersytecie Jyväskylä (Finlandia). Strukturę rozwiązałem za pomocą programu ShelXS i udokładniłem przy pomocy ShelXL. Uzyskany wynik potwierdził występowanie (L-**9c**)(D-**9c**) w postaci dimeru tworzącego sieć 24 wiązań wodorowych (Rys. 19). Motyw wiążący jest komplementarny (nie zawiera niesparowanych donorów ani akceptorów wiązań wodorowych). Kapsuła, w przeciwieństwie do (L-**9b**)₂, posiada wydłużony kształt i zamyka przestrzeń o objętości około 880 Å³ (obliczone za pomocą OLEX2).



Rys. 19. Struktura kapsuły (L-9c)(D-9c). Pierścienie aromatyczne fenyloalaniny pokazane w kolorze szarym nie zostały znalezione w eksperymentalnej gęstości elektronowej.

Ze względu na duży rozmiar kapsuły, a także właściwości samego kryształu (znaczny nieporządek i duża ilość słabo zdefiniowanego rozpuszczalnika) udokładnienie doprowadziło jedynie do $R = 0,169$. Co więcej, jeden z pierścieni fenyloalaniny nie jest w ogóle widoczny na mapach gęstości elektronowej. Również cząsteczki rozpuszczalnika są zbyt mało uporządkowane, aby były możliwe do udokładnienia. Z tych powodów zastosowałem procedurę „Solvent Masking” zaimplementowaną w programie OLEX2, aby usunąć nieuporządkowane fragmenty z eksperymentalnej gęstości elektronowej. Należy zaznaczyć, że próby uzyskania wyższej jakości danych z użyciem promieniowania synchrotronowego (synchrotron BESSY II w Berlinie) nie powiodły się. Świadczy to dobitnie o istnieniu granicy możliwości analitycznych metod dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego. Jeśli obiekt badań nie jest wystarczająco uporządkowany, to niezależnie od intensywności wiązki promieniowania zjawisko dyfrakcji nie jest obserwowane.

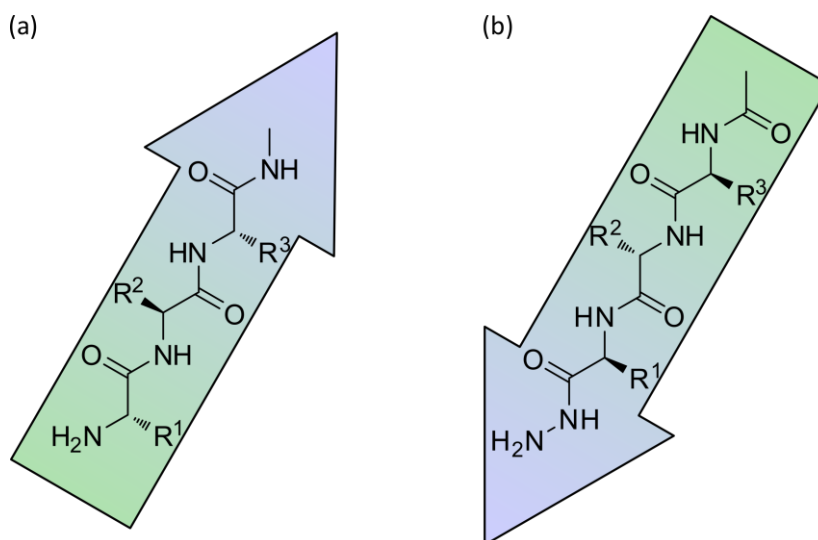
Krystalizacja produktu reakcji pomiędzy **5** i **L-8d** doprowadziła do uzyskania monokryształów, jednak ich własności okazały się nieodpowiednie dla wyznaczenia struktury $(L-9d)_2$, nawet z wykorzystaniem synchrotronu BESSY II. Kryształy wykazywały anizotropię uporządkowania, tzn. dawały dobrej jakości obrazy dyfrakcyjne (choć niezbyt wysokiej rozdzielczości) w jednym z kierunków krystalograficznych (Rys. 20a), natomiast dane uzyskane po obrocie o 90° nie nadawały się do interpretacji (Rys. 20b).



Rys. 20. Obrazy dyfrakcyjne kryształu $(L-9d)_2$. Obraz (b) został zarejestrowany po obrocie kryształu o 90° w stosunku do (a). Pomiar wykonany z pomocą wiązki promieniowania rentgenowskiego synchrotronu BESSY II.

Synteza i badania strukturalne kapsuł molekularnych opartych na motywie acylohydrazonu.*

Wspólnie z Markiem Szymańskim (studentem Politechniki Warszawskiej), w ramach jego pracy inżynierskiej wykonywanej pod moją opieką, podjęliśmy się próby wytworzenia pochodnych rezorcynarenu **5** i krótkich peptydów i aminokwasów stosując podejście nieco inne niż opisywane w poprzednim rozdziale (strona 28). Zmiana ta polegała na odwróceniu sekwencji aminokwasów i przyłączeniu peptydów do **5** poprzez ich C-koniec. Zamierzaliśmy w ten sposób zmodyfikować motyw wiążący, zwiększyć trwałość termodynamiczną kapsuł (kapsuły iminowe **9a-d** były bardzo labilne) oraz zmienić geometrię luki. W tym celu zaplanowaliśmy wprowadzenie pierwszorzędowej grupy aminowej na C-końcu. Osiągnęliśmy to poprzez syntezę szeregu hydrazydów aminokwasów i dwupeptydów (Rys. 21). Jak dowiedziono wcześniej, acylohydrazony powstające w reakcji hydrazydów z aldehydami są doskonałymi blokami budulcowymi dynamicznych bibliotek,³³ ze względu na ich trwałość, a jednocześnie odwracalność ich tworzenia.³⁴ Z tego powodu spodziewaliśmy się uzyskania związków zdolnych do samosortowania, być może w formie kapsuł molekularnych.



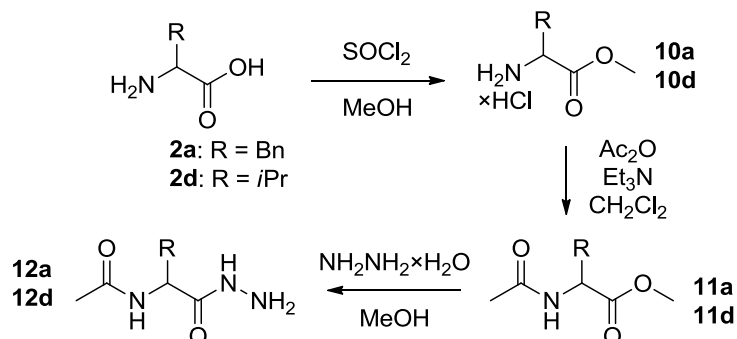
Rys. 21. Koncepcja odwrócenia sekwencji aminokwasów: (a) amid metylowy peptydu posiadający wolną grupę aminową na N-końcu, oraz (b) acetylowany hydrazyd (wolna pierwszorzędowa grupa aminowa na C-końcu).

Otrzymaliśmy hydrazydy fenyloalaniny i waliny (odpowiednio **12a** i **12d**) w obu formach enancjomerycznych, według procedury przedstawionej na Rys. 22. W pierwszym etapie

* Publikacja przyjęta do druku:

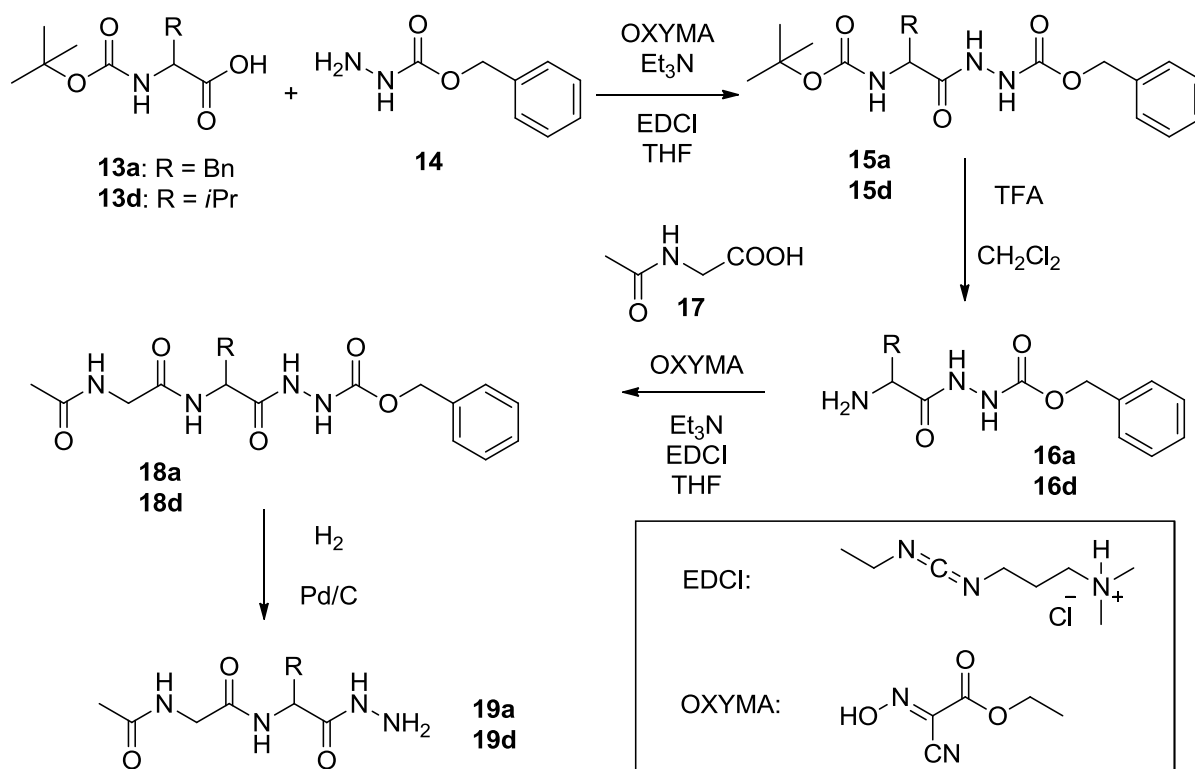
M. Szymański, M. Wierzbicki, M. Gilski, H. Jędrzejewska, M. Sztylko, P. Cmoch, A. Shkurenko, M. Jaskolski, A. Szumna, *Chem. Eur. J.*, **2016**, przyjęta do druku.

wytworzyliśmy estry metylowe aminokwasów **10a** i **10d**, a następnie przeprowadziliśmy acetylowanie wolnych grup aminowych. Tak otrzymane *N*-acetylowane estry aminokwasów **11a** i **11d** poddaliśmy reakcji z hydratą hydrazyny, otrzymując odpowiednie hydrazydy **12a** i **12d**. Opisane reakcje przeprowadziliśmy dla obu enancjomerów waliny i fenyloalaniny.



Rys. 22. Synteza hydrazydów *N*-acetylowanych aminokwasów.

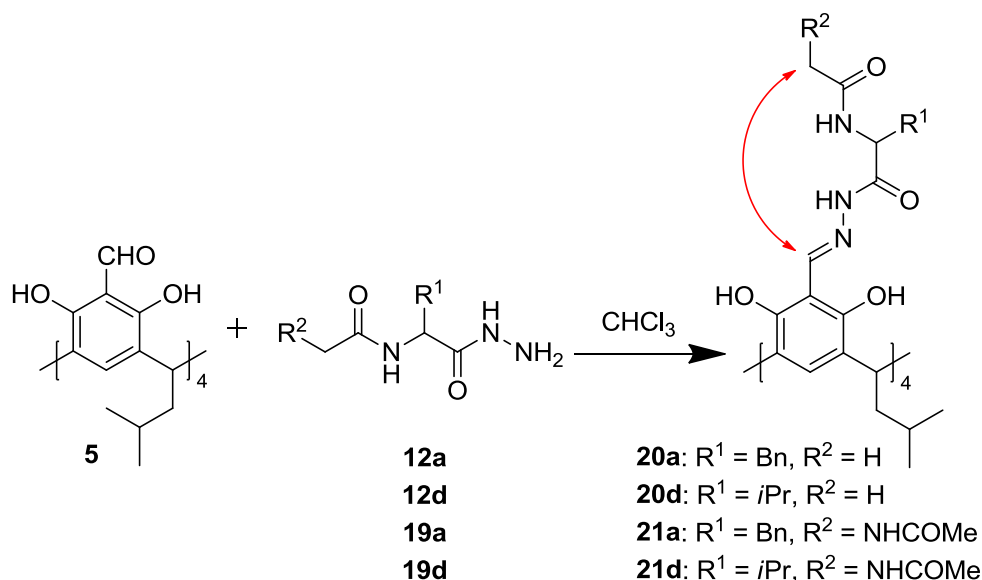
Hydrazydowe pochodne dwupeptydów: Gly-Val i Gly-Phe otrzymaliśmy w sekwencji reakcji przedstawionej na Rys. 23. W pierwszym etapie sprzęgaliśmy Boc-fenyloalaninę **13a** lub Boc-walinę **13d** z hydrazyną zabezpieczoną grupą Cbz **14** używając EDCI jako odczynnika sprzęgającego, oraz OXYMA w celu zapobieżenia racemizacji. Otrzymane produkty odbezpieczaliśmy za pomocą TFA, a następnie sprzęgaliśmy je z *N*-acetyloglicyną **17** analogicznie jak w syntezie **15a** i **15d**. Następnie przeprowadzaliśmy hydrogenolizę grupy Cbz gazowym wodorem katalizowaną palladem na węglu aktywnym, uzyskując jako produkty acetylowane hydrazydy dwupeptydów: glicylowaliny **19a** i glicylofenyloalaniny **19d**.



Rys. 23. Procedura syntezy hydrazydów *N*-acetylowanych dwupeptydów.

Wszystkie otrzymane hydrazydy wykorzystaliśmy w reakcji tworzenia acylohydrazonów z tetraformylorezorcyn[4]arenem **5**. Reakcja hydrazydów **12a**, **12d**, **19a**, **19d** z **5** wymaga ogrzewania do 70°C (w przeciwieństwie do reakcji z aminami, która zachodzi szybko w temperaturze pokojowej). W tych warunkach acylohydrazony (odpowiednio **20a**, **20d**, **21a** i **21d**, Rys. 24) otrzymaliśmy z wysokimi wydajnościami (tj. 85 – 97%).

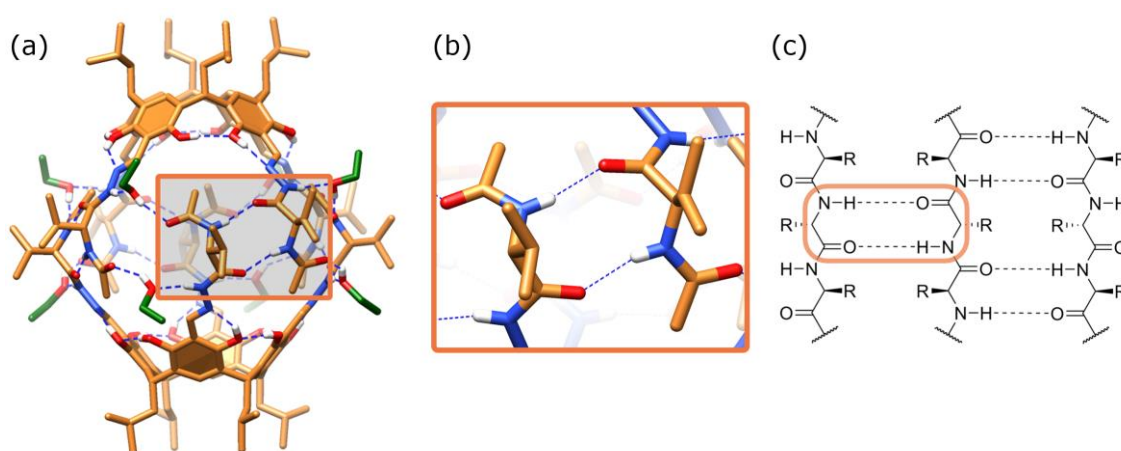
Acylohydrazony mogą teoretycznie powstawać w postaci wielu izomerów. Możliwa jest izomeria cis-trans na wiązaniu iminowym oraz izomeria wiązania amidowego. Co więcej, jak opisałem w poprzednich rozdziałach, związki tego typu mogą tautomeryzować do formy keto-enaminowej (w której znów możliwe są różne izomery typu cis-trans). Opisywana sytuacja dotyczy jedynie pojedynczego ugrupowania acylohydrazonowego. Otrzymane przez nas związki posiadają cztery takie grupy w cząsteczce, co potęguje liczbę teoretycznie możliwych form. Mimo tego, widma ^1H i ^{13}C NMR związków **20a**, **20d**, **21a** i **21d** są ostre i dość proste, i wskazują na C_4 -symetryczną budowę cząsteczek, w których występuje ta sama forma tautomeryczna we wszystkich łańcuchach. Widma HSQC i HMBC (tak ^1H - ^{13}C , jak i ^1H - ^{15}N) pozwoliły nam na ustalenie położenia atomów wodoru, a zatem na przypisanie konkretnej formy tautomerycznej produktów. Wszystkie acylohydrazony występują w postaci enolowo-iminowej. Co więcej, w widmach ROESY związków **20a** i **20d** zaobserwowaliśmy korelacje pomiędzy sygnałami protonów iminowych oraz sygnałami acetylowych grup metylowych. Widma ROESY **21a** i **21d** pozwalają natomiast zauważyć korelacje pomiędzy sygnałami protonów iminowych i atomów wodoru grup metylenowych glicyny (Rys. 24). Dodatkowo, współczynniki dyfuzji zmierzone metodą DOSY są zbliżone do tych uzyskanych dla poprzednio opisywanych dimerycznych kapsuł molekularnych. Wszystkie te dane eksperymentalne wskazują na to, że otrzymane przez nas acylohydrazony tworzą w roztworach dimeryczne kontenery molekularne.



Rys. 24. Reakcja hydrazydów z tetraformylorezorcyn[4]arenem. Czerwoną strzałką oznaczona została korelacja obserwowana w widmach ROESY.

Potwierdzeniem tej hipotezy są struktury dwóch spośród opisywanych kapsuł w ciele stałym wyznaczone metodą rentgenowskiej analizy strukturalnej. Monokryształ związku **D-20d** uzyskałem drogą powolnej dyfuzji etanolu do roztworu chloroformowego. Pomiar rentgenowski został

wykonany przez dr Aleksandra Shkurenko w Instytucie Chemii Fizycznej PAN w Warszawie. Strukturę rozwiązałem metodami bezpośrednimi z użyciem programu ShelXS i ułożyłem za pomocą ShelXL (interfejs graficzny X-Seed) do $R_1 = 0,0677$. Usunąłem gęstość elektronową pochodzącą od rozpuszczalnika będącego w nieporządku przy pomocy procedury „Solvent Masking” w programie OLEX2. W kryształach związek **D-20d** występuje w formie dimeru (**D-20d**)₂, w którym monomery oddziałują za pomocą wiązań wodorowych (Rys. 25). Kapsuła zawiera cztery pary łańcuchów aminokwasowych, tworzące motyw przypominający antyrównoległą β-kartkę. Konformacja, jaką przyjmują fragmenty waliny, jest zgodna z naturalnie występującymi β-kartkami (położenie na wykresie Ramachandrana: $\phi = -118.4^\circ$, $\psi = 107.2^\circ$). Warto zauważyć, że łańcuchy są ułożone parami wokół struktury i pary te nie są do siebie całkowicie komplementarne. Kapsuła jest zamknięta dzięki obecności cząsteczek etanolu tworzących mostki pomiędzy grupami amidowymi niezaangażowanymi w formowanie motywu β-kartki.

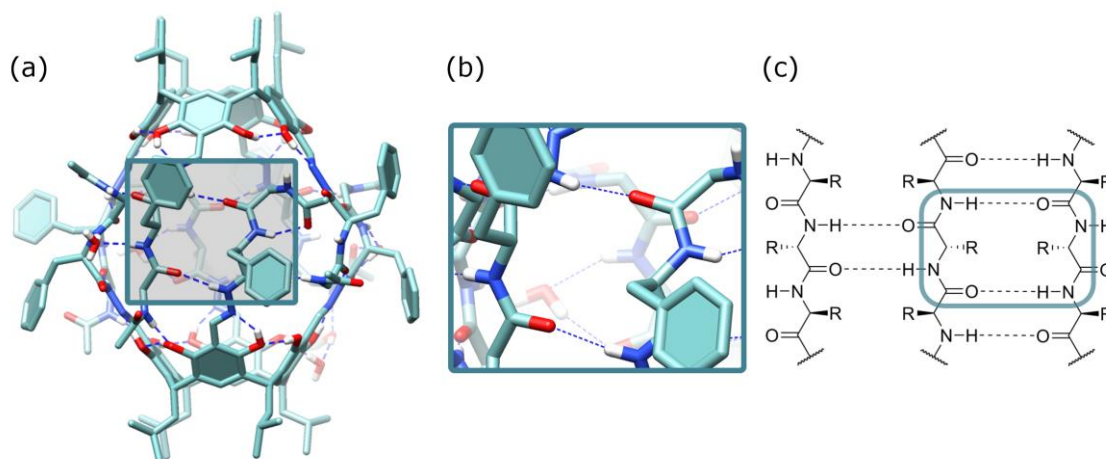


Rys. 25. (a) Struktura (**D-20d**)₂, (b) zbliżenie na fragment struktury ukazujący motyw analogiczny do β-kartki, oraz (c) budowa naturalnej β-kartki z zaznaczonym fragmentem obecnym w (**D-20d**)₂.

Również w przypadku **21a** uzyskałem potwierdzenie dimerycznej budowy dzięki wyznaczeniu struktury w ciele stałym. Otrzymałem monokryształ związku *rac*-(**21a**)₂ poprzez powolną dyfuzję izopropanolu do roztworu *rac*-(**21a**)₂ w chloroformie. Pomiar dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego wykonałem za pomocą wiązki 1911-3 synchrotronu MaxLab II (Lund, Szwecja). Strukturę rozwiązałem używając programu ShelXS i ułożyłem za pomocą ShelXL z wykorzystaniem interfejsu graficznego ShelXle. Ze względu na rozmiar kapsuły, oraz stopień skomplikowania struktury (część asymetryczna zawiera całą kapsułę), tak we wnętrzu dimerów jak i pomiędzy nimi ulokowana jest duża ilość rozpuszczalnika o słabo zdefiniowanym położeniu. Z tego powodu zastosowałem procedurę maskowania rozpuszczalnika zaimplementowaną w programie OLEX2.

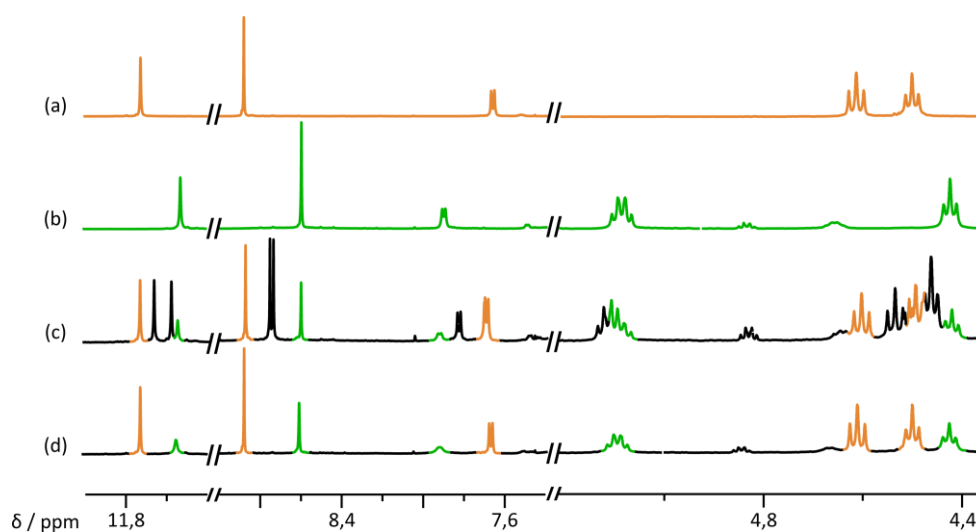
Związek **21a** tworzy kapsułę (Rys. 26a), przy czym warto zauważyć, że struktura *rac*-(**21a**)₂ zawiera wyłącznie homochiralne kapsuły (**L-21a**)₂ i (**D-21a**)₂. Jej rozmiar jest zbliżony do rozmiaru (**D-20d**)₂, co więcej, układ wiązań wodorowych w tym przypadku również odpowiada strukturze β-kartki (Rys. 26b). Jednak, o ile dla (**D-20d**)₂ obserwowałem tworzenie motywu zawierającego pierścień 10-członowy (Rys. 25c), to w *rac*-(**21a**)₂ dimeryzacja zachodzi z utworzeniem pierścieni 14-członowych (Rys. 26c), które również występują w naturalnych β-kartkach. Poza tym w strukturze

rac-(**21a**)₂, w przeciwieństwie do (**D-20d**)₂, brak jest dodatkowych mostków z udziałem rozpuszczalnika. Rolę donora i akceptora „brakujących” wiązań wodorowych pełni tu *N*-acetylowana glicyna. W kryształach ugrupowanie to dodatkowo bierze udział w oddziaływaniach międzycząsteczkowych z innymi kapsułami oraz cząsteczkami rozpuszczalnika.



Rys. 26. Struktura *rac*-(**21a**)₂, (b) zbliżenie na fragment struktury ukazujący motyw analogiczny do β-kartki, oraz (c) budowa naturalnej β-kartki z zaznaczonym fragmentem obecnym w *rac*-(**21a**)₂.

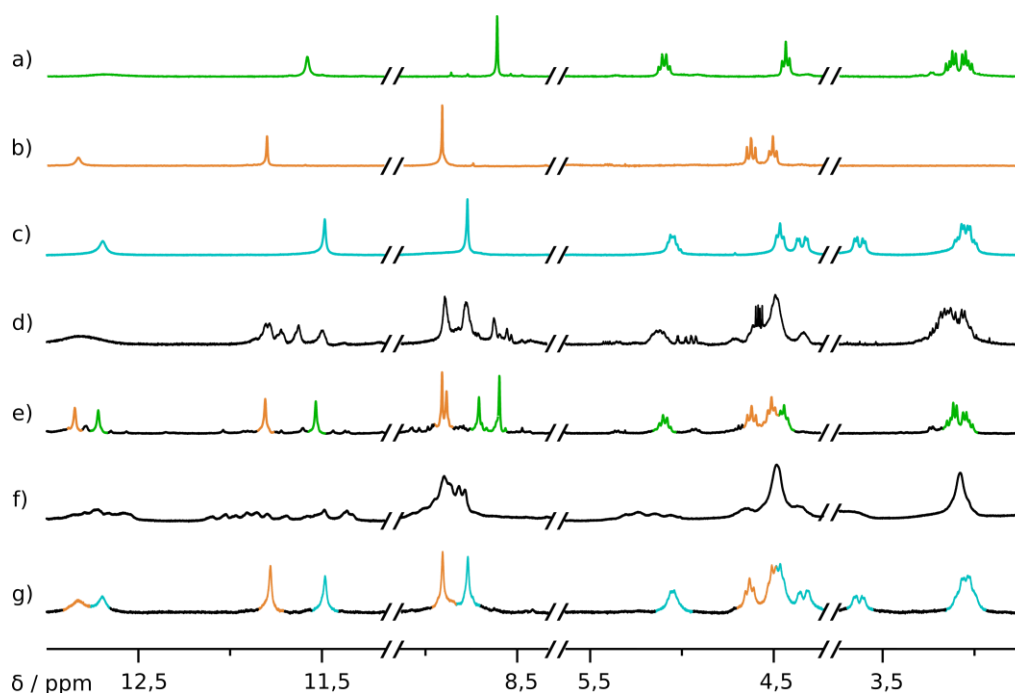
Otrzymane kapsuły cechuje wysoka stabilność oraz zdolność do samosortowania. Dowiedliśmy tego w następujących eksperymentach. Dwie równomolowe mieszaniny: (**L-20a**)₂ i (**L-20d**)₂ oraz (**L-20a**)₂ i (**D-20d**)₂ rozpuściliśmy w CDCl₃. W temperaturze pokojowej nie obserwowaliśmy zmian w widmach ¹H NMR nawet po ok. siedmiu dniach. Ogrzewanie próbek do 70°C (tzn. do temperatury, w której kapsuły zostały otrzymane) doprowadziło w przypadku mieszaniny homochiralnej do „wymieszania” fragmentów hydrazydowych i powstania statystycznego zestawu możliwych produktów, co potwierdziło dodatkowo widmo ESI-MS. Nie stwierdziliśmy natomiast obecności hybrydowej kapsuły (**L-20a**)(**L-20d**). Dla mieszaniny heterochiralnej nie zaobserwowaliśmy zjawiska podstawiania części hydrazydowych.



Rys. 27. Wymiana monomerów kapsuł pod wpływem metanolu. Widma ¹H NMR w CDCl₃ z dodatkiem 5% MeOH: (a) (**L-20d**)₂, (b) (**L-20a**)₂, (c) (**L-20a**)₂ i (**L-20d**)₂ po trzech dniach, (d) (**L-20a**)₂ i (**D-20d**)₂ po trzech dniach.

Aby doprowadzić do wymiany monomerów bez zrywania wiązań kowalencyjnych dodaliśmy do wyjściowych próbek niewielkiej ilości (ok. 5%) metanolu. Metanol tworzy wiązania wodorowe z grupami amidowymi, przez co ułatwia dysocjację kapsuł na monomery. W tych warunkach po trzech dniach w widmie ^1H NMR mieszaniny (L-20a) $_2$ i (L-20d) $_2$ stwierdziliśmy obecność dodatkowego zestawu sygnałów odpowiadającego hybrydowej kapsule (L-20a)(L-20d), co potwierdziliśmy również metodą ESI-MS. Z drugiej strony mieszanina (L-20a) $_2$ i (D-20d) $_2$ pozostała niezmieniona, tzn. nie powstały mieszane kapsuły heterochiralne, na przykład (L-20a)(D-20d). Wyniki te świadczą o dużej preferencji do tworzenia dimerów homochiralnych.

Tak silna preferencja kapsuł acylohydrazonowych do tworzenia określonego typu struktur wskazuje na ich prawdopodobną zdolność do samosortowania. Wykonaliśmy serię doświadczeń mających na celu sprawdzenie możliwości samosortowania w reakcjach z substratami o różnej długości łańcucha i różnej konfiguracji. W reakcji tetraformylrezorcyn[4]arenu **5** z hydrazdami L-12a i D-12d otrzymaliśmy wyłącznie kapsuły homochiralne, co jest w zgodzie z opisanymi wyżej obserwacjami. Nie stwierdziliśmy sortowania w przypadku użycia substratów o jednakowej chiralności, tzn. L-12a i L-12d, uzyskaliśmy natomiast skomplikowaną mieszaninę wielu produktów. Wnioski te potwierdziliśmy metodami ^1H i ^{13}C NMR, ESI-MS i HPLC.

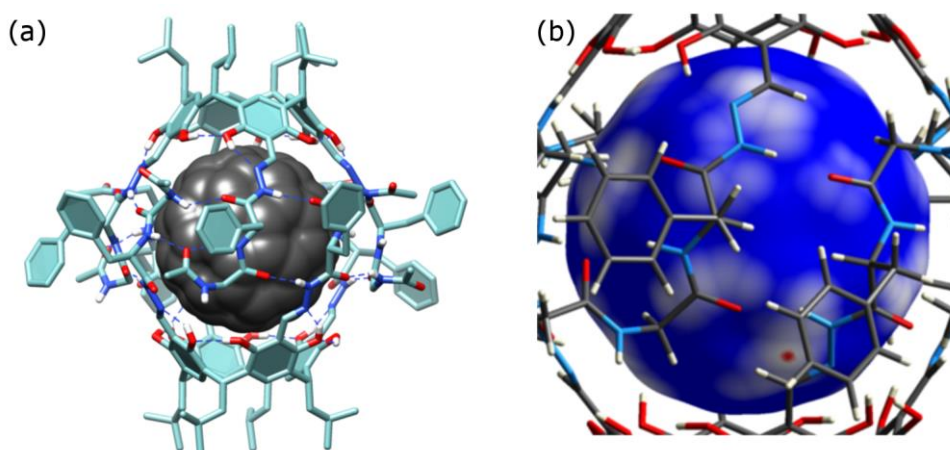


Rys. 28. Widma NMR w CDCl_3 : (a) (L-20a) $_2$, (b) (L-20d) $_2$, (c) (L-21a) $_2$, oraz produktów reakcji pomiędzy **5** a: (d) L-12a i L-12d, (e) L-12a i D-12d, (f) L-12d i L-19a, (g) L-12d i D-19a.

Co ciekawe, nie zaobserwowaliśmy sortowania w reakcji **5** z hydrazdami o jednakowej konfiguracji, ale różniącymi się długością łańcucha peptydowego, tzn. L-12d i L-19a. Jednak w przypadku L-12d i D-19a (hydrazdów o przeciwnej konfiguracji i innej długości łańcucha peptydowego) otrzymaliśmy mieszaninę zawierającą wyłącznie homochiralne dimery (L-20d) $_2$ i (D-21a) $_2$.

Tak silną tendencję do tworzenia wyłącznie kapsuł homochiralnych można wyjaśnić na podstawie struktur w ciele stałym (D -**20d**)₂ i rac -(**21a**)₂. Bliższe spojrzenie na motyw strukturalny β -kartki w obu z nich (Rys. 25b i Rys. 26b) pozwala zauważyć, że gdyby zamienić konfigurację któregokolwiek z aminokwasów, to (aby układ wiązań wodorowych pozostał niezaburzony) jego łańcuch boczny musiałby być skierowany do wnętrza kapsuły. Taka sytuacja jest z pewnością niekorzystna ze względów sterycznych. Natomiast, co do braku zależności samosortowania od długości łańcucha peptydowego, łatwo zauważyć, że system wiązań wodorowych zamykających kapsułę obejmuje jedynie pierwszy aminokwas (odpowiednio walinę i fenyloalaninę). Obecność reszty glicyny nie zmienia znacząco rozmiarów kapsuły, zatem nie wpływa również na zdolność do samosortowania.

Kształt oraz rozmiar luki wewnątrz otrzymanych kapsuł acylohydrazonowych (758 Å³ dla rac -(**21a**)₂, obliczone za pomocą OLEX2) sugeruje możliwość skompleksowania fulerenu C₆₀. Próby kompleksowania C₆₀ we wnętrzu (L-**20a**)₂ i (L-**21a**)₂ w CDCl₃ nie przyniosły oczekiwanych rezultatów mimo długiego czasu eksperymentu (do kilku tygodni). Nie pomógł dodatek metanolu ani ogrzewanie do 70°C. Jednak kiedy reakcję pomiędzy **5**, a L-**12d** lub L-**19a** przeprowadziliśmy w obecności stechiometrycznej ilości fulerenów (C₆₀ lub C₇₀), uzyskaliśmy ilościowo kompleksy C₆₀⊂(L-**20d**)₂, C₆₀⊂(L-**21a**)₂ i C₇₀⊂(L-**21a**)₂. Tworzenie tego rodzaju kompleksów potwierdziliśmy ponad wszelką wątpliwość metodami NMR i ESI-MS. Skompleksowane fulereny nie są uwalniane z kapsuł nawet po ogrzewaniu do 70°C przez 7 dni w CDCl₃. Prowadzi to do wniosku, że podczas gdy kapsuły mają silne termodynamiczne powinowactwo do fulerenów, kompleksowanie C₆₀ i C₇₀ w już utworzonych kapsułach jest uniemożliwiane przez dużą barierę kinetyczną. Mimo tego osiągnęliśmy kompleksowanie poprzez mielenie kapsuł wraz z C₆₀ przez 1 godzinę w młynie kulowo-planetarnym (w fazie stałej bez użycia rozpuszczalnika). Mechanizm działania procesów mechanochemicznych jest jak dotąd nieznan, zatem i w naszym przypadku możemy jedynie spekulować co do zjawisk zachodzących podczas mielenia.

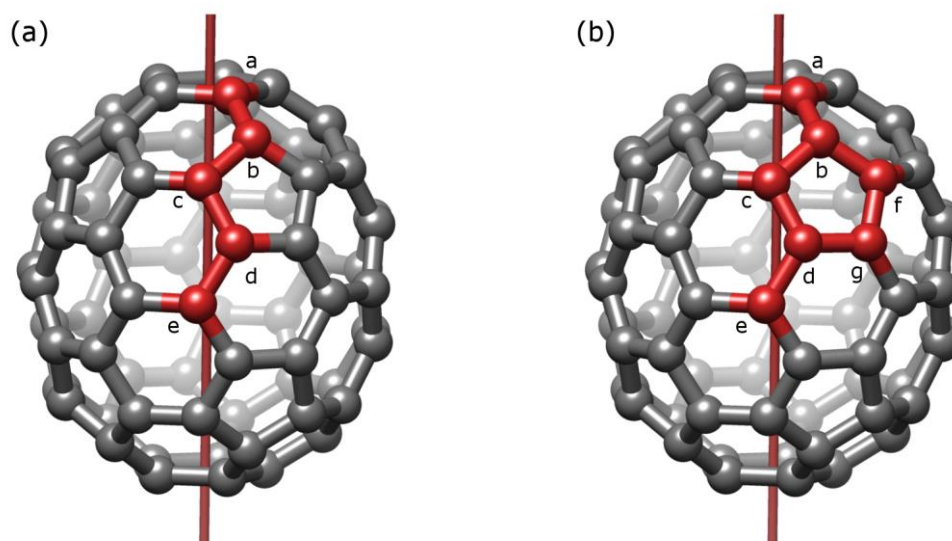


Rys. 29. (a) struktura C₆₀⊂(L-**21a**)₂, oraz (b) najkrótsze odległości naniesione na powierzchnię fulerenu: kolor czerwony oznacza odległość poniżej sumy promieni van der Waalsa.

Kompleks C₆₀⊂(L-**21a**)₂ scharakteryzowałem metodami NMR i rentgenowskiej analizy strukturalnej (pomiar wykonany na synchrotronie MaxLab II, struktura rozwiązana metodą Molecular Replacement). Widmo ¹³C NMR w CDCl₃ zawiera sygnał skompleksowanego fulerenu przesunięty

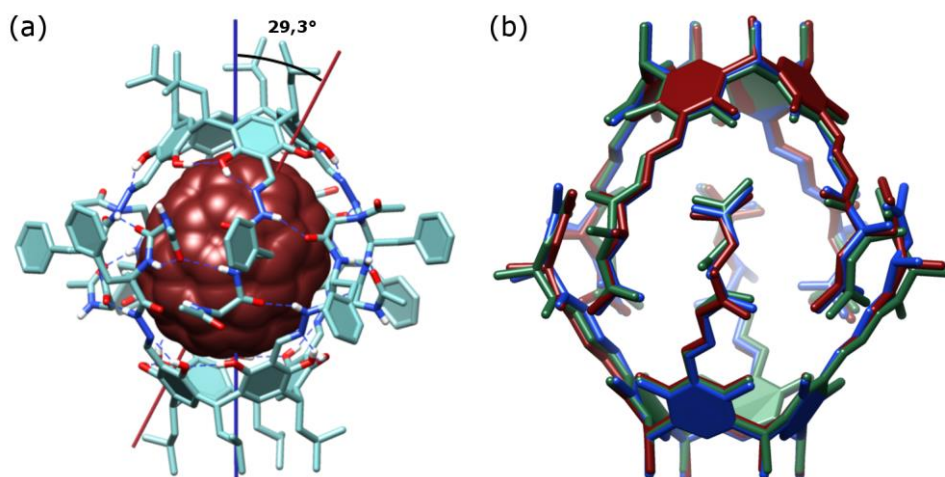
w stosunku do wolnego fulerenu o ok. 2 ppm w stronę wyższych pól. Obecność tylko jednego sygnału świadczy o równocенności wszystkich atomów węgla, co wskazuje na szybką rotację cząsteczki C_{60} wewnątrz kapsuły. Mimo tego, w kryształach, C_{60} jest usytuowany wewnątrz kapsuły w jednej pozycji w całkowitym obsadzeniu (Rys. 29a). Nie zaobserwowałem w cząsteczce C_{60} żadnego nieporządku, który świadczyłby o wielu możliwych ułożeniach fulerenu. Jest to zaskakujące, biorąc pod uwagę wysoką symetrię cząsteczki C_{60} oraz brak możliwości tworzenia jakichkolwiek specyficznych oddziaływań ze ścianami kapsuły. Systematyczna analiza odległości pomiędzy atomami gościa i kapsuły wskazuje, że pozostają one powyżej sumy promieni van der Waalsa (Rys. 29b).

W przypadku C_{70} zastosowanie mechanochemii doprowadziło do powstania jedynie śladowej ilości kompleksu $C_{70}\text{C}(\text{L-21a})_2$, nawet po wydłużeniu czasu mielenia do dwóch godzin. Mimo to, kompleksowanie zaszło ilościowo, kiedy syntezę kapsuły przeprowadziliśmy w obecności fulerenu, analogicznie do opisanego wyżej eksperymentu z udziałem C_{60} . Widmo ^{13}C NMR kompleksu $C_{70}\text{C}(\text{L-21a})_2$ pozwala zaobserwować zmiany przesunięć chemicznych i symetrii wywołane kompleksowaniem. Wolny fuleren C_{70} posiada w widmie ^{13}C pięć sygnałów, co wynika z symetrii cząsteczki (grupa punktowa D_{5h}) i świadczy o obecności pięciu nierównocennych grup atomów węgla (Rys. 30a). W widmie kompleksu stwierdziliśmy jednak siedem sygnałów odpowiadających skompleksowanemu fulerenowi. W chiralnym środowisku, jakim jest wnętrze kapsuły, dochodzi do zróżnicowania przesunięć chemicznych enancjotopowych atomów (węgle oznaczone na Rys. 30b jako *c* i *f* oraz *d* i *g* w wolnym fulerenie są od siebie zależne poprzez płaszczyznę symetrii). Zatem C_{70} przyjmuje niższą symetrię zgodną z grupą punktową D_5 . Jest to pierwszy zaobserwowany eksperymentalnie przypadek zmiany symetrii fulerenu pod wpływem chiralnego otoczenia.



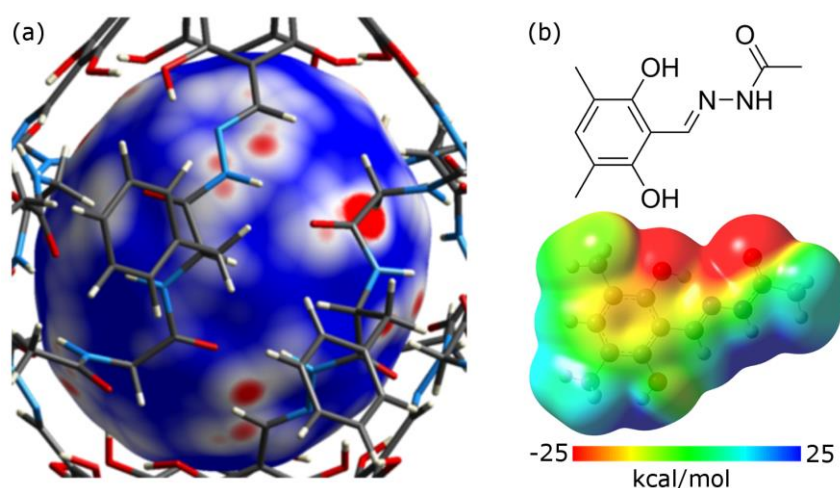
Rys. 30. Symetria fulerenu C_{70} : (a) wolny fuleren oraz (b) fuleren w chiralnym otoczeniu. Czerwoną linią zaznaczona została oś pięciokrotna C_5 .

Drogą powolnej dyfuzji metanolu do chloroformowego roztworu $C_{70}\text{C}(\text{L-21a})_2$ uzyskałem monokryształ kompleksu. Jakość kryształu pozwoliła, mimo dużego rozmiaru cząsteczek, na wykonanie pomiaru krystalograficznego na dyfraktometrze (pomiar przeprowadził dr Aleksander Shkurenko z użyciem dyfraktometru Agilent SuperNova). Strukturę rozwiązałem metodą Molecular Replacement z wykorzystaniem programu PHASER i udokładniłem wykorzystując ShelXH.



Rys. 31. (a) Struktura kompleksu $C_{70}\subset(L-21a)_2$, oraz (b) nałożenie struktur $rac-(21a)_2$, $C_{60}\subset(L-21a)_2$ i $C_{70}\subset(L-21a)_2$, odpowiednio niebieska, zielona i czerwona.

Fuleren C_{70} , podobnie jak C_{60} , jest dobrze uporządkowany w strukturze (został udokładniony z całkowitym obsadzeniem). Co ciekawe, oś symetrii fulereny nie pokrywa się z osią kapsuły (Rys. 31a), a jest od niej odchylna o około 29° . Porównanie struktur $rac-(21a)_2$, $C_{60}\subset(L-21a)_2$ i $C_{70}\subset(L-21a)_2$ pokazuje, że geometria kapsuły nie zmienia się znacząco podczas kompleksowania (Rys. 31b). Zatem powodem takiego ułożenia gościa są najpewniej korzystne oddziaływania międzycząsteczkowe. Analiza odległości międzyatomowych wskazuje na to, że najbliższe kontakty występują pomiędzy fulerem, a ugrupowaniami acylohydrazonowymi, oraz metylenowymi atomami wodoru glicyny (Rys. 32a). Warto zauważyć, że (w przeciwieństwie do dotąd znanych kompleksów fulerenów) dużo mniejszą rolę w wiązaniu gościa pełnią pierścienie aromatyczne rezorcynarenu. Aby to wytłumaczyć wykonaliśmy obliczenia *ab initio* DFT (B3LYP) potencjału elektrostatycznego dla prostej cząsteczki acylohydrazonu. Wyniki pokazują, że istnieje ładunek ujemny rozciągający się od pierścienia aromatycznego do podwójnego wiązania C=N (Rys. 32b). Oddziaływanie tego bogatego w elektrony fragmentu z cząsteczką fulereny wydaje się być korzystne i stabilizować kompleks.



Rys. 32. (a) Najkrótsze odległości naniesione na powierzchnię C_{70} (kolor czerwony oznacza odległość poniżej sumy promieni van der Waalsa) oraz (b) mapa potencjału elektrostatycznego obliczona dla cząsteczki prostego hydrazonu.

Podsumowanie

W toku prowadzonych przeze mnie prac nad chiralnymi kapsułami molekularnymi zrealizowałem w znacznej mierze postawione sobie cele badawcze:

- Wykonałem syntezę „odwróconych” kapsuł molekularnych (L-**3b**)₂ i (L-**3c**)₂ drogą reakcji Mannicha pomiędzy rezorcyn[4]arenem, formaliną i aminokwasami. Potwierdziłem ich struktury metodami NMR (w tym 2D NMR i DOSY) oraz MS.
- Otrzymałem hybrydową kapsułę molekularną (L-**3a**)(D-**3d**) drogą templatowania reakcji Mannicha za pomocą gotowej kapsuły (L-**3a**)₂. Otrzymałem również tę kapsułę, a także (L-**3d**)(D-**3d**) i (L-**3e**)(D-**3d**) w procesach częściowo odwracalnych.
- Ustaliłem strukturę kapsuły (L-**3b**)₂ w fazie stałej z zastosowaniem algorytmu Molecular Replacement zaimplementowanego w programie PHSAER i sprawdziłem możliwości tego programu stosując (L-**3b**)₂ jako strukturę testową. Doszedłem do wniosku, że do rozwiązania struktury wystarczy model zawierający jedynie 25% (masowo) docelowej struktury.
- Przeprowadziłem syntezę tetraformylrezorcyn[4]arenu **5**, oraz jego reakcje z aminami pierwszorzędowymi. Uzyskałem w ten sposób serię nowych inherentnie chiralnych (choć racemicznych) kawitandów **7a-c**. W przypadku chiralnych amin **6d** i **6e** stwierdziłem indukcję asymetryczną (powstawanie jednego z diastereoizomerów w przewodzie) i dowiodłem zdolności układu do samosortowania.
- Rozwiązałem i udokładniłem struktury trzech kapsuł molekularnych: (L-**9a**)(D-**9a**), (L-**9b**)₂, oraz (L-**9c**)(D-**9c**), powstających w reakcjach tetraformylrezorcyn[4]arenu z krótkimi peptydami.
- Przeprowadziłem syntezę kapsuł acylohydrazonowych (**20a**)₂, (**20d**)₂, (**21a**)₂ i (**21d**)₂, oraz określiłem struktury (D-**20d**)₂ i *rac*-(**21a**)₂ w fazie stałej. W przypadku *rac*-(**21a**)₂ pomiar wykonałem na synchrotronie MaxLab II (Lund, Szwecja), natomiast samą strukturę rozwiązałem metodą Molecular Replacement. Zaobserwowałem dużą zdolność kapsuł do chiralnego samosortowania.
- Stwierdziłem kompleksowanie fulerenów C₆₀ i C₇₀ we wnętrzu kapsuł acylohydrazonowych (**20d**)₂ i (**21a**)₂, drogą syntezy kapsuł w obecności gościa. Kompleksowanie potwierdziłem metodami NMR i MS. Analiza NMR doprowadziła do zaobserwowania po raz pierwszy redukcji symetrii fulerenu C₇₀ w chiralnym środowisku. Rozwiązałem i udokładniłem struktury kompleksów C₆₀⊂(L-**21a**)₂ i C₇₀⊂(L-**21a**)₂ w fazie stałej. Pomiar krystalograficzny kompleksu C₆₀ wykonałem na synchrotronie MaxLab II.
- Zaobserwowałem mechanochemiczne tworzenie kompleksu C₆₀ w kapsule (L-**21a**)₂ drogą mielenia kapsuły i fulerenu w młynie kulowo-planetarnym (przy czym proste kompleksowanie w roztworze nie zachodzi).

BIBLIOGRAFIA

1. "Isostructural M_2L_4 Molecular Capsules with Anthracene Shells: Synthesis, Crystal Structures, and Fluorescent Properties" Z. Li, N. Kishi, K. Yoza, M. Akita, M. Yoshizawa.. *Chem. Eur. J.*, **2012**; 18, 8358-8365.
2. "White Phosphorus is Air-Stable within a Self-Assembled Tetrahedral Capsule" P. Mal, B. Breiner, K. Rissanen, J. R. Nitschke, *Science*, **2009**, 324, 1697-1698.
3. "Selectivity in an Encapsulated Cycloaddition Reaction" J. Chen, J. Rebek Jr., *Org. Lett.*, **2002**, 3, 327-329.
4. "Self-Assembled Molecular Capsule Catalyzes a Diels–Alder Reaction" J. Kang, J. Santamaria, G. Hilmersson, J. Rebek Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 7389-7390.
5. "Acid Catalysis in Basic Solution: A Supramolecular Host Promotes Orthoformate Hydrolysis" M. D. Pluth, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *Science*, **2007**, 316, 85-88.
6. "Diels-Alder in Aqueous Molecular Hosts: Unusual Regioselectivity and Efficient Catalysis" M. Yoshizawa, M. Tamura, M. Fujita, *Science*, **2006**, 312, 251-254.
7. "Controlling Photoreactions with Restricted Spaces and Weak Intermolecular Forces: Exquisite Selectivity during Oxidation of Olefins by Singlet Oxygen" A. Natarajan, L. S. Kaanumalle, S. Jockusch, C. L. D. Gibb, B. C. Gibb, N. J. Turro, V. Ramamurthy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 4132-4133.
8. "Constrictive Binding of Large Guests by a Hemicarcerand Containing Four Portals" M. L. C. Quan, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 2754-2755.
9. "Connection of Metallamacrocycles via Dynamic Covalent Chemistry: A Versatile Method for the Synthesis of Molecular Cages" A. Granzhan, C. Schouwey, T. Riis-Johannessen, R. Scopelliti, K. Severin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 7106-7115.
10. "Large Self-Assembled Chiral Organic Cages: Synthesis, Structure, and Shape Persistence" K. E. Jelfs, X. Wu, M. Schmidtman, J. T. A. Jones, J. E. Warren, D. J. Adams, A. I. Cooper, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 10653-10656.

11. "Exo-Functionalized Shape-Persistent [2+3] Cage Compounds: Influence of Molecular Rigidity on Formation and Permanent Porosity" M. W. Schneider, I. M. Oppel, M. Mastalerz, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 4156-4160.
12. "Molecular Marriage through Partner Preferences in Covalent Cage Formation and Cage-to-Cage Transformation" K. Acharyya, S. Mukherjee, P. S. Mukherjee, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 554-557.
13. "A Highly C₇₀ Selective Shape-Persistent Rectangular Prism Constructed through One-Step Alkyne Metathesis" C. Zhang, Q. Wang, H. Long, W. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 20995-21001.
14. "Amine-Triggered Molecular Capsules using Dynamic Boronate Esterification" K. Kataoka, S. Okuyama, T. Minami, T. D. James, Y. Kubo, *Chem. Commun.*, **2009**, *13*, 1682-1684.
15. "Self-Assembly of a Cavitand-Based Capsule by Dynamic Boronic Ester Formation" N. Nishimura, K. Kobayashi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 6255-6258.
16. "A Permanent Mesoporous Organic Cage with an Exceptionally High Surface Area" G. Zhang, O. Presly, F. White, I. M. Oppel, M. Mastalerz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 1516-1520.
17. "Self-Assembly of Ten Molecules into Nanometre-Sized Organic Host Frameworks" M. Fujita, D. Oguro, M. Miyazawa, H. Oka, K. Yamaguchi, K. Ogura, *Nature*, **1995**, *378*, 469-471.
18. "Design, Formation and Properties of Tetrahedral M₄L₄ and M₄L₆ Supramolecular Clusters" D. L. Caulder, C. Brückner, R. E. Powers, S. König, T. N. Parac, J. A. Leary, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 8923-8938.
19. "Pairwise Selection of Guests in a Cylindrical Molecular Capsule of Nanometre Dimensions" T. Heinz, D. M. Rudkevich, J. Rebek, Jr., *Nature*, **1998**, *394*, 764-766.
20. "A Chiral Spherical Molecular Assembly held together by 60 Hydrogen Bonds" L. R. MacGillivray, J. L. Atwood, *Nature*, **1997**, *389*, 469-472.
21. "Self-Assembly of 2,8,14,20-Tetraisobutyl-5,11,17,23-tetrahydroxyresorc[4]arene" T. Gerkenmeier, W. Iwanek, C. Agena, R. Fröhlich, S. Kotila, C. Näther, J. Mattay, *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, *9*, 2257-2262.
22. "Well-Defined, Organic Nanoenvironments in Water: The Hydrophobic Effect Drives a Capsular Assembly" C. L. D. Gibb, B. C. Gibb, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 11408-11409.
23. "A Self-Assembled Chiral Capsule with Polar Interior" B. Kuberski, A. Szumna, *Chem. Commun.*, **2009**, 1959-1961.
24. "Water Co-Encapsulation in an Inverted Molecular Capsule" A. Szumna, *Chem. Commun.*, **2009**, 4191-4193.
25. "Chiral Encapsulation by Directional Interactions" A. Szumna, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 12381-12388.

26. "Selective Derivatisation of Resorcarenes. Part 5. Acylation of Tetrabenzoxazine Derivatives" C. Schmidt, E. F. Paulus, V. Böhmer, W. Vogt, *New J. Chem.*, **2000**, 24, 123-125.
27. "Giant Regular Polyhedra from Calixarene Carboxylates and Uranyl" S. Pasquale, S. Sattin, E. C. Escudero-Adan, M. Martinez-Belmonte, J. de Mendoza, *Nat. Commun.*, **2012**, 3, 785.
28. "Cyclochiral Conformers of Resorcin[4]arenes Stabilized by Hydrogen Bonds" A. Szumna, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 1358.
29. "Crystal Structure Change for the Thermochromy of N-Salicylideneanilines. The First Observation by X-ray Diffraction" K. Ogawa, Y. Kasahara, Y. Ohtani, J. Harada, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 7107-7108.
30. "Highly Stable Keto-Enamine Salicylideneanilines" J. H. Chong, M. Sauer, B. O. Patrick, M. J. MacLachlan, *Org. Lett.*, **2003**, 5, 3823-3826.
31. "The ¹⁵N and ¹³C Solid State NMR Study of Intramolecular Hydrogen Bond in some Schiff's Bases" B. Kamiński, W. Schilf, T. Dziembowska, Z. Rozwadowski, A. Szady-Chełmieniecka, *Solid State NMR*, **2000**, 16, 285-289.
32. "Influence of Bond Fixation in Benzo-Annulated N-Salicylideneanilines and Their *ortho*-C(=O)X Derivatives (X = CH₃, NH₂, OCH₃) on Tautomeric Equilibria in Solution" R. Gawinecki, A. Kuczek, E. Kolehmainen, B. Osmiałowski, T. M. Krygowski, R. Kauppinen, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 5598-5607.
33. "Evolution of Dynamic Combinatorial Chemistry" F. B. L. Cougnon, J. K. M. Sanders, *Acc. Chem. Res.*, **2012**, 45, 12, 2211-2221.
34. "Dynamic Combinatorial Libraries of Pseudo-Peptide Hydrazone Macrocycles" G. R. L. Cousins, S. A. Poulsen, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.*, **1999**, 1575-1576.

PRZEDRUKI PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

Chiral Calixarenes

M Wierzbicki, H Jędrzejewska, and A Szumna, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction	1
Attachment of a Chiral Auxiliary/ies to a Calixarene Scaffold	1
Amino Acid Derivatives and Peptides	2
Carbohydrates	6
Amines and Derivatives	9
Axially Chiral Groups	11
Modifications of the Bridges	11
Inherently Chiral Calixarenes	11
Asymmetric or Dissymmetric Substitution Pattern at Different Phenolic Rings	14
Differentiation of the Edges of Aromatic Rings	15
Directional Bridging of the Rings	17
Formation of Chiral Metal Complexes of Calixarenes	18
Formation of Chiral Structures in a Non-Covalent Way	18
Conclusions and Outlook	21
References	22

Introduction

From the beginning of calixarene chemistry, researchers were fascinated by the unique properties of calix bowls that give rise to interesting host–guest interactions. For many years, recognition properties of calixarenes were the predominant area of research in this field. The main driving force for the development of chiral calixarenes was the possibility of using them as enantioselective synthetic receptors. A good way to obtain a molecular receptor consists of mimicking the structural features of biological systems by surrounding a guest molecule with a well-organized binding site. In this regard, calixarenes (meta-substituted cyclophanes) having a well-defined, modifiable hydrophobic cavity appear to be ideal platforms for the elaboration of artificial receptors. Effective chiral receptors based on calixarenes have found applications in recognition of chiral guests in solution, as chromatography stationary phases,^{1,2} enantioselective membrane carriers,^{3,4} and as catalysts.⁵ Chiral calixarenes can also contribute to a better understanding of biological systems since chiral recognition is an integral element in the regulation of life functions. With the development of strategies for efficient synthesis and selective modification of calixarenes, calixarenes have also started to be perceived as convenient chiral building blocks for the construction of more elaborate systems, not necessarily exploiting their host–guest properties. Their potential has also been demonstrated in interactions with biological molecules,^{6,7} including protein recognition,^{8,9} formation of gels,¹⁰ and antimicrobial activity.¹¹

Nowadays, there are many known chiral calixarenes. Due to their diverse conformational features, introduction of chirality is not limited only to classical chirality based on carbon stereogenic centers. Chiral calixarenes (including resorcinarenes and homocalixarenes) and chiral structures based on calixarenes have been obtained by using various strategies:

1. Attachment of a chiral auxiliary/ies to a calixarene scaffold.
2. Asymmetric/dissymmetric substitution pattern at the calixarene scaffold (inherent chirality).
3. Formation of chiral metal complexes of calixarenes.
4. Formation of chiral structures in a non-covalent way.

Attachment of a Chiral Auxiliary/ies to a Calixarene Scaffold

This is the first, the most straightforward and still the most popular way to construct chiral calixarenes. The earliest example of chiral calixarene was reported by Gutsche in 1979 involving the monosubstitution of *p*-*t*Bu-calix[8]arene with camphorosulfonyl group.¹² Nowadays, due to the vast development of synthetic strategies for selective modifications of calixarenes, attachment of virtually any chiral moiety at the selected position is synthetically feasible. The most popular chiral groups that were attached to calixarenes involve:

- amino acid derivatives and peptides,
- carbohydrates,
- chiral amines,
- axially chiral groups, and
- modifications of the bridges.

Amino Acid Derivatives and Peptides

Amino acids and peptides are by far the most popular chiral modifiers for the functionalization of calixarenes. The utilization of amino acids and peptides has many advantages: they are natural and versatile sources of chirality and their derivatives are easily available. Additionally, amino acids are rich sources of non-covalent interactions (both in their backbones and side chains) that can assist in the recognition processes. Therefore, it is no wonder that there are many examples of amino acid and peptide substituted calixarenes and resorcinarenes. On the other hand, such hosts have also proven to be the most difficult to design. The disadvantage of using amino acid derivatives is their conformational flexibility and tendency to form self-complementary non-covalent interactions. Such interactions, when formed intramolecularly, engage potential binding sites precluding effective guest complexation. If the amino acid groups are not engaged in intramolecular interaction they can still be involved in intermolecular interactions. It often causes aggregation that considerably reduces solubility. However, aggregation is not always an undesirable process. When properly designed, it leads to the formation of well-defined molecular capsules that exhibit interesting encapsulation properties.

Many peptide and amino acid substituted calixarenes were synthesized and used for chiral recognition in the group of Ungaro (for review see Casnati et al.¹³). The direct connection of an amino acid or a peptide to a calixarene scaffold at the upper rim requires the presence of an acid or an amino functionality in calixarene. In the group of Ungaro, di- or tetracarboxylic acids have been used to connect peptides through the N-terminus (Figure 1).¹⁴ The disubstituted products (hydrazides of receptors 1 and 2) exhibited moderate binding properties toward short peptides lauric acid and its derivatives, and ammonium salts (receptor 4a). To connect peptides using the C-terminus, di- and tetraminocalixarenes were applied (Figure 2).¹⁵ As opposed to the derivatives substituted at the N-terminus, the C-peptidocalixarenes display a pronounced tendency to aggregate and form intramolecular hydrogen bonds. It has a profound effect on recognition properties. For example, for the interaction of host 8a with carboxylate anions a higher K_a was observed in DMSO (more polar solvent) than in $CDCl_3$ (less polar solvent) albeit both are very low. It was attributed to the formation of intramolecular hydrogen bonds in a less polar solvent ($CDCl_3$) that induced a closed conformation

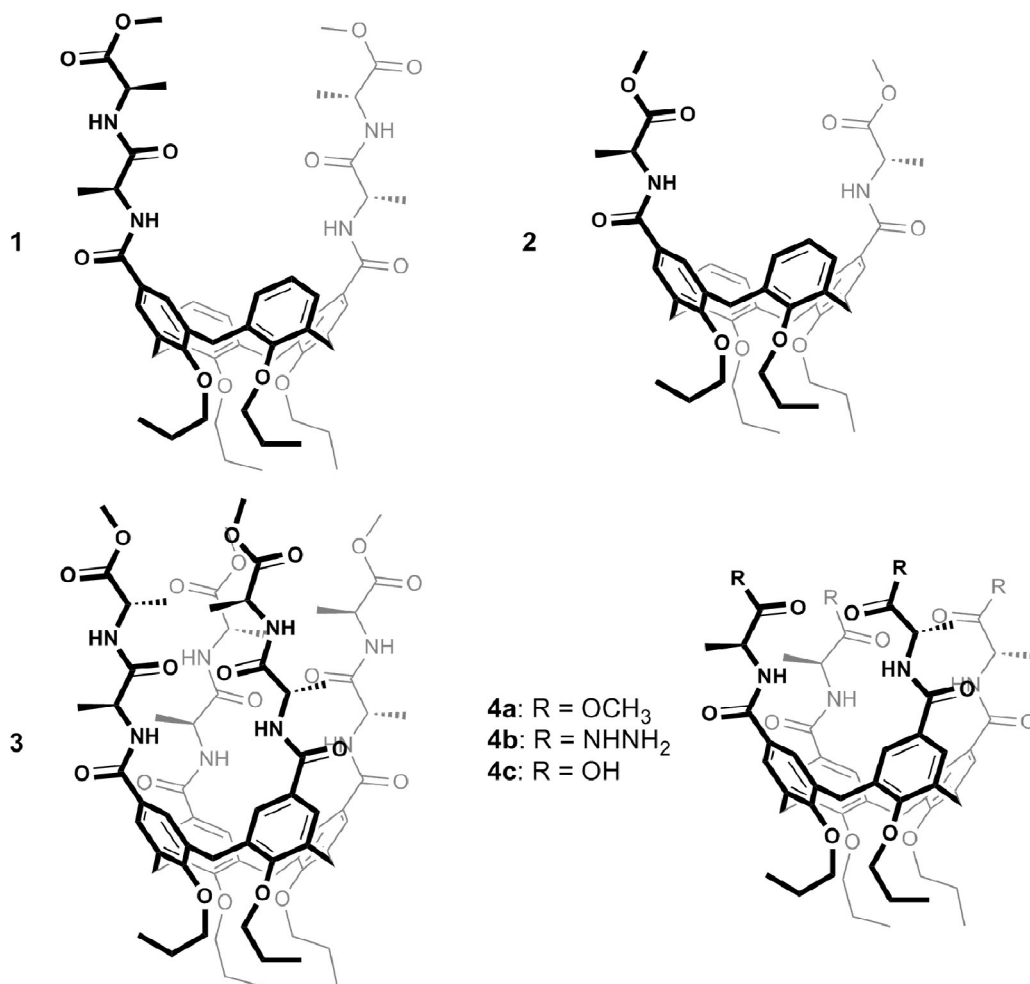
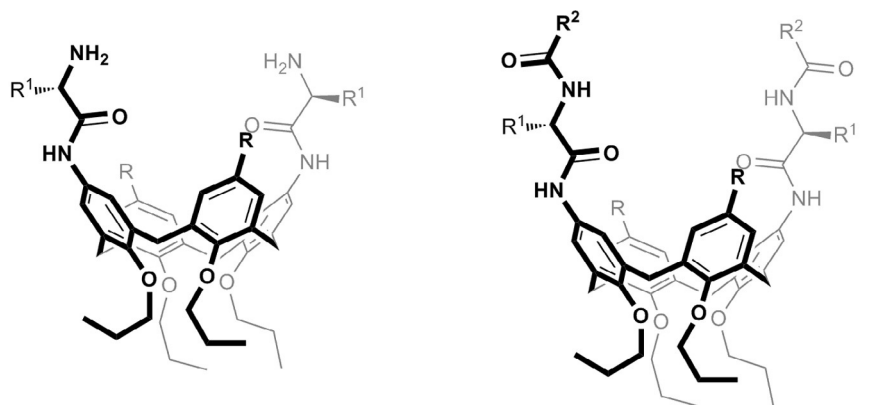


Figure 1 Examples of peptidocalixarenes – peptides connected through the N-terminus at the upper rim.



5a: $R^1 = \text{CH}_3$, $R = \text{NHCOCH}(\text{CH}_3)\text{NH}_2$

5b: $R^1 = \text{Bn}$, $R = \text{NHCOCH}(\text{Bn})\text{NH}_2$

8a: $R^1 = \text{CH}_3$, $R = \text{H}$

8b: $R^1 = \text{Bn}$, $R = \text{H}$

6a: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{CH}_3$

$R = \text{NHCOCH}(\text{CH}_3)\text{NHCOCH}_3$

6b: $R^1 = \text{Bn}$, $R^2 = \text{CH}_3$

$R = \text{NHCOCH}(\text{Bn})\text{NHCOCH}_3$

7a: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{Ph}$,

$R = \text{NHCOCH}(\text{CH}_3)\text{NHCOPh}$

7b: $R^1 = \text{Bn}$, $R^2 = \text{Ph}$

$R = \text{NHCOCH}(\text{Bn})\text{NHCOPh}$

9a: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R = \text{H}$

9b: $R^1 = \text{Bn}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R = \text{H}$

Figure 2 Examples of peptidocalixarenes – peptides connected through the C-terminus at the upper rim.

with engaged binding sites that consequently hampered guest complexation. This example illustrates the disadvantages of using peptides as chiral modifiers for construction of calixarene hosts due to their high tendency to participate in self-complementary interactions.

Interestingly, the aggregation properties can be rationally used for construction of dimeric assemblies. Calix[4]arenes with two different peptides mounted on the same scaffold using respectively N-terminus and C-terminus, **10–19**, are able to form hydrogen-bonded dimeric capsules owing to complementarity between the interacting peptide chains (**Figure 3**).¹⁶ In some cases (**15–17**), an antiparallel β -sheet structure enhances the stability of the capsule (**Figure 3(b)**), $K_{\text{dim}} = 70\text{--}950 \text{ M}^{-1}$ in CDCl_3 .

Peptidocalix[4]arenes substituted at the lower rim do not take advantage of the unique inclusion properties of the calixarene hydrophobic cavity and therefore binding sites are limited to those introduced with substituents. Attachment of peptides at the lower rim requires using a linker that connects a phenolic group with a peptide group. Most linkers are flexible aliphatic chains that introduce high conformational mobility. As a consequence, it is more difficult to avoid adverse intramolecular non-covalent interactions. In fact, all derivatives (**20**, **21**) exhibit intramolecular hydrogen bonding (**Figure 4**).¹⁷ Therefore, **20** and **21** display only weak complexing properties toward anions of *N*-acetylated amino acids. The K_a values were higher in acetone (more polar solvent) than in CDCl_3 (less polar solvent). Again it was explained by breaking of the intramolecular hydrogen bonding system in acetone. Even though the complexing properties were not high, the host was able to recognize enantiomers of selected *N*-acetylated amino acids (max. $K_a(\text{D})/K_a(\text{L}) = 4.1$ for **21b**).

Resorcin[4]arenes, the resorcinol analogs of calix[4]arenes (also called calix[4]resorcinols), were also modified with amino acids or peptides by

- O-substitution (at the upper rim),
- attachment at the central ortho position (at the upper rim), and
- modification of the lower rim (in the case of resorcinarenes lower rim modifications are introduced at the bridges).

Resorcinarenes O-substituted with amino acid amides were used as a chiral stationary phase (CSP) in capillary gas chromatography.¹⁸ By exhaustive O-alkylation using *N*-bromoacetyl-L-valine-*tert*-butyl-amide and subsequent chemical bonding to a poly(hydro)dimethylsiloxane, a new CSP was obtained (Chirasil Calix).

Different applications of peptido-resorcinarenes were envisioned by Sherman and coworkers. They used resorcin[4]arenes as rigid organic scaffolds to organize peptide helical bundles and β -sheets (**Figure 5**). The researchers aimed at synthesizing a new family of *de novo* proteins called *caviteins* (from the combination of cavitand + protein)¹⁹ via modifications at the central ortho positions with a sulfur-containing linker. A family of caviteins containing peptides of various lengths (from a single up to 16 amino

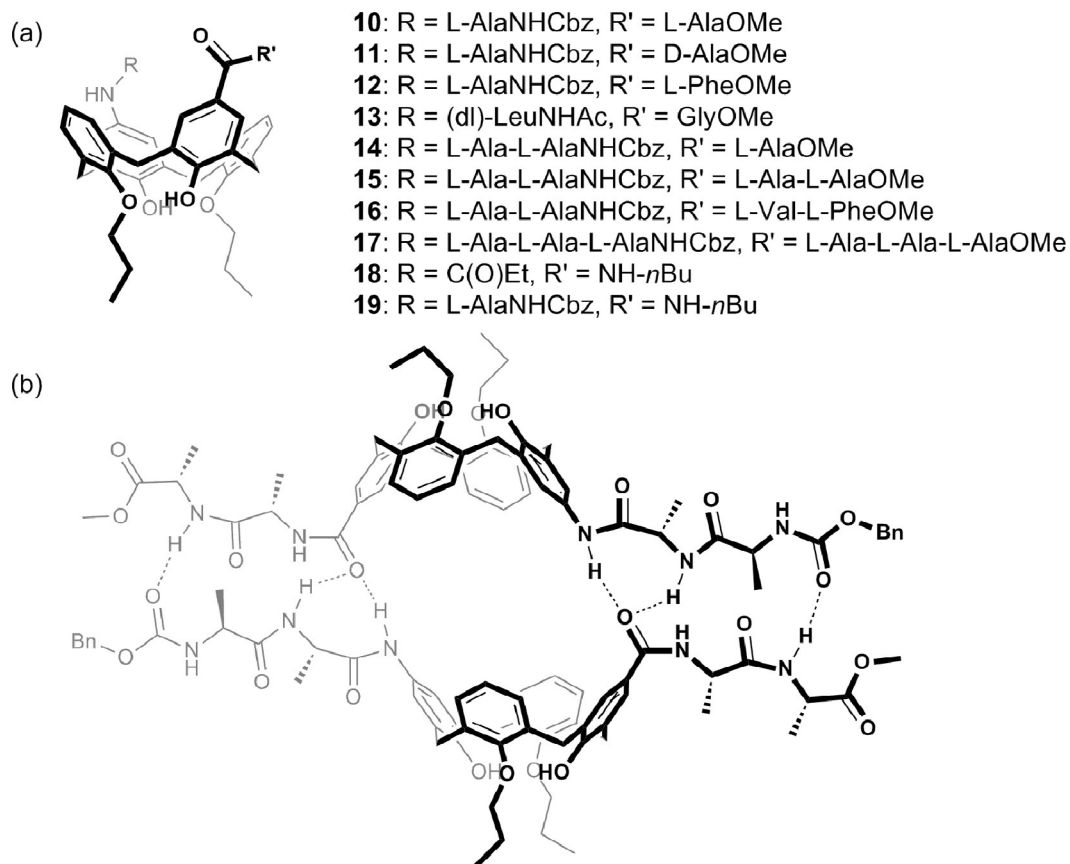


Figure 3 Examples of peptidocalixarenes – (a) peptides connected through peptides' N-terminus and C-terminus at the upper rim and (b) the suggested structure of a dimeric assembly for peptidocalixarene **15**.

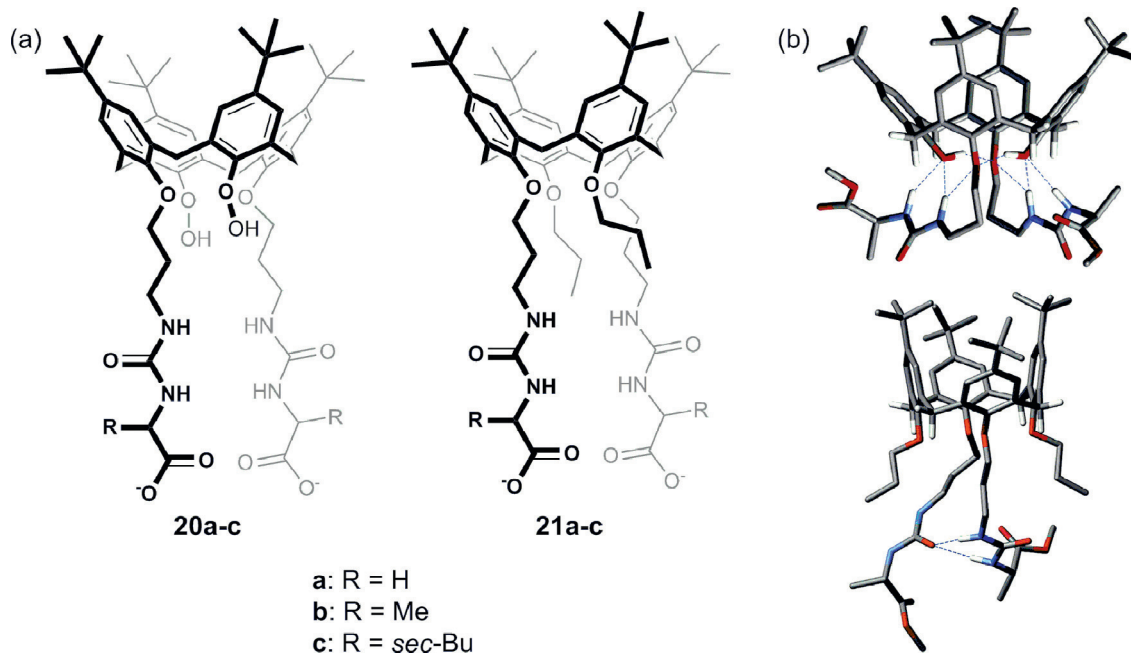


Figure 4 Peptidocalixarenes – (a) peptides connected at the lower rim and (b) their lowest energy conformations for **21b** and **20b**. Reprinted from Yakovenko, A. V.; Boyko, V. I.; Kalchenko, V. I.; Baldini, L.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3223–3231, with permission. Copyright 2009 American Chemical Society.

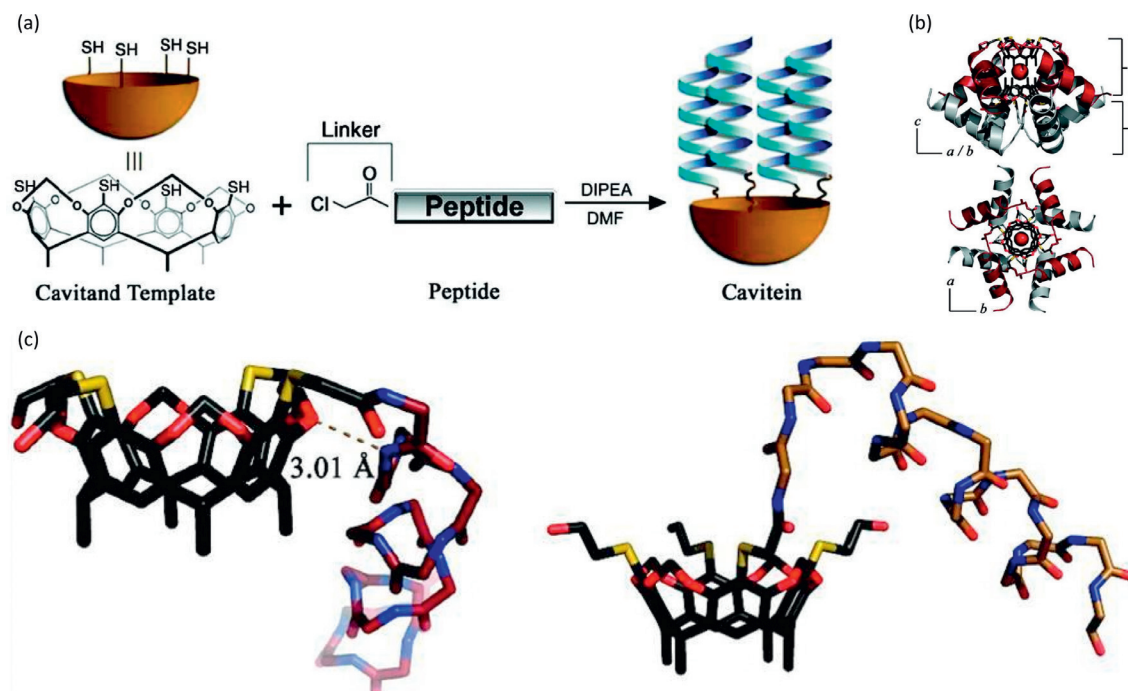


Figure 5 (a) Design of cavitein – helical bundles of proteins above the cavitand; (b) top view of the x-ray structure of cavitein with helices containing 16 amino acid residues; (c) side view showing position of a helix in respect to the cavitand (the remaining three of the helices were removed for clarity). Reprinted from Freeman, J. O.; Lee, W. C.; Murphy, M. E. P.; Sherman, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7421–7429, with permission. Copyright 2009 American Chemical Society.

acid residues) was studied. An X-ray structure of a cavitein containing 16 amino acid residues at each arm shows the peptides wrapping downward around the cavitand bowl (Figure 5(b)).²⁰ This is in contrary to the expectation that the peptides would bundle above the template as depicted in Figure 5(a).

The ortho position of resorcin[4]arene can also be modified using an aminomethyl linker. The strategy was realized in two different ways resulting in an amino acid connected either at the C- or N-terminus. Attachment through the N-terminus was achieved using the Mannich reaction. Hydrophobic amino acids connected using the Mannich reaction to the resorcin[4]arene scaffold (e.g., alanine or phenylalanine) form a self-complementary system of ionic hydrogen bonds.²¹ Therefore, the product dimerizes quantitatively in the reaction mixture and is isolated as capsules (*1-22a*)₂ (Figure 6). The capsules have two unique features: they are chiral and have polar interiors, which makes them very efficient in chiral recognition of small polar molecules.^{22,23} For example, they are able to extract and encapsulate highly hydrophilic tartaric acid molecules from water into the organic phase. The product of the Mannich reaction between proline and resorcinarene, on the contrary to other amino acids derivatives, does not form capsular dimers due to the lack of complementary hydrogen binding system (proline is a secondary amine). However, proline cavitands²⁴ and variously substituted hydroxyproline cavitands²⁵ were used to obtain water soluble resorcin[4]arenes, for example 23, that are able to resolve NMR signals of chiral substrates with pyridyl, phenyl, and bicyclic aromatic rings.

Connection of an amino acid or a peptide through the C-terminus using an aminomethyl linker requires the synthesis of aminomethylated cavitand 24 as a precursor (Figure 7). Then, various amino acids or peptides were connected using classical peptide chemistry.²⁶ Such derivatives proved to be promising for the encapsulation of small guest molecules. Derivatives 25g–l form kinetically stable (on the NMR timescale) complexes with an acetonitrile molecule. This indicates that the dipeptide cavitands are somehow closed at the upper part that restricts guest's release. The authors suggest a hydrogen-bonded extended cavity structure that is strongly supported by nuclear overhauser effect (NOE) experiment and molecular modeling (Figure 8).

Resorcinarenes functionalized at their lower rims by amino acid derivatives were studied for their enantioselective guest binding in solution²⁷ and in the gas phase (Figure 9).^{28,29} Octamethyl resorcin[4]arene tetrafunctionalized at the lower rim with valyl-leucine and leucyl-valine methyl esters (26 and 27, respectively) is capable of recognizing some dipeptides as guests, both in solution and in the gas phase. Association constants of 2030 and 186 M⁻¹ (CDCl₃) were found for the interaction of *L,L*-26 with *L,L*-28 and *D,D*-28 respectively, indicating a substantial chiral recognition (one order of magnitude).

A unique example of a chiral amino acid calix[4]arene is aminophosphonic acid derivative 29 (Figure 10). Its synthesis using Pudovik-type addition was reported recently by the group of Kalchenko.³⁰ The synthesis of 29 is a very rare example that utilizes diastereoselective pathways to achieve chiral calixarenes. In most cases, chiral groups are simply attached to the macrocyclic ring. Here, the stereogenic centers were introduced on an imine-calixarene scaffold using a chiral auxiliary strategy.

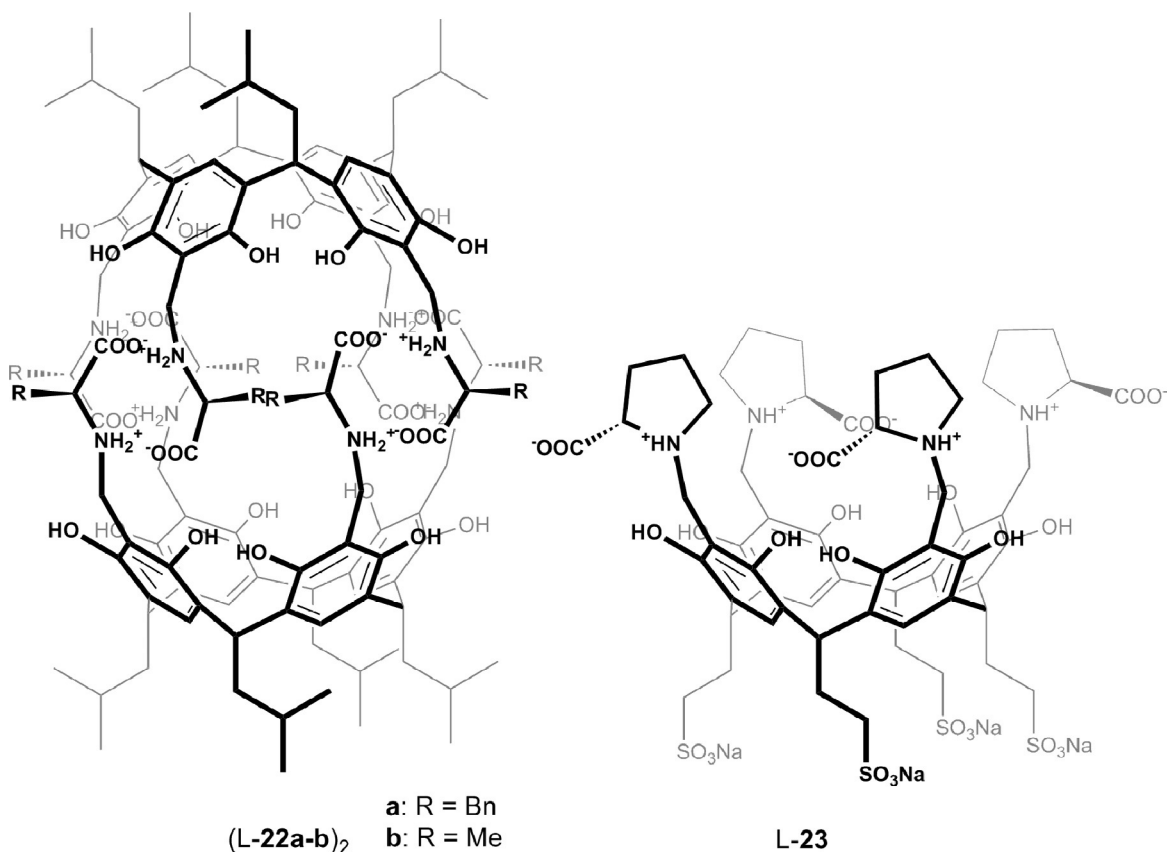


Figure 6 Resorcinarenes with attached amino acids groups.

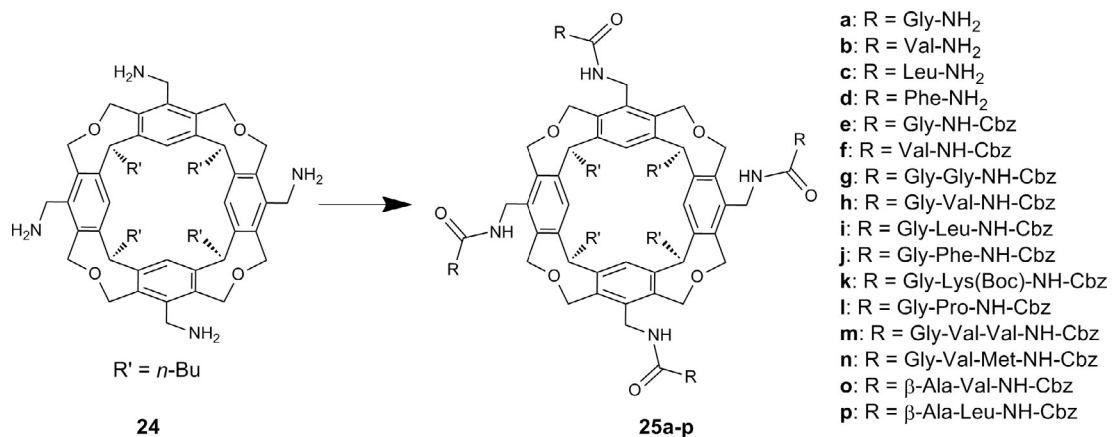


Figure 7 Resorcinarenes with peptide and amino acid groups connected via the C-terminus at the upper rim.

Carbohydrates

Carbohydrates are natural sources of chirality and also offer rich non-covalent interactions. In biological systems the molecular recognition involving carbohydrates mediates a variety of processes, including recruitment of leucocytes to inflammatory sites, clearance of glycoproteins from the circulatory system, cell interactions in the immune system, as well as adhesion of bacteria or viruses to host cells. It has been shown that multivalency is especially important for carbohydrate–receptor interactions. The glycoside cluster effect, a special case of multivalency involving carbohydrates, is a powerful tool exploited by nature to make relatively weak interactions stronger and more specific. Currently, it is well established that multivalency characterizes many important biological processes based on lectin–oligosaccharide interactions.

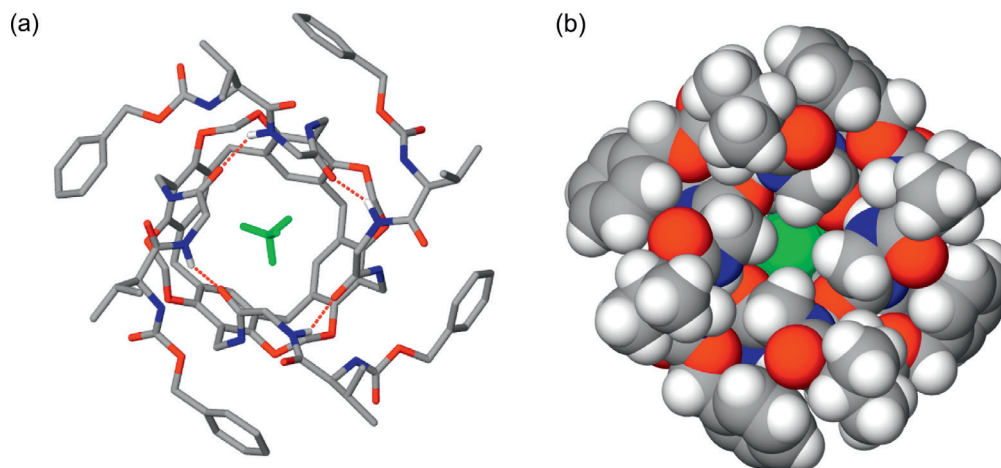


Figure 8 Suggested molecular structure of cavitant **25h** with complexed acetonitrile molecule based on NOE and molecular modeling. Courtesy of M. Feigel.

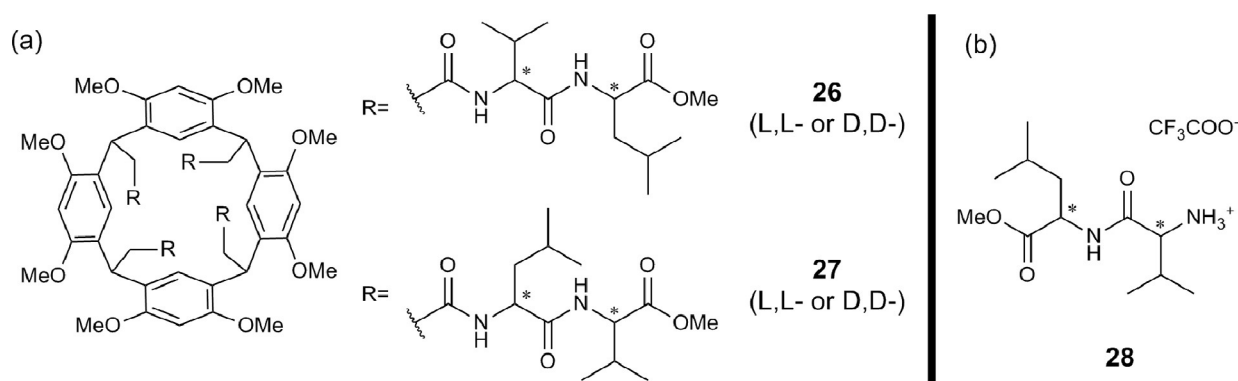


Figure 9 (a) Resorcinarene receptors modified at the lower rim and (b) the structure of the guest dipeptide.

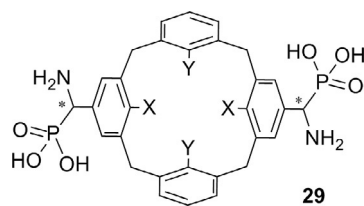


Figure 10 Chiral aminophosphonic acid derivative of calix[4]arene.

Calixarenes, as multiple-site macrocycles, are ideal scaffolds for the construction of multivalent glycosylated ligands. The class of calixarenes bearing at least one carbohydrate unit appended to their structure have been named as glycolixarenes. Currently there are many examples of glycolixarenes starting from relatively simple calixarenes and resorcinarenes modified by mono- or polysaccharides at the upper or lower rim (Figure 11) up to dendrimer-type of structures (Figure 12; for review see refs.^{31,32}). Although glycolixarenes are intrinsically chiral, they have rarely been studied for typical chiral recognition. A vast majority of them was tested for interactions with biological targets which, as a rule, also involve chiral interactions. Most of the biological properties reported for glycolixarenes are related to their binding abilities to lectins (carbohydrate-binding proteins). As was sought, in many cases affinity of glycolixarenes for lectin is significantly increased compared to the monovalent saccharides used as models. Selective interactions with specific lectins, for example, *Pseudomonas aeruginosa* Lectin A with **30** may lead to inhibition of infectious bacterium cell growth.³³ In combination with protein binding, glycolixarenes can carry out other tasks, potentially useful in medicine, mainly drug delivery (Figure 13). Examples include the saccharide-selective delivery of fluorescent calcein to liver cells by **36a**,³⁴ bisphosphonates delivery by **32c** (relevant in osteoporosis and Paget's disease),³⁵ or anticancer vaccine candidate.³⁶ The multivalency of glycolixarenes can be further increased by their tendency to aggregate due to the simultaneous presence of hydrophilic saccharide units close to the highly hydrophobic calixarene scaffold. When properly loaded with cargo

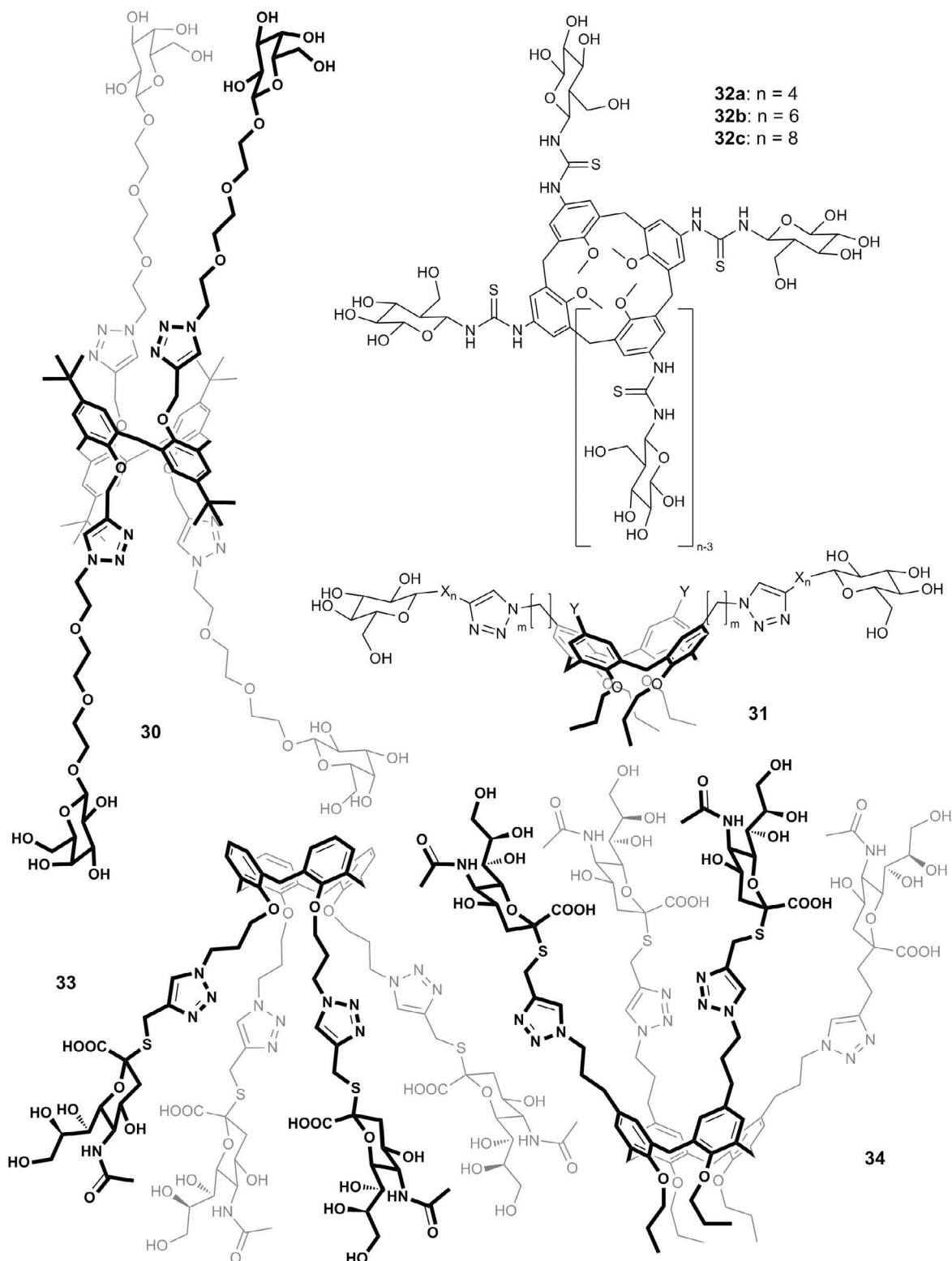


Figure 11 Examples of various glyco-calixarenes.

these aggregates can be exploited as site-specific drug delivery systems, because they are able to interact with lectins³⁷ or for targeted gene delivery since they can form clusters around the plasmid DNA (glycosorcinarenes **36b**, **Figure 14**).³⁸

There are only few examples of selective recognition studies of small-molecule guests using glyco-calixarenes. An open-chain form of glyco-calixarene **37** was studied for complexation of sugar derivatives: 1-*O*-octyl- α -D-glucopyranoside (**38a**, $K_a = 650 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$),

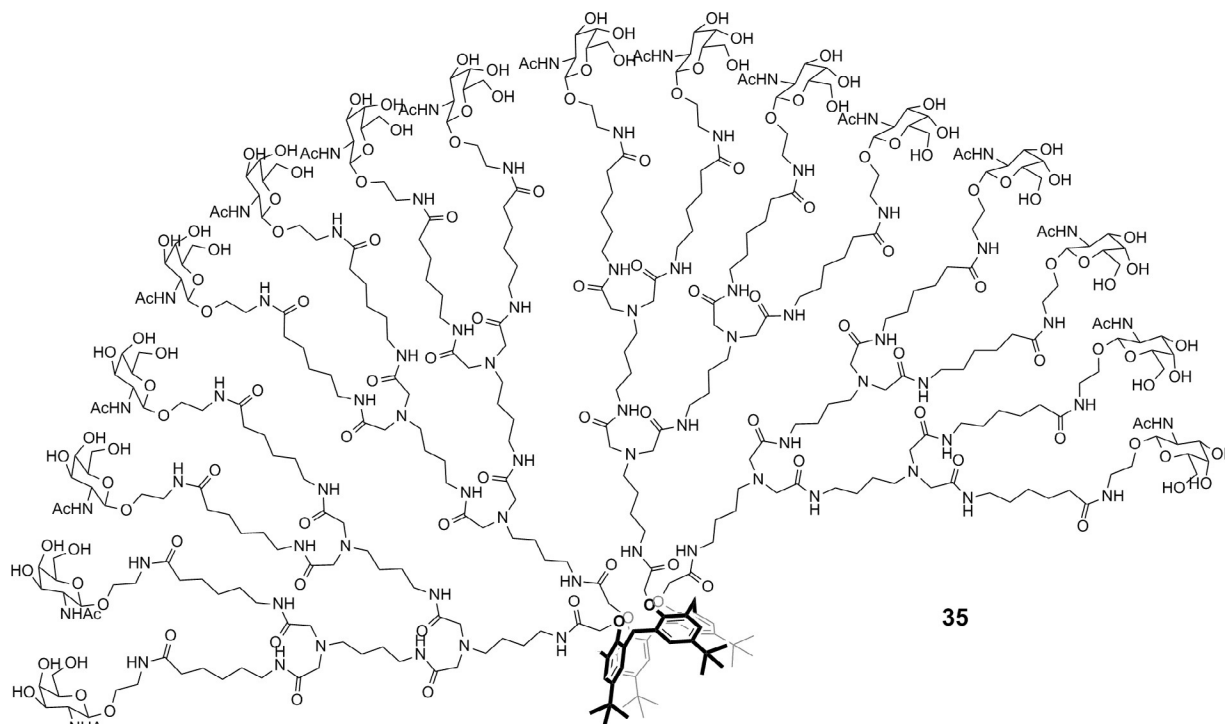


Figure 12 Dendrimer-type glycolcalixarene.

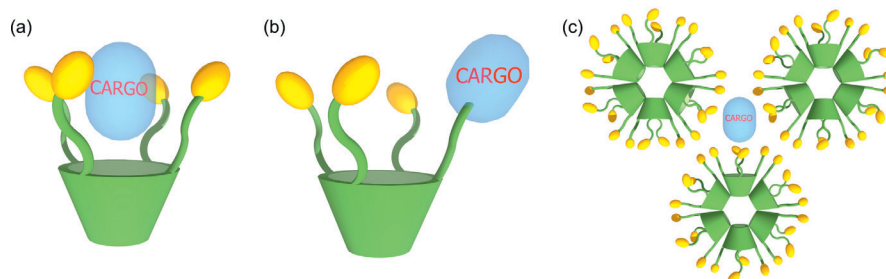


Figure 13 Strategies for drug delivery using glycolcalixarene vectors: (a) noncovalent encapsulation in the cavity; (b) covalent attachment; and (c) noncovalent encapsulation in a self-assembled cluster.

1-*O*-octyl- β -D-glucopyranoside (**38b**, $K_a = 1050 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$), and 1-*S*-octyl- β -D-thioglucopyranoside (**38c**, $K_a = 1000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$) in CDCl_3 (Figure 15).³⁹ The complexation constants toward *O*- or *S*- β -glycosides were almost identical thus reflecting the high similarity of both structures. The configuration on C1 was not particularly important for the complexation as proved by the quite similar complexation constant for the α -anomeric structure.

Amines and Derivatives

Chiral amines have many applications as ligands in asymmetric synthesis, as valuable substances for resolving racemic compounds, and as drug candidates. Among chiral amines, there are many natural products, for example, those originating from the alkaloid family. Due to their widespread application the number of various amine derivatives is large and their chemistry is quite well known.

Chiral amines and their derivatives (mostly amides) are often used as calixarene modifiers with the main destination of the products as resolving agents for acidic species (Figure 16). For example, calixarenes **39a** and **39b**, bearing optically pure amino alcohol groups at their lower rims, exhibit efficient chiral recognition ability toward α -hydroxyacids ($K_a(S)/K_a(R)$) up to 28 for **39a**.⁴⁰ Even higher values for chiral recognition of mandelic acid were obtained for a similar calixarene bridged at the lower rim with chiral amino alcohol ($K_a(S)/K_a(R) = 102$).⁴¹ Another chiral amine modified calixarene, cinchona alkaloid derivative **40**, was used as a chiral phase-transfer catalyst in alkylation of glycine derivatives with benzyl bromide with moderate efficiency (up to 57% ee).⁴²

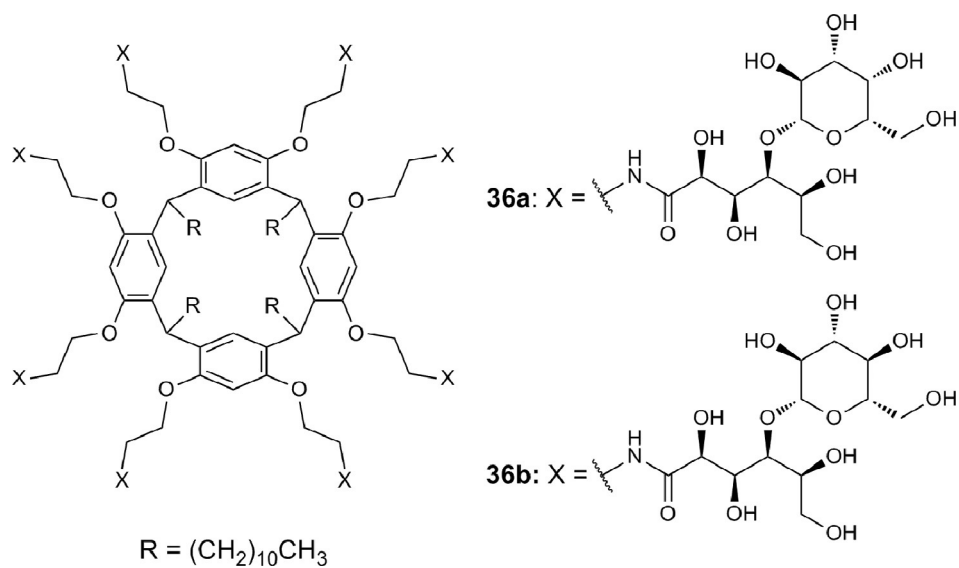


Figure 14 An example of glycoresorcinarene used for targeted gene delivery.

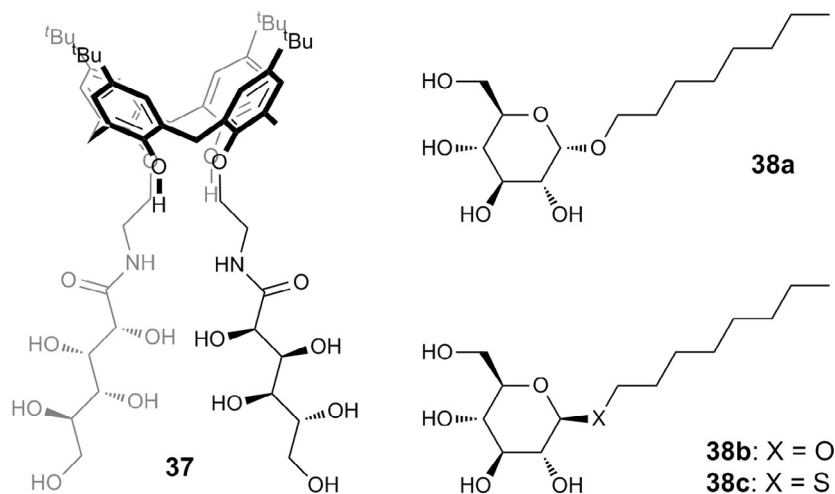


Figure 15 Structure of the receptor **37** and guest molecules.

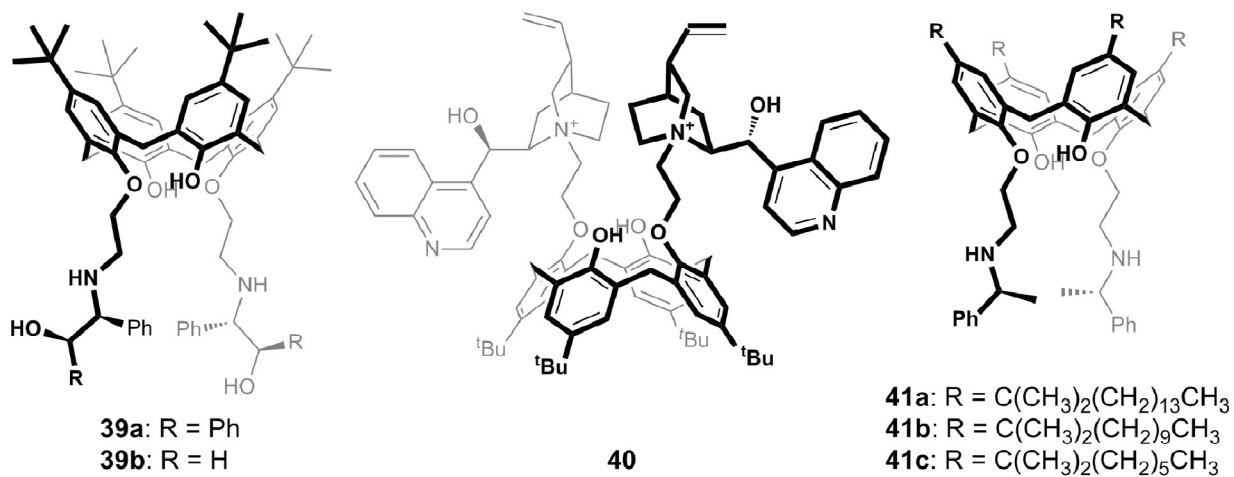


Figure 16 Examples of calixarenes modified with chiral amines.

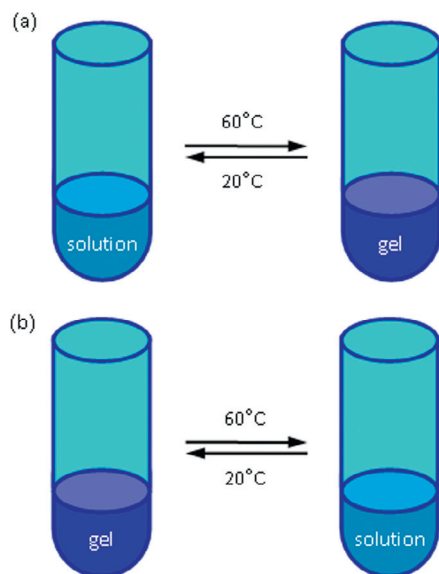


Figure 17 Formation of heat-set gels for salts of **41a** with: L-tartaric acid (a) and D-tartaric acid (b).

Chiral interactions between amine and acid components can be transformed into macroscopic properties that lead to interesting material properties, for example, chirality-dependent formation of heat-set gels.¹⁰ Lower rim substituted chiral amine **41a** was equipped with long alkyl group and treated with L- or D-tartaric acid. Upon interaction with L- or D-tartaric acid the chiral amine can self-assemble into nanofibers (macroscopic gel formation). However, the fibrous assemblies of **41a-D**-tartaric acid are less stable due to the unmatched interaction between the chiral centers. To minimize unfavorable interactions they form nanovesicles. The macroscopic result of this phenomenon was the difference in the sol-gel behavior of the two diastereomeric salts (Figure 17). **41a-L**-tartaric acid salt was a gel at 20 °C (293 K) while **41a-D**-tartaric acid salt was a clear solution at the same temperature. Upon heating to 60 °C (323 K) **41a-L**-tartaric acid became a liquid while **41a-D**-tartaric acid became a gel. This unusual heat-set behavior of **41a-D**-tartaric acid system was explained by lowering unfavorable interactions as the temperature increases that allowed for formation of the nanofibers.

Substitution of higher calix[*n*]arenes ($n > 4$) at their lower rims may lead to the formation of complexes that can simultaneously use the introduced binding sites and the cavity for complexation. For example, calix[6]arenes were bridged at their lower rims with chiral cyclic and acyclic amine linkages (Figure 18).⁴³ Complexation of small neutral guest molecules inside the cavity was confirmed by NMR. Complexation of chiral guests leads to the formation of diastereomeric endo-complexes at 2:1 ratio for (±)-4-methylimidazolidin-2-one and 6:4 ratio for (±)-propane-1,2-diol.⁴⁴

Axially Chiral Groups

Many axially chiral compounds are 'privileged chiral ligands.' This means that it is highly probable that their application will lead to high enantioselectivity and/or activity of the resulting chiral catalysts. It is no wonder that many efforts have been made in order to attach axially chiral substituents to the calixarene scaffold (Figure 19). Chiral binaphthol (BINOL) groups were attached either to upper or lower rims.^{45,46} Most of the obtained derivatives were further transformed into their metal complexes and tested as asymmetric catalysts (see metal complexes part). However, receptor **47** was used for recognition of *N*-Boc-L- or D-glutamate.⁴⁷ The fluorescent receptor exhibits good enantioselective recognition for the enantiomers of *N*-Boc-glutamate ($K_a(L)/K_a(D) = 4.65$).

Modifications of the Bridges

Substitution of the bridges of calixarenes is least popular among modifications that lead to chiral structures due to synthetic difficulties. In most cases, the methylene bridges of calixarenes are considered chemically inert. However, in some cases the modifications can be introduced prior to the cyclization step, as in **48** (Figure 20).^{48,49} Another possibility involves using thiacalixarenes. Oxidation of the adjacent sulfide functional groups in an *anti* relationship leads to inherently chiral structure **49**.⁵⁰ It should be noted that the chirality in this case originates from stereogenic centers at the sulfur atoms.

Inherently Chiral Calixarenes

The unique feature of calixarenes is their concave structure that clearly distinguishes the faces of the object. If the concave structure cannot invert, the asymmetric/dissymmetric substitution pattern leads to the formation of chiral structures (Figure 21). This type of

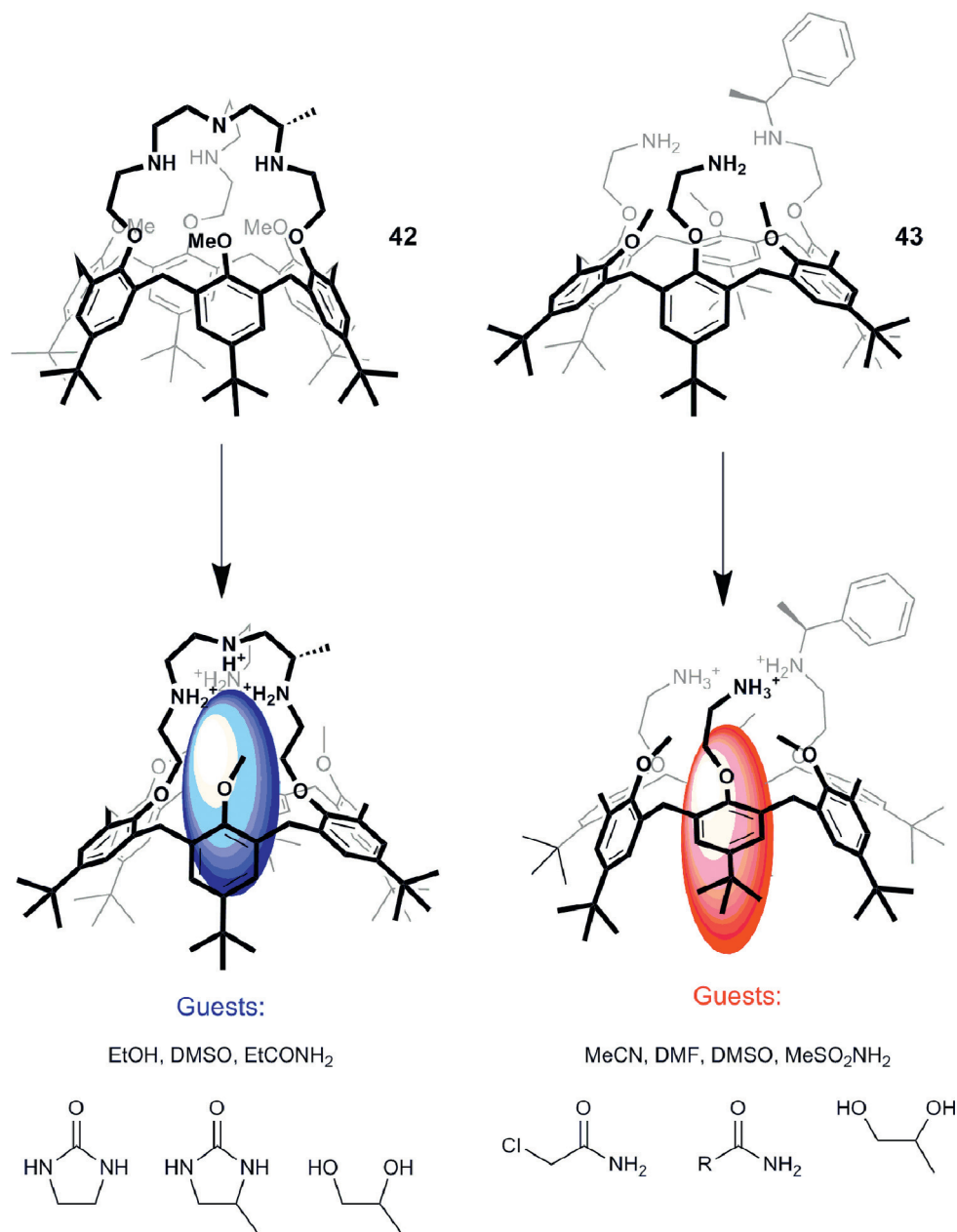


Figure 18 Calix[6]arenes modified with chiral amines.

chirality is known as an inherent chirality. Calix[4]arenes were the first scaffolds for which the term ‘inherent chirality’ was applied.⁵¹ Although during the next decades many other molecular platforms have been applied for the construction of inherently chiral structures,⁵² calixarenes still dominate the field – for review see refs.^{52–57}

The first, general definition of inherent chirality was formulated in 2004 by the group of Mandolini and Schiaffino⁵⁸ and later slightly modified by Szumna et al.⁵² to be consistent with stereochemical formalism. The definition reads: ‘inherent chirality arises from the introduction of a curvature in an ideal planar structure that is devoid of perpendicular symmetry planes in its bidimensional representation.’⁵² Therefore, the resulting 3D molecules have C_n symmetry. The stereochemical nomenclature of inherently chiral compounds is not always consistent, since the priority rules and reference points cannot be set consistently for all types of compounds. Whenever possible, the accepted description of the inherent chirality involves application of (*P*)/(*M*) notation (Figure 22). Conventionally, for calix[*n*]arenes, the bridging carbons are labeled as a, b, c, and d by taking into account the priority of the two neighboring aromatic substituents according to Cahn–Ingold–Prelog rules. Next, the observer is situated on the concave side of the surface and a clockwise priority of the sequence of groups is defined to have *P* chirality while counterclockwise priority is defined as *M* chirality (Figure 22a). In the case of resorcinarenes the sequence of the groups that are attached to the phenolic groups is determined (Figure 22(b)). For the priority determination of hydrogen-bonded assemblies, the hydrogen bond

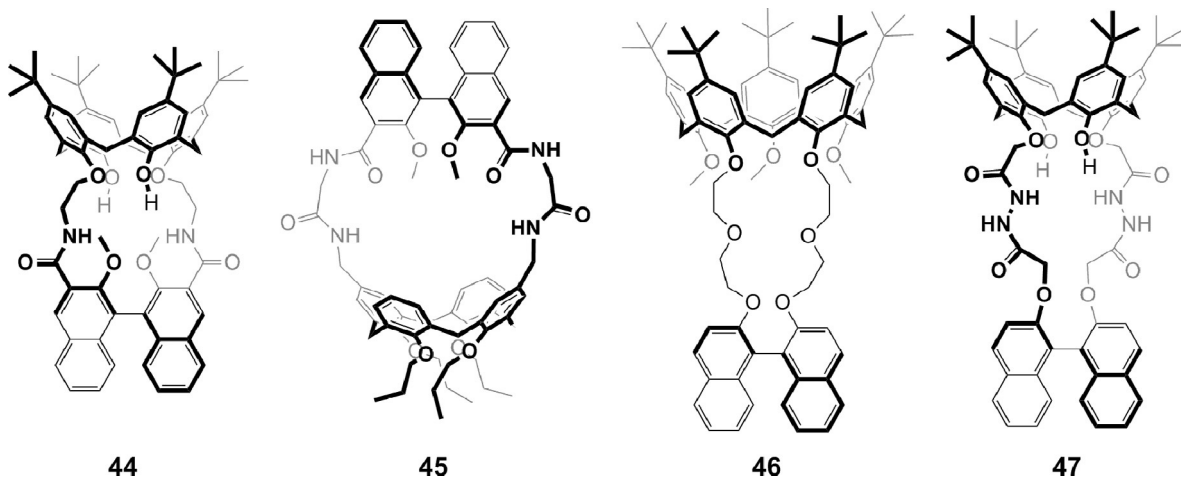


Figure 19 Examples of calixarenes with axially chiral groups.

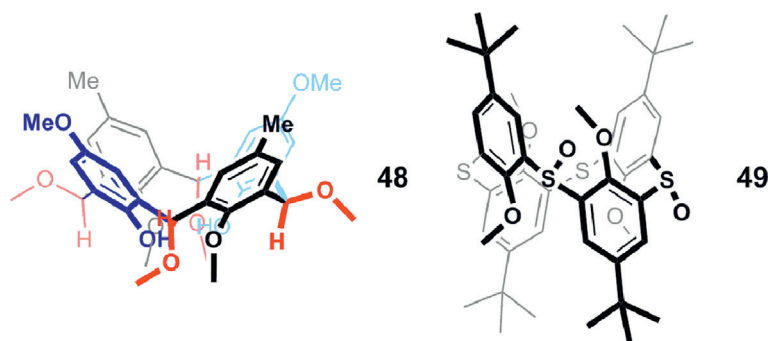


Figure 20 Examples of chiral calixarenes by modifications of the bridges.

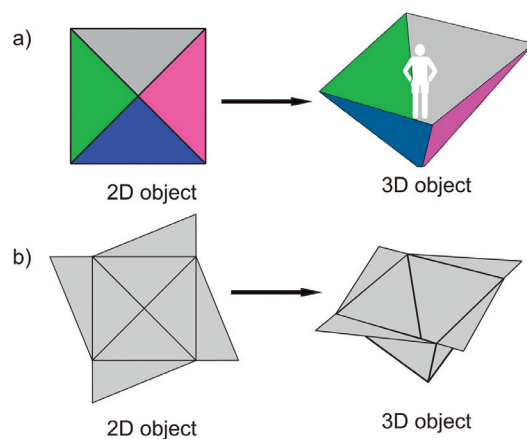


Figure 21 Inherent chirality upon transformation from 2D to 3D space: (a) for an object devoid of symmetry and (b) for an object with fourfold axis perpendicular to the 2D plane. Permission from The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the RSC.

is treated as a regular bond (Figure 22(c)). It should be noted that this system is not always applicable to all currently known inherently chiral compounds and in many cases the best stereochemical representation is only a 3D figure.

Calix[4]arene with four OH groups in the lower rim undergoes through annulus inversion and therefore cannot be inherently chiral. The substitution of OH groups with an alkyl chain of at least n -Pr sized blocks the inversion and the resulting macrocoring can be fixed in one of the four conformations (cone, partial cone, 1,2-alternate, and 1,3-alternate). Each of these conformations can produce inherently chiral structures with proper substitution. Inherent chirality is observed for compounds containing at least three different substituents, that is, ABCC or ABCD patterns. From the synthetic point of view, access to inherently chiral calixarenes is usually not as straightforward as that of calixarenes with stereogenic centers. This is due to problems with regioselectivity, control over conformation, and optical resolution (inherent chirality cannot be introduced in a stereospecific way).

Inherent chirality can be introduced to calixarenes by subunit differentiation (asymmetric or dissymmetric) using

1. substitution pattern at different phenolic rings (positioned either at the lower or upper rim or a combination of both),
2. differentiation of the edges of aromatic rings, and
3. directional bridging of the rings.

Asymmetric or Dissymmetric Substitution Pattern at Different Phenolic Rings

The synthetically simplest route to obtain inherently chiral calixarenes is to introduce two different substituents at the neighboring hydroxyl groups at the lower rim in order to create an ABCC pattern. Such a modification can be made using the basic calixarene skeleton. For example, in the group of Kalchenko an ABCC pattern was obtained by 1,2-regioselective proximal substitution to obtain inherently chiral 53 that after resolution of diastereoisomers was transformed into enantiomers of 54 (Figure 23).⁵⁹

Modification with crown ether bridges gains a lot of attention due to possible applications in complexation of chiral ammonium ions by means of $N^+ - H \cdots O$ hydrogen bonding. In the group of Pappalardo derivative 55, with a crown[6] type

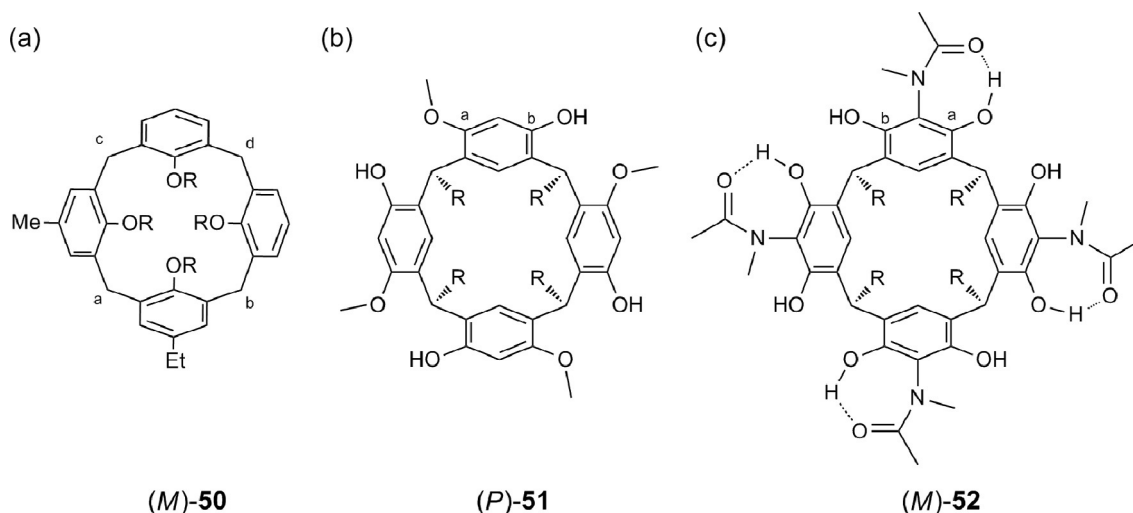


Figure 22 Stereochemical notation for inherently chiral calixarenes.

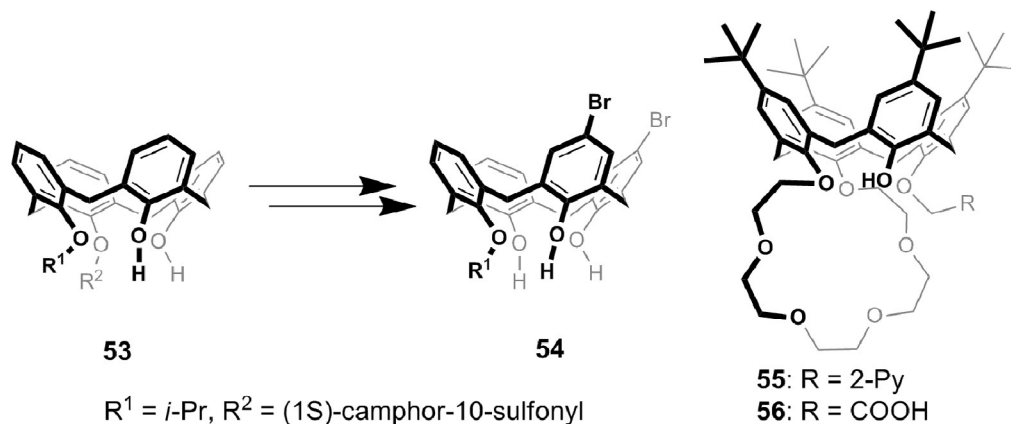


Figure 23 Inherent chirality introduced by lower rim substitution.

ring at the lower rim was used for recognition of (*R*)- and (*S*)-1-phenyl-ethylammonium picrates.⁶⁰ Although doubling of the signals occurred suggesting that a diastereomeric complex was formed, no chiral discrimination was observed in this case. A similar design was used in the group of Chen and Huang to obtain a series of inherently chiral acid derivatives, for example 56.⁶¹

It should be noted that the differentiation of substituents can also be introduced by their different spatial positions.⁶² If the substituents are identical but have different fixed spatial positions they are considered non-equivalent. Such a differentiation is possible for all but cone conformations of calixarene. A proximally di-*O*-alkylated calixarene with two identical substituents, for example 58, can be chiral provided that the substituents have an *anti* relationship, that is, the skeleton is locked in a partial cone conformation (Figure 24).⁶³ The presence of a crown ether bridge and an additional acid group, as in 57 (partial cone conformation) assures formation of diastereomeric salts with leucinol with considerably different association constants for enantiomers ($K_a = 50 \text{ M}^{-1}$ and 143 M^{-1} in CD_2Cl_2 , de 48%).^{61,64} The interaction pattern employs electrostatic interactions and hydrogen bonding between the ether oxygen atoms on the host and amino/ammonium groups of the guest.

Modification of upper rims of calixarenes in order to introduce inherent chirality requires more synthetic steps. However, the effort can pay off since such derivatives can take full advantage of the calixarene bowl. This approach was used by the groups of Shimizu to obtain amino phenol 59, amino acid 60, and amino alcohol 61 presenting inherent chirality based on upper rim functionalization (Figure 25). Amino phenol 59 is able to recognize enantiomers of mandelic acid through the formation of diastereomeric salts (de 37.5%)⁶⁵ Calix[4]arene 59 was also used as a catalyst in asymmetric Michael additions of thiophenols and cyclohexenones.⁶⁶ Yields of the reactions were high but the enantiomeric excesses were low (ee up to 16%). Introduction of an additional aromatic ring at the upper rim of calix[4]arene (in consequence, formation of the macrocycle of ABCD type) resulted in higher enantioselectivity (ee up to 31% for the same Michael addition).⁶⁷

In general, inversion of the macrocyclic ring through a rotation of subunits causes racemization of inherently chiral structures. However, if the rotation is only partial, the resulting structures may retain their chirality. The ingenious example of that type is inherently chiral di-*O*-alkylated homooxalix[3]arene 62a exhibiting a pseudo- C_2 symmetry (Figure 26).⁶⁸ Although the unsubstituted aromatic ring (but not the remaining two rings!) can pass through the macrocyclic ring, the molecule retains its chirality since the resulting structure is identical (Figure 26b). The enantiomers of 62a were separated using chiral high-performance liquid chromatography (HPLC) and the resulting hosts gave an impressive de of 72% for complexation of amino acid esters (as picrate salts).

Differentiation of the Edges of Aromatic Rings

Differentiation of the edges of a phenolic ring also introduces directionality to the calixarene structure and results in inherent chirality. Differentiation of only one ring is sufficient to give an inherently chiral structure. Such an approach can potentially give products with more compact chiral binding sites since they are positioned close to the cavity. However, from the synthetic point of view this approach is toilsome mainly due to regioselectivity problems. Therefore, the number of examples is limited. In the group of Chen and Huang various inherently chiral derivatives were obtained based on *meta*-substitution involving calix[4]quinolone

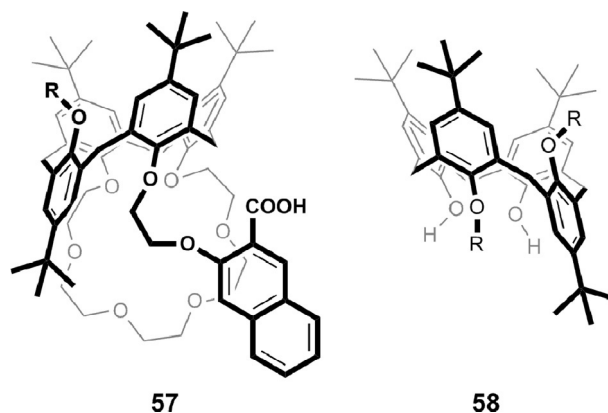


Figure 24 Differentiation by spacial alignment.

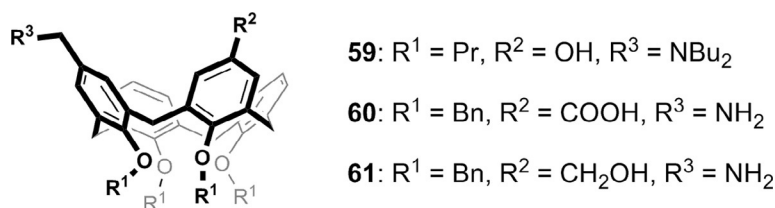


Figure 25 Inherent chirality introduced by upper rim substitution.

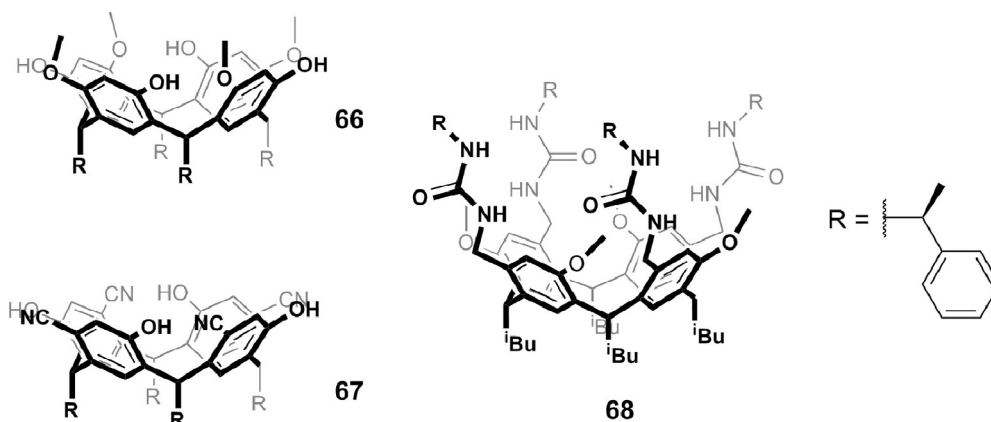


Figure 28 Inherent chirality of resorcin[4]arene by edge substitution.

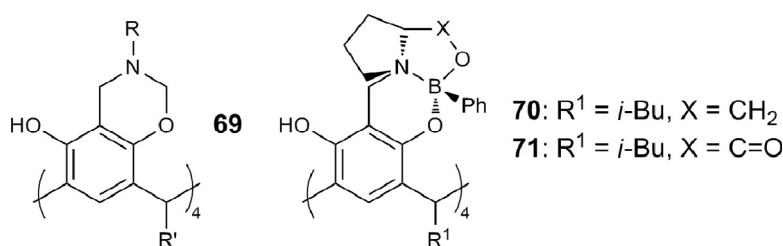


Figure 29 Inherent chirality of resorcin[4]arene by edge substitution using ring closing reactions.

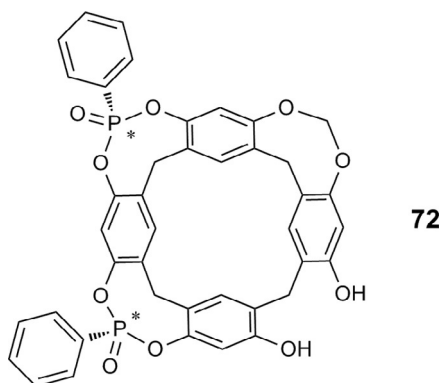


Figure 30 An inherently chiral phosphonatocavitand.

Inherently chiral resorcin[4]arenes of C_1 symmetry were also obtained by differentiation of hydroxyl groups using a phosphonate bridges by the group of Dutasta.⁸⁶ Phosphonatocavitands of ABCC type, for example 72, were tested toward complexation of various chiral neurotransmitters. The enantiopure 72 showed considerable diastereoselectivity (dr up to 2.5:1 for pseudoephedrine) and complete chemoselectivity (toward ephedrine).

Directional Bridging of the Rings

Another approach for differentiation of substituents at the lower rim involves directional bridging. The bridge can be placed at any position, however, in practice; the most convenient location is the lower rim oxygen atoms (Figure 30). For example, such directional linkages composed of carboxamide⁸⁷ or ester⁸⁸ moieties were introduced by a cyclization reaction to give calixarene 73 (Figure 31). The product has a C_2 symmetry and is inherently chiral.

Inherently chiral calixarenes are most commonly formed using a tetrameric scaffold (calix[4]arene). However, a few examples were reported for calixarenes with a higher number of subunits, for example calix[5],⁸⁹ calix[6],⁹⁰ and calix[8]arenes⁹¹ mainly by modification with polyether linkages at their lower rims. However, no applications have been reported.

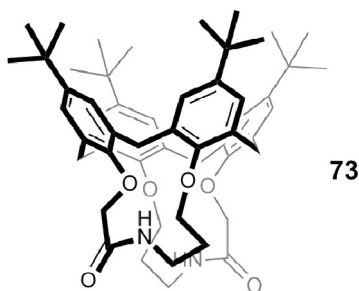


Figure 31 Inherently chiral calixarene formed by directional bridging.

Formation of Chiral Metal Complexes of Calixarenes

Combination of benefits coming from rich host–guest chemistry of calixarenes, metal binding sites and chirality (either classical or inherent) can lead to construction of multifunctional catalysts.

Chirality of calixarene metal complexes potentially comes from

- chirality of attached substituents,
- inherent chirality, and
- chirality at metal centers (together with chiral arrangement of the building blocks, see the supramolecular chirality part).

Most of the chiral metal complexes of calixarenes that were synthesized were supposed to work as supramolecular catalysts (Figure 32). Therefore they often contain catalytic motifs that are known to be effective, for example, salen or BINOL derivatives. For example, chiral, bimetallic cobalt–salen–calixarene hybrid structure 74 was prepared and tested in the hydrolytic kinetic resolution of racemic epoxides.⁹² Kinetic studies revealed that the two catalytic units on the upper rim are able to activate the reactants in a cooperative and primarily intramolecular mode. Higher stability was found for the bimetallic catalyst as compared to a monometallic reference complex and high enantioselectivity for kinetic resolution of epoxides was observed. However, the real benefit from applying a calixarene scaffold is difficult to assess since the monomeric catalyst was already similarly effective in the reaction under consideration. Another salen–calixarene 75 having combined chirality coming from stereogenic centers and inherent chirality of a *meta*-substituted ring and monometallic Mn=O active site, was applied in an epoxidation reaction of model alkenes and showed moderate ee values (up to 72%).⁹³

BINOL rhodium complexes of calixarenes were tested as catalysts in asymmetric hydrogenation reactions. Diphosphite 76 exhibited high enantiomeric excess for prochiral olefins, (ee up to 94%)⁹⁴ while diphosphite 77 gave up to 98% ee for hydrogenation of methyl acetamidoacrylate.⁹⁵

A rare example of recognition studies for chiral metal complexes was reported for calix[5]arenes 46 (Figure 19).⁴⁶ The complexation properties of copper(II) complex of 46 toward carbohydrates were explored. Fluorescent titration experiments showed that they selectively recognized D-(+)-gluconic acid δ -lactone with the association constant $K_a(R) = 4.45 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $K_a(S) = 1.81 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectively (MeCN–H₂O 4:1 v/v, pH 7.4).

Formation of Chiral Structures in a Non-Covalent Way

Chiral arrangement can also be achieved using directional non-covalent interactions, for example, hydrogen bonding groups mounted on a non-planar skeleton. Hydrogen bond networks are kinetically less stable and separation of enantiomers is, in most cases, not possible. However, the introduction of additional chiral auxiliaries can induce substantial diastereomeric excess of one of the inherently chiral conformers. Since the system of many hydrogen bonds contributes significantly to the overall stability of the system, induced inherent chirality can substantially modulate properties of the molecules. Therefore, one can envision that inherent chirality can greatly support (or hamper) efficiency and selectivity in chiral recognition.

The first example of inherently chiral hydrogen-bonded compound was reported by the group of Rebek. They created deep cavitands with ‘doors’ at the upper rim that were controlled by a unidirectional cooperative belt of hydrogen bonds, formed by either amide (78, Figure 33)⁹⁶ or hydroxyl groups.⁹⁷ The ‘doors’ can close clockwise or counterclockwise and in the presence of additional chirality centers one of the directions is preferred (de 50%).⁹³ The chiral vessels exhibit preferential binding of enantiomers of various small molecules, for example, *trans*-cyclohexanediol (60% de).⁹⁴

Other resorcin[4]arenes with inherently chiral conformations were reported by Schmidt et al.⁹⁸ and the group of Szumna (Figure 34).^{99,100} Amide substituted resorcin[4]arenes like 79 exist in inherently chiral kite conformations that are stabilized by an unidirectional system of eight hydrogen bonds (in solid state and in solution). This dynamic system of hydrogen bonding undergoes inversion characterized by a relatively high-energy barrier (14.6–18.5 kcal mol⁻¹) consistent with simultaneous rupture of all eight hydrogen bonds. This is quite a surprising result, considering that the hydrogen bond system is not strictly cooperative. However, rotation of just one unit creates an unfavorable pattern of the adjacent hydrogen bonds, which is, responsible for

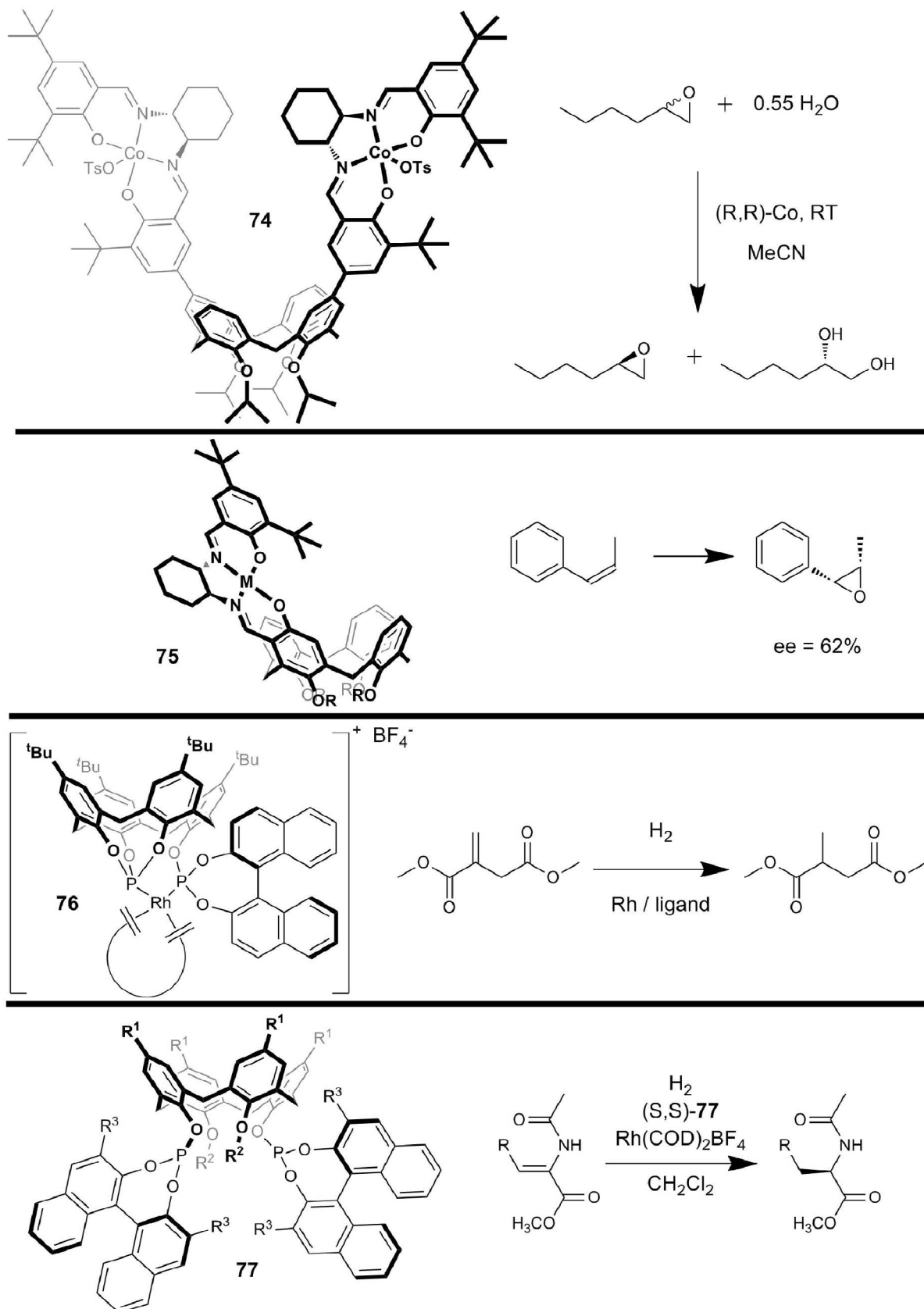


Figure 32 Examples of chiral metal complexes of calixarenes and their applications as catalysts.

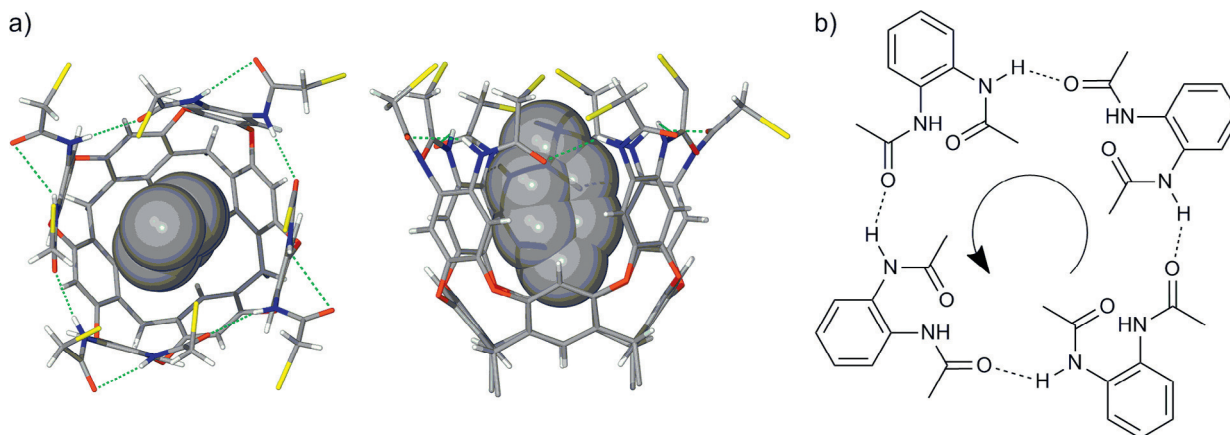


Figure 33 Cavitant **78** with inherently chiral system of hydrogen bonds: (a) X-ray structure and (b) schematic view of the H-bond array.

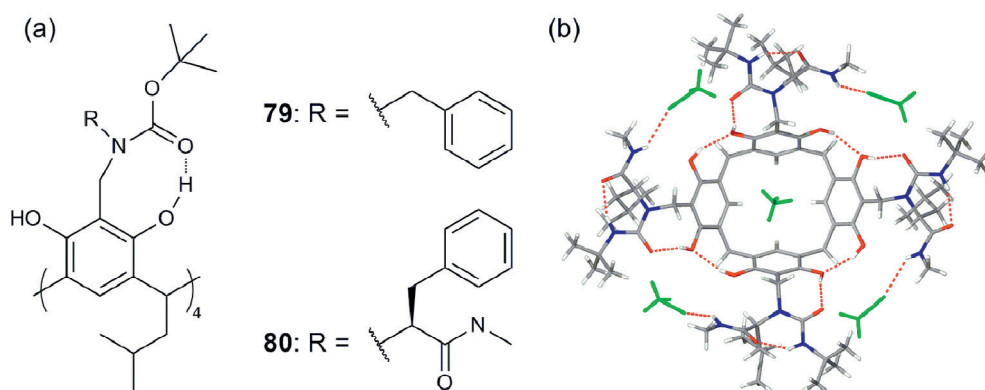


Figure 34 Cavitands with inherently chiral system of hydrogen bonds (a) molecular structures; (b) X-ray structure of **79** (MeCN molecules – green).

apparent cooperativity. An even more stable pattern was obtained for resorcinarenes substituted with amino acid derivatives (e.g., **80**). In this case, inherently chiral conformations were stabilized by a total of 12 hydrogen bonds. The presence of additional stereogenic centers causes formation of two diastereomeric inherently chiral conformations *M* and *P* in unequal amounts (de in the range of 72–95%).

The higher molecular level of non-covalent chirality involves supramolecular chirality. Supramolecular chirality consists of dissymmetric arrangement of molecules in a non-covalent multi-molecular assembly. The chiral or achiral components associate in such a way so that the assembly has no symmetry planes or inversion centers.¹⁰¹

Calixarene-based systems with supramolecular chirality emerged relatively late compared with chiral species constructed at the molecular level (for reviews see refs.^{98,102,103}). In the group of D. N. Reinhoudt, calixarene scaffolds were disubstituted with melamine derivatives to give **81** (Figure 35). Upon addition of barbituric or cyanuric acid calixarene **81** assembles into [3+6] rosette-type structures. The D_3 -symmetric conformer adopts an antiparallel arrangement of melamine fragments which renders the assembly chiral even without any additional stereogenic center.

The chiral rosettes are unique examples of non-covalent assemblies that are kinetically stable enough to be isolated as single enantiomers. Moreover, the synthesis of a given enantiomer can be performed in a stereospecific way. To achieve this, first, the selective formation of a given (*P*) or (*M*) assembly was achieved by the introduction of stereogenic centers either at the calix[4]arene dimelamine or barbituric/cyanuric acid derivative. Diastereomeric excess in both the cases was high (de 96%).¹⁰⁴ Subsequent exchange of the chiral barbiturate for an achiral cyanurate gave an enantiopure assembly with an ee of 96%. The resulting structure was still optically active, although none of its components were chiral. Diastereoselective synthesis was also induced in a non-covalent way. Additional complexation of chiral acids or diacids by a racemic mixture of amino-substituted double rosette assemblies gave supramolecular chiral assemblies in which the de is ~90%.^{105,106} The removal of the diacids led also to the formation of enantiopure assemblies.

Chiral memory effect, which is inextricably connected with kinetic stability of the rosettes, was also observed in this case. Interestingly, when racemic mixtures of calix[4]arene dimelamine were used the resulting rosettes were homochiral (no mixed-chirality rosettes were detected), meaning, that assembly leads to an effective chiral self-sorting.

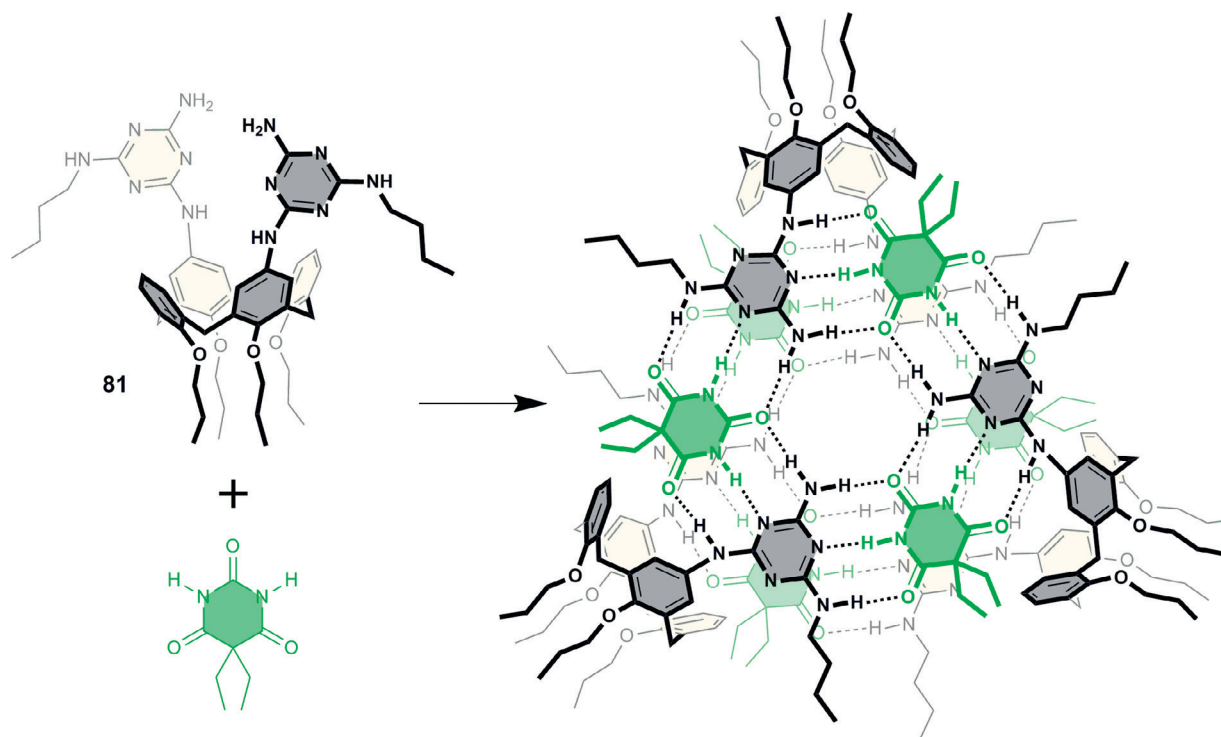


Figure 35 Rosette structure formed of **81** and barbituric acid.

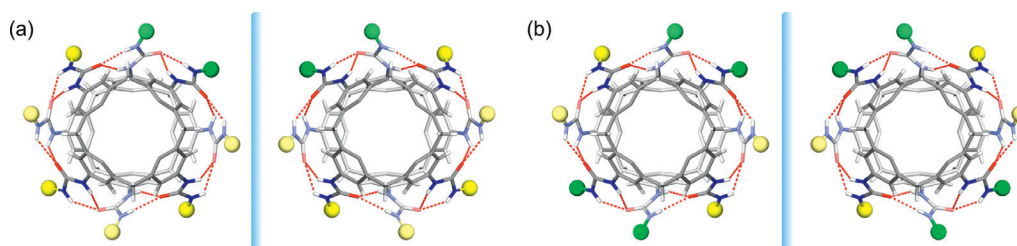


Figure 36 Supramolecular chirality by dimerization of achiral monomers of (a) ABBB type and (b) ABAB type.

An alternative method of obtaining chiral supramolecular assemblies was reported for calix[4]arene dimers substituted at their wide rim by four urea residues (Figure 36). The dimeric capsules, which are held together by a seam of hydrogen bonds between N–H and O, form in non-polar solvents. For the achiral tetraurea calix[4]arene monomer, substituted with different A and B groups at phenolic units dimerization leads to chiral structures.^{107,108} The ABBB, AABB, and ABAB substitution patterns of monomers produce dimers with supramolecular chirality only due to the mutual arrangement of the two calixarenes (although obviously as racemic mixtures).

Conclusions and Outlook

A review of the literature concerning chiral calixarenes emphasizes the variety of structures that can be obtained using the macrocyclic scaffold and highlights the diversity of their applications. Since their first discovery in 1979 enormous progressions have been made in the synthesis and applications of chiral calixarenes. This resulted in the compilation of hundreds of chiral calixarenes. Their recognition properties are also quite well known. Each of the subtopics covered in this article already has several specialized reviews. Obviously there is still room for obtaining interesting results in the field of chiral recognition by chiral calixarenes. However, it needs to be noted that nowadays the area is quite mature. The future outlook for this area brings an impression that researches are now exploring practical aspects of the existing knowledge. They are aiming at transferring molecular recognition events into macroscopic properties that opens the field for new fascinating designs and discoveries. It can be envisioned that new smart materials including supramolecular self-healing gels, chiral nanomaterials, and molecular machines may emerge as a result of the application of chiral calixarenes.

References

1. Meyer, R.; Jira, T. *Curr. Anal. Chem.* **2007**, *3*, 161–170.
2. Krawinkler, K. H.; Maier, N. M.; Sajovic, E.; Lindner, W. J. *Chromatogr. A* **2004**, *1053*, 119–131.
3. Mutihac, L. *Curr. Drug Discovery Technol.* **2008**, *5*, 98–104.
4. Ganjali, M. R.; Norouzi, P.; Rezapour, M.; Faridbod, F.; Pourjavid, M. R. *Sensors* **2006**, *6*, 1018–1086.
5. Homden, D. M.; Redshaw, C. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 5086–5130.
6. Baldini, L.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 254–266.
7. Ludwig, R. *Microchim. Acta* **2005**, *152*, 1–19.
8. Coleman, A. W.; Perret, F.; Moussa, A.; Dupin, M.; Gu, Y.; Perron, H. Calix[n]arenes as Protein Sensors. In *Creative Chemical Sensor Systems*; Schrader, T., Ed.; Topics in Current Chemistry; Springer: Berlin Heidelberg, 2007; Vol. 277 (Part A), pp 31–88.
9. D'Acquarica, I.; Cerreto, A.; Delle Monache, G.; Subrizi, F.; Boffi, A.; Tafi, A.; Forli, S.; Botta, B. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4396–4407.
10. Zhou, J. L.; Chen, X. J.; Zheng, Y. S. *Chem. Commun.* **2007**, 5200–5202.
11. (a) Hamuro, Y.; Calama, M. C.; Park, H. S.; Hamilton, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 2680–2683; (b) Brewster, R. E.; Caran, K. L.; Sasine, J. S.; Shuker, S. B. *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 867–881; (c) Hülsbusch, C. M.; Feigel, M. J. *Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *59*, 53–63; (d) Lazzarotto, M.; Sansone, F.; Baldini, L.; Casnati, A.; Cozzini, P.; Ungaro, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 595–602.
12. Muthukrishnan, R.; Gutsche, C. D. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3962–3964.
13. Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 246–254.
14. Sansone, F.; Barbosa, S.; Casnati, A.; Fabbri, M.; Pochini, A.; Ugozzoli, F.; Ungaro, R. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 897–905.
15. Lazzarotto, M.; Sansone, F.; Baldini, L.; Casnati, A.; Cozzini, P.; Ungaro, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 595–602.
16. Sansone, F.; Barbosa, S.; Casnati, A.; Fabbri, M.; Pochini, A.; Ugozzoli, F.; Ungaro, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 869–886.
17. Yakovenko, A. V.; Boyko, V. I.; Kalchenko, V. I.; Baldini, L.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3223–3231.
18. Ruderisch, A.; Pfeiffer, J.; Schurig, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2025–2030.
19. Gibb, B. C.; Mezo, A. R.; Causton, A. S.; Fraser, J. R.; Tsai, F. C. S.; Sherman, J. C. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8719–8732.
20. Freeman, J. O.; Lee, W. C.; Murphy, M. E. P.; Sherman, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7421–7429.
21. Kuberski, B.; Szumna, A. *Chem. Commun.* **2009**, 1959–1961.
22. Szumna, A. *Chem. Commun.* **2009**, 4191–4193.
23. Szumna, A. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12381–12388.
24. Yanagihara, R.; Tominaga, M.; Aoyama, Y. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6865–6867.
25. O'Farrell, C. M.; Chudomel, J. M.; Collins, J. M.; Dignam, C. F.; Wenzel, T. J. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2843–2851.
26. Berghaus, C.; Feigel, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3200–3208.
27. Botta, B.; D'Acquarica, I.; Delle Monache, G.; Subissati, D.; Uccello-Barretta, G.; Mastrini, M.; Nazzi, S.; Speranza, M. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9283–9290.
28. Botta, B.; Botta, M.; Filippi, A.; Tafi, A.; Delle Monache, G.; Speranza, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7658–7659.
29. Tafi, A.; Botta, B.; Botta, M.; Delle Monache, G.; Filippi, A.; Speranza, M. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4126–4135.
30. Cherenok, S.; Vovk, A.; Muravyova, I.; Shivanyuk, A.; Kukhar, V.; Lipkowski, J.; Kalchenko, V. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 549–552.
31. Sansone, F.; Casnati, A. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4623–4639.
32. Aoyama, Y. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 588–593.
33. Cecioni, S.; Lalor, R.; Blanchard, B.; Praly, J. P.; Imbert, A.; Matthews, S. E.; Vidal, S. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 13232–13240.
34. Fujimoto, K.; Miyata, T.; Aoyama, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3558–3559.
35. Torvinen, M.; Kelenius, E.; Sansone, F.; Casnati, A.; Turhanen, P.; Janis, J. *Supramol. Chem.* **2012**, *24*, 228–233.
36. Geraci, C.; Consoli, G. M. L.; Galante, E.; Bousquet, E.; Pappalardo, M.; Spadaro, A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 751–758.
37. Sansone, F.; Baldini, L.; Casnati, A.; Ungaro, R. *Supramol. Chem.* **2008**, *20*, 161–168.
38. Aoyama, Y.; Kanamori, T.; Nakai, T.; Sasaki, T.; Horuchi, S.; Sando, S.; Niidome, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3455–3457.
39. Budka, J.; Tkadlecová, M.; Lhoták, P.; Stibor, I. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1883–1887.
40. Zheng, Y. S.; Zhang, C. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1189–1192.
41. Liu, X. X.; Zheng, Y. S. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6357–6360.
42. Bozkurt, S.; Durmaz, M.; Yilmaz, M.; Sirit, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 618–623.
43. Garrier, E.; Le Gac, S.; Jabin, I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3767–3771.
44. Darbost, U.; Zeng, X.; Giorgi, M.; Jabin, I. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10552–10560.
45. Pinkhassik, E.; Stibor, I.; Casnati, A.; Ungaro, R. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8654–8659.
46. Li, S. Y.; Zheng, Q. Y.; Chen, C. F.; Huang, Z. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 2816–2820.
47. Hu, C.; Huang, X.; Chen, Z.; He, Y. *Chinese J. Chem.* **2009**, *27*, 157–162.
48. Gopalsamuthiram, V.; Huang, R.; Wulff, W. D. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8213–8215.
49. Gopalsamuthiram, V.; Predeus, A. V.; Huang, R. H.; Wulff, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18018–18019.
50. Morohashi, N.; Iki, N.; Onodera, T.; Kabuto, C.; Miyano, S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5093–5097.
51. Böhmer, V.; Kraft, D.; Tabatabai, M. J. *Incl. Phenom. Mol. Recog. Chem.* **1994**, *19*, 17–39.
52. Szumna, A. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4274–4285.
53. Böhmer, V. *Liebigs Ann./Recl.* **1997**, 2019–2030.
54. Zheng, Y. S.; Luo, J. J. *Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2011**, *71*, 35–56.
55. Luo, J.; Zheng, Q.; Chen, C.; Huang, Z. *Prog. Chem.* **2006**, *18*, 897–906.
56. McIldowie, M. J.; Mocerino, M.; Ogden, M. I. *Supramol. Chem.* **2010**, *22*, 13–39.
57. Li, S. Y.; Xu, Y. W.; Liu, J. M.; Su, C. Y. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 429–455.
58. Dalla Cort, A.; Mandolini, L.; Pasquini, C.; Schiaffino, L. *New J. Chem.* **2004**, *28*, 1198–1199.
59. Boyko, V. I.; Yakovenko, A. V.; Matvieiev, Y. I.; Kalchenko, O. I.; Shishkin, O. V.; Shishkina, S. V.; Kalchenko, V. I. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7567–7573.
60. Arnaud-Neu, F.; Caccamese, S.; Fuangswasdi, S.; Pappalardo, S.; Parisi, M. F.; Petringa, A.; Principato, G. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8041–8048.
61. Luo, J.; Zheng, Q. Y.; Chen, C. F.; Huang, Z. T. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5917–5928.
62. Otsuka, T.; Shinkai, S. *Supramol. Sci.* **1996**, *3*, 189–205.
63. Narumi, F.; Hattori, T.; Morohashi, N.; Matsumura, N.; Yamabuki, W.; Kameyama, H.; Miyano, S. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 890–898.
64. Luo, J.; Zheng, Q. Y.; Chen, C. F.; Huang, Z. T. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8517–8528.
65. Shirakawa, S.; Moriyama, A.; Shimizu, S. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3117–3120.
66. Shirakawa, S.; Moriyama, A.; Shimizu, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5957–5964.
67. Shirakawa, S.; Kimura, T.; Murata, S.; Shimizu, S. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1288–1296.
68. Araki, K.; Inada, K.; Shinkai, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 72–74.
69. Miao, R.; Zheng, Q. Y.; Chen, C. F.; Huang, Z. T. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7662–7671.

70. Xu, Z. X.; Huang, Z. T.; Chen, C. F. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5430–5433.
71. Xu, Z. X.; Li, G. K.; Chen, C. F.; Huang, Z. T. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8668–8675, and references therein.
72. McIldowie, M. J.; Mocerino, M.; Skelton, B. W.; White, A. H. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3869–3871.
73. Klaes, M.; Neumann, B.; Stammier, H. G.; Mattay, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 864–868.
74. Buckley, B. R.; Page, P. C. B.; Chan, Y.; Heaney, H.; Klaes, M.; McIldowie, M. J.; McKee, V.; Mattay, J.; Mocerino, M.; Moreno, E.; Skelton, B. W.; White, A. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 5135–5151.
75. Wiegmann, S.; Neumann, B.; Stammier, H. G.; Mattay, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 3955–3961.
76. Wiegmann, S.; Fukuhara, G.; Neumann, B.; Stammier, H. G.; Inoue, Y.; Mattay, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1240–1245.
77. Matsushita, Y.; Matsui, T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *46*, 7433–7436.
78. Schneider, H. J.; Schneider, U. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **1994**, *19*, 67–83.
79. Arnecke, R.; Böhmer, V.; Paulus, E. F.; Vogt, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3286–3287.
80. Iwanek, W.; Mattay, J. *Liebigs Ann. Chem.* **1995**, 1463–1466.
81. Arnecke, R.; Böhmer, V.; Friebe, S.; Gebauer, S.; Krauss, G. J.; Thondorf, I.; Vogt, W. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6221–6224.
82. El Gihani, M. T.; Heaney, H.; Slawin, A. M. Z. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4905–4908.
83. Schmidt, C.; Paulus, E. F.; Böhmer, V.; Vogt, W. *New J. Chem.* **2001**, *25*, 374–378, and references therein.
84. Iwanek, W.; Urbaniak, M.; Gawdzik, B.; Schurig, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2787–2792.
85. Iwanek, W.; Frohlich, R.; Schwab, P.; Schurig, V. *Chem. Commun.* **2002**, 2516–2517.
86. Vachon, J.; Harthong, S.; Jeanneau, E.; Aronica, C.; Vanthuynne, N.; Roussel, C.; Dutasta, J. P. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5086–5091.
87. Bitter, I.; Grun, A.; Toth, G.; Balazs, B.; Horvath, G.; Toke, L. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3857–3866.
88. Lhoták, P.; Dudicó, M.; Stibor, I.; Petříčková, H.; Sýkora, J.; Hodačová, J. *Chem. Commun.* **2001**, 731–732.
89. Li, S. Y.; Zheng, Q. Y.; Chen, C. F.; Huang, Z. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 641–645, and references therein.
90. Liu, J. M.; Shi, J. Y.; Xu, Y. W.; Su, C. Y.; Li, S. Y. *Supramol. Chem.* **2011**, *23*, 419–424.
91. Caccamese, S.; Principato, G.; Geraci, C.; Neri, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1169–1173, and references therein.
92. Wezenberg, S. J.; Kleij, A. W. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 85–91.
93. Amato, M. E.; Ballistreri, F. P.; Pappalardo, A.; Tomaselli, G. A.; Toscano, R. M.; Williams, D. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3562–3570.
94. Marson, A.; Freixa, Z.; Kamer, P. C. J.; van Leeuwen, P. W. N. M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 4587–4591.
95. Liua, S.; Sandovalb, C. A. J. *Mol. Catal. A: Chem.* **2010**, *325*, 65–72.
96. Shivan'yuk, A.; Rissanen, K.; Korner, S. K.; Rudkevich, D. M.; Rebek, J. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 1778–1790, and references therein.
97. Saito, S.; Nuckolls, C.; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9628–9630.
98. Schmidt, C.; Paulus, E. F.; Böhmer, V.; Vogt, W. *New J. Chem.* **2000**, *24*, 123–125.
99. Szumna, A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1358–1368.
100. Kuberski, B.; Pecul, M.; Szumna, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3069–3078.
101. Mateos-Timoneda, M. A. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 363–372.
102. Luo, J.; Zheng, Y. S. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 483–506.
103. Vázquez-Campos, S.; Crego-Calama, M.; Reinhoudt, D. N. *Supramol. Chem.* **2007**, *19*, 95–106.
104. Prins, L. J.; Huskens, J.; de Jong, F.; Timmerman, P.; Reinhoudt, D. N. *Nature* **1999**, *398*, 498–502.
105. Ishi-i, T.; Crego-Calama, M.; Timmerman, P.; Reinhoudt, D. N.; Shinkai, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1924–1929.
106. Ishi-i, T.; Crego-Calama, M.; Timmerman, P.; Reinhoudt, D. N.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14631–14641.
107. Rudzевич, Y.; Rudzевич, V.; Böhmer, V. *Supramol. Chem.* **2010**, *22*, 717–725.
108. Pop, A.; Vysotsky, M. O.; Saadioui, M.; Bohmer, V. *Chem. Commun.* **2003**, 1124–1125.

Assembly-driven synthesis of hybrid molecular capsules controlled by chiral sorting†

Michał Wierzbicki and Agnieszka Szumna*

Cite this: *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 3860

Received 27th February 2013,
Accepted 19th March 2013

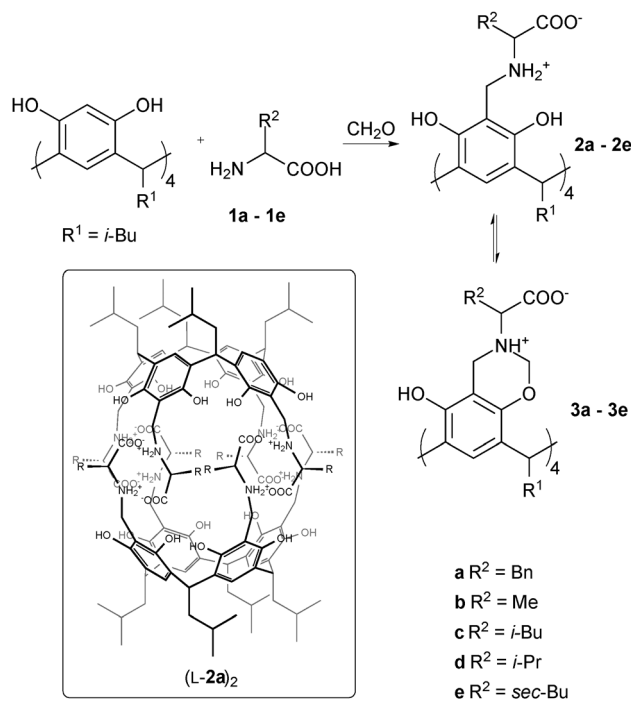
DOI: 10.1039/c3cc41515e

www.rsc.org/chemcomm

Chiral capsules with polar interiors (reversed capsules) undergo heterochiral sorting and exhibit positive mutalism – both hemispheres mutually benefit from the association. This feature can be coupled with partial reversibility of the formation reaction and utilized to amplify synthesis of hybrid capsules made of hemispheres that cannot be formed independently.

Non-covalent assembly can contribute considerably to the overall stability of systems, and therefore it can be used as a directing force for numerous chemical processes. Nature often uses molecular recognition to drive the selectivity of its crucial chemical reactions. Chemists have also shown that molecular recognition can be employed to direct synthesis of complex molecular architectures that are not achievable by simple chemoselective synthesis (rotaxanes, knots, *etc.*).^{1,2} Dynamical combinatorial chemistry couples stability gained from recognition with reversibility of the chemical reaction. In this way the most stable assemblies have a chance to be amplified.^{3–6} In the current communication we show that the stability gained from non-covalent assembly of capsular dimers can be used to control their own chemical synthesis. Additionally, we show that chiral sorting plays a crucial role in the selectivity of this process. We and others have previously demonstrated that sorting^{7–12} and chiral sorting, in particular,^{13–17} can effectively control assembly of capsules. However, it has not been previously shown that that chiral sorting can also mutually influence the chemical synthesis of hemispheres.

Recently we reported the synthesis of *L-2a*, which is composed of a rigid resorcin[4]arene scaffold and flexible *L*-phenylalanine arms (Scheme 1).¹⁷ The product dimerizes quantitatively in the reaction mixture and it is isolated as capsules (*L-2a*)₂ in a high overall yield (70%). The self-complementary dimers (*L-2a*)₂ have two unique features: they are chiral and have polar interiors, which makes them very efficient in chiral recognition of small



Scheme 1 Synthesis and structure of “reversed” capsules.

polar molecules.^{18,19} Since the binding motif of the dimer (interactions by two belts of salt bridges) involves only amino acid backbones, it can be expected that similar capsules should be formed with other amino acids having hydrophobic side chains. However, we have currently found that using even chemically similar amino acids leads to dramatic changes: not only in the association and complexation properties but also in the outcome of the chemical synthesis. We have found that the assembly process and successful formation of the product by the Mannich reaction are inextricably connected.

We have tested the Mannich reaction with various hydrophobic amino acids: Ala **1b**, Leu **1c**, Val **1d** and Ile **1e**. In the case of *L-1b*, the dimeric homochiral capsule (*L-2b*)₂ was formed in the reaction medium and isolated in 50% yield (ESI†). However, for

Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland. E-mail: agnieszka.szumna@icho.edu.pl; Fax: +48 22 6326681; Tel: +48 22 343 2101

† Electronic supplementary information (ESI) available: Synthetic and isolation procedures. NMR spectra of all new capsules synthesized. CCDC 918981. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c3cc41515e



L-1c, an amino acid with a longer and more flexible alkyl chain, the obtained product had a very complicated NMR spectrum with pronounced upfield shifted signals of methyl groups (ESI[†]). Further experiments showed that the product existed in a dimeric form (**L-2c**)₂ but one of the leucine side chains was self-encapsulated, thus preventing guest complexation. This was in contrast to (**L-2a**)₂, which in some solvents could also exist in self-encapsulated form but remained fully effective in guest binding. The most surprising behaviour was observed for **L-1d**. In this case we did not obtain a capsule (**L-2d**)₂. Moreover, despite numerous attempts, the secondary amine **L-2d** could not be obtained *even in its monomeric form*, using this reaction.

In order to gain insight into possible reasons for such differences we examined the course of the Mannich reaction between resorcin[4]arene, formaldehyde and various amino acids by NMR (Scheme 1 and Fig. 1). We chose the two borderline cases: **L-1a** and **L-1d**. In both cases the reaction initially led to the formation of variously substituted benzoxazines **3** (Fig. 1a and e). The existence of benzoxazine intermediates was confirmed using HSQC and DOSY spectra (ESI[†]). For **L-1a** the signals of benzoxazine species gradually disappeared during the progress of the reaction and finally, after 5 days, the main product was **L-2a**, which assembled into capsules (**L-2a**)₂ (Fig. 1b and c). However, for **L-1d** the reaction did not equilibrate to yield the final four-substituted secondary amine product **L-2d**. Instead, very broad peaks were obtained, indicative of non-specific aggregation (Fig. 1d). After addition of methanol to disassemble the aggregates, the spectrum revealed a complicated mixture of randomly substituted benzoxazines **3** and secondary amines **2** with unreacted aromatic

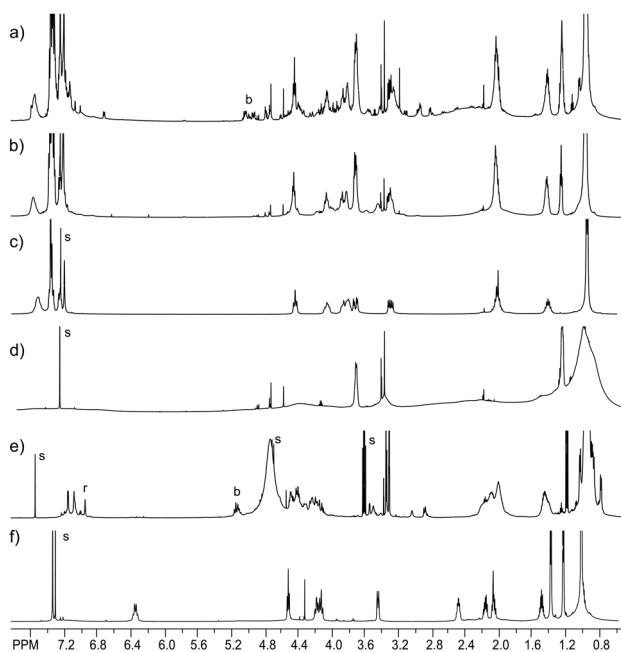


Fig. 1 ¹H NMR spectra (600 MHz) of reaction mixtures: (a) after 1 day from substrate **L-1a** (CDCl₃); (b) after 5 days from substrate **L-1a** (CDCl₃); (c) final isolated product from substrate **L-1a** (CDCl₃); (d) after 5 days from substrate **L-1d** (CDCl₃); (e) after 5 days from substrate **L-1d** (CDCl₃:CD₃OD 1 : 1); (f) isolated product (**L-2d**)(**D-2d**) (CDCl₃); s – solvent, b – benzoxazine, r – unreacted aromatic positions from resorcinarene.

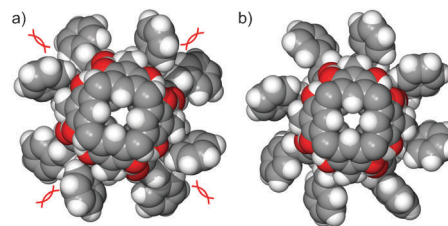


Fig. 2 Top view of X-ray structures of: (a) homochiral dimer (**L-2a**)₂ (Refcode HOWHAD); (b) heterochiral dimer (**L-2a**)(**D-2a**). † denotes steric crowding between phenylalanine side chains (highly disordered CH₂Cl₂ and CH₃NO₂ molecules were removed by SQUEEZE).

positions (Fig. 1e). Attempts to force the reaction by heating, prolonged reaction times, addition of acidic catalyst (AcOH, 10%) or addition of methanol (5–50%) to disassemble aggregates also failed. These results indicate that the formation of benzoxazines **3** is reversible (as also proved by others)²⁰ and assembly of a dimeric capsule (**L-2a**)₂ moves the equilibrium towards secondary amines. Apparently, for **L-1d** this driving force is missing, and therefore the reversible step of the Mannich reaction does not lead to secondary amine **L-2d**.

The possible reason why a capsular dimer fails to form can be deduced from the X-ray structure. In homochiral dimer (**L-2a**)₂ the amino acid side chains are grouped pairwise (Scheme 1 and Fig. 2).¹⁷ This can create potential sterical conflicts between amino acid side chains, especially branched at the position next to the stereogenic center (like **L-Val**). However, the sterical hindrance can be considerably diminished in a dimer composed of hemispheres of opposite chirality. The X-ray structure of (**L-2a**)(**D-2a**) shows that in a heterochiral capsule the amino acid side chains form a pinwheel type of structure that is devoid of steric clashes (Fig. 2b).[‡] This results in the formation of a more stable dimer. Indeed, we have previously proven that, in solution, a heterochiral capsule is thermodynamically more stable than a homochiral one.¹⁷

Based on this structural information we have predicted that, even though we cannot obtain a homochiral capsule (**L-2d**)₂ for steric reasons, the formation of a heterochiral capsule (**L-2d**)(**D-2d**) should be possible and can therefore possibly drive the reversible step of the Mannich reaction. This observation prompted us to develop a strategy for obtaining hybrid capsules^{21–24} that are not accessible through a traditional sequence: chemical reaction → isolation of homochiral capsules → association of heterochiral capsules. We took advantage of the reversibility of benzoxazine formation and the higher thermodynamic stability of heterochiral arrangement. Therefore, we tested the effectiveness of assembly-driven synthesis at the different levels (Fig. 3) and under various reaction conditions.§ First we used a pre-formed homochiral capsule (**L-2a**)₂ as a template for formation of a heterochiral hybrid capsule with a **D-1d** partner (Fig. 3a). The product (**L-2a**)(**D-2d**) was isolated in 45% yield. This result finally proves that the assembly can drive the synthesis and also eliminates the possibility that inherent reactivity of valine is responsible for the negative outcome of the Mannich reaction. We then investigated whether we could obtain a hybrid capsule without a pre-formed template. In the first approach the reactions were carried out so



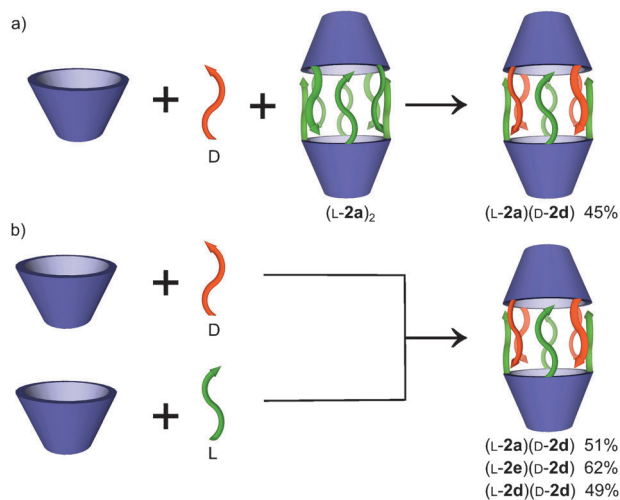


Fig. 3 Sorting experiments in the synthesis of hybrid capsules.

that the first step took place separately for opposite enantiomers. Then the reaction mixtures were combined and the mixture was allowed to assemble and equilibrate (Fig. 3b). In this way the test capsule $(L-2a)(D-2d)$ was obtained in 51% yield. The strategy has proven to be effective for the synthesis of new capsules made of two monomers, of which *none* was obtained as a single component, for example $(L-2e)(D-2d)$ (62%) and $(L-2d)(D-2d)$ (49%). Finally, a totally one pot procedure using racemic amino acids was tested. However, the limitation of this approach is the first reaction step (attachment to the resorcinarene skeleton) which, under mild conditions (required for effective assembly), has limited (or no) reversibility. Therefore, the one-pot procedure proved to be ineffective.

As the molecular capsules with reversed polarity are already formed in the reaction medium, their isolation also requires special care to protect their secondary structure. Similarly to natural biological polymers, if the capsular dimers are not properly handled, they are prone to *denaturation*, which destroys their function. Dimers $(L-2b)_2$ are stable and easily isolated in non-polar solvents. However, when $(L-2b)_2$ was dissolved in DCM–MeOH and evaporated, its capsular properties were lost. As a result of denaturation the material was no longer soluble in non-polar solvents and did not show complexing properties. This denaturation process was to some extent reversible, but it required days (in chloroform) for $(L-2b)_2$ to partially restore its capsular structure. However, some part of the material remained irreversibly denaturated. The plausible explanation involves formation of non-covalent oligomeric polymers instead of well ordered dimers as the polarity of solvent increases (DCM evaporates faster than methanol). Although the dimers are thermodynamically favoured in non-polar solvents, their formation is slow and therefore re-denaturation is very slow. The denaturation process is most pronounced for capsules that have “thin” hydrophobic shells e.g. $(L-2b)_2$. For “thicker” hydrophobic shells, e.g. $(L-2a)_2$, denaturation still occurs, but to a lesser extent. This observation has important implications from the synthetic point of view. Improper reaction conditions or improper work-up destroys supramolecular assemblies and may result in a chemical

compound, but not a functional material. Since the self-assembly process is very slow, the real value of the newly synthesized compound can be easily overlooked.

In conclusion, we have shown that the chemical synthesis of capsules with reversed polarity is driven by their self-assembly. The hemispheres can mutually promote their own formation. Therefore, it is possible to obtain a capsule made of two different hemispheres even if none of them can be synthesized separately. Both formation by chemical reaction and successful isolation are inextricably connected with formation of dimers. If the capsules are not formed either due to steric requirements or due to denaturation, the products cannot be obtained, even as monomers. Higher thermodynamic stability of heterochiral dimers can be employed to drive the chemical reaction of their formation. The new hybrid dimers obtained by this approach exhibit positive mutualism – they stabilise their own formation and cannot exist separately.

We acknowledge the financial support from the National Science Centre (Grant No. N204 187839).

Notes and references

† Crystallographic data for $(L-2a)(D-2a) \times 6 CH_2Cl_2 \times 6 CH_3NO_2$: $C_{180}H_{230}Cl_{12}N_{14}O_{44}$ $M = 3719.18$, $0.63 \times 0.76 \times 0.93$ mm³, monoclinic, space group $P2_1/n$ (no. 14), $a = 17.9860(7)$, $b = 32.4038(14)$, $c = 32.9781(14)$ Å, $\beta = 90.406(2)^\circ$, $V = 19219.6(14)$ Å³, $Z = 4$, $D_c = 1.285$ g cm⁻³, $F_{000} = 7856$, CuK α radiation, $\lambda = 1.54184$ Å, $T = 173(2)$ K, $2\theta_{max} = 136.1^\circ$, 415 267 reflections collected, 34 285 unique ($R_{int} = 0.0690$). Final GooF = 1.035, $R_1 = 0.0700$, $wR_2 = 0.1917$, R indices based on 28 496 reflections with $I > 2\sigma(I)$ (refinement on F^2), 1860 parameters, 0 restraints. Lp and absorption corrections applied, $\mu = 2.227$ mm⁻¹. Squeeze procedure has been applied to remove highly disordered solvent molecules. CCDC 918981.

§ See ESI† for details.

- 1 A. Bogdan, M. O. Vysotsky, T. Ikai, Y. Okamoto and V. Böhmer, *Chem.–Eur. J.*, 2004, **10**, 3324.
- 2 A. Bogdan, Y. Rudzevich, M. O. Vysotsky and V. Böhmer, *Chem. Commun.*, 2006, 2941.
- 3 Z. Rodriguez-Docampo, E. Eugenieva-Ilieva, C. Reyheller, A. M. Belenguer, S. Kubik and S. Otto, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 9798.
- 4 L. Vial, R. F. Ludlow, J. Leclaire and S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 10253.
- 5 S. Otto, *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**, 2200.
- 6 K. Oh, K. S. Jeong and J. S. Moore, *Nature*, 2001, **414**, 889.
- 7 O. Mogck, V. Böhmer and W. Vogt, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 8489.
- 8 H. Gan and B. C. Gibb, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 1656.
- 9 A. S. Singh and S. S. Sun, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 7392.
- 10 M. M. J. Smulders, A. Jimenez and J. R. Nitschke, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 6681.
- 11 E. S. Barrett, T. J. Dale and J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 2344.
- 12 Y. Rudzevich, V. Rudzevich, F. Klautzsch, C. A. Schalley and V. Böhmer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 3867.
- 13 M. Chas, G. Gil-Ramirez, E. C. Escudero-Adan, J. Benet-Buchholz and P. Ballester, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 1740.
- 14 A. Wu and L. Isaacs, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4831.
- 15 C. G. Claessens and T. Torres, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 14522.
- 16 M. Alajarin, R. A. Orenes, J. W. Steed and A. Pastor, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 1394.
- 17 B. Küberski and A. Szumna, *Chem. Commun.*, 2009, 1959.
- 18 A. Szumna, *Chem. Commun.*, 2009, 4191.
- 19 A. Szumna, *Chem.–Eur. J.*, 2009, **15**, 12381.
- 20 C. Schmidt, E. F. Paulus, V. Böhmer and W. Vogt, *New J. Chem.*, 2000, **24**, 123.
- 21 D. Ajami, M. P. Schramm, A. Volonterio and J. Rebek, Jr., *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 242.
- 22 C. Valdés, U. P. Spitz, L. M. Toledo, S. W. Kubik and J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 12733.
- 23 B. M. O’Leary, T. Szabo, N. Svenstrup, C. A. Schalley, A. Lützen, M. Schäfer and J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 11519.
- 24 R. K. Castellano, B. H. Kim and J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 12671.



Experiences with applications of macromolecular tools in supramolecular crystallography†

 Cite this: *CrystEngComm*, 2014, 16, 3773

 Michał Wierzbicki,^a Mirosław Gilski,^{bc} Kari Rissanen,^{*d} Mariusz Jaskólski^{*bc} and Agnieszka Szumna^{*a}

Supramolecular structures, with ever increasing size ranging from a few up to tens of nanometres, represent an intermediate stage between small molecules and biological macromolecules. Many crystal structures of these large supramolecular assemblies have been solved using dual space algorithms. However, supramolecular assemblies with a capsular shape present a particular challenge for crystallography, especially when they are chiral and composed of only light atoms. In this paper, we show that the application of “routine” macromolecular tools may be of great help in solving the crystal structures of supramolecular assemblies that are otherwise refractory to the routine methods of small molecule crystallography. Specifically, we have applied the method of molecular replacement as implemented in PHASER in order to solve the crystal structure of a chiral organic capsule, which could not be determined using direct or dual space methods. By utilizing various models consisting of well-defined supramolecular “bricks” or modelled structures, we show how model size (fraction of the asymmetric unit) and quality (root mean square deviation from target) influence the success rate of medium sized non-protein structures. The results indicate that supramolecular structures, that are still “small molecules” for macromolecular standards, can be successfully solved using even very small models, down to 25% by weight of the contents of the asymmetric unit.

 Received 9th November 2013,
Accepted 3rd January 2014

DOI: 10.1039/c3ce42288g

www.rsc.org/crystengcomm

Introduction

Although the underlying principles of macromolecular (also referred to as protein) crystallography and small-molecule crystallography (here concerned mainly with organic molecules) are essentially the same, the experimental and computational approaches in these two areas are quite distinct, partly as a result of tradition, and partly because of real idiosyncrasies of these domains. This is visible, for instance, in the usually simple crystallization methods in small-molecule crystallography and the highly developed, usually high-throughput, miniaturized and robotized macromolecular crystallization techniques, and in the fact that most organic crystal structures are being solved automatically and routinely by direct methods, while this approach is inapplicable for typical-size macromolecular structures. A dramatic divide concerns the

achievable resolution, which with small molecules is almost always very high (*e.g.* about 0.8 Å even when limited by the wavelength of Cu K α radiation), and in protein crystallography is still rare even at the nominal atomic resolution of 1.2 Å defined by Sheldrick,¹ as illustrated by the constant level of ~2% of such structures² in the Protein Data Bank.³ The latter aspect is responsible, for example, for the fact that while protein crystallographers always build their models on electron density maps, such maps almost never meet the eye of small-molecule crystallographers, who can work quite comfortably with atom/peak lists generated by automatic interpretation of such maps. There are, however, also evident lines of convergence. For example, the loop method introduced for mounting protein crystals for cryogenic experiments⁴ is gaining popularity in small-molecule crystallography, and the two communities use cryogenic temperatures for routine data collections (although the reasons in the two cases may be somewhat different). Also, the high-resolution barrier is gradually becoming a historical one, as record-breaking ultrahigh-resolution structures of proteins (0.48 Å)⁵ and nucleic acids (0.55 Å)⁶ can now also be found in the PDB. A very encouraging example of convergence is provided by the highly popular SHELX system of crystallographic programs,⁷ originally developed for small-molecules and later very successfully converted by its author to a versatile system, now also widely used in macromolecular

^a Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland. E-mail: agnieszka.szumna@icho.edu.pl

^b Center for Biocrystallographic Research, Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland. E-mail: mariuszj@amu.edu.pl

^c Department of Crystallography, Faculty of Chemistry, A. Mickiewicz University, Poznan, Poland

^d Department of Chemistry, Nanoscience Center, University of Jyväskylä, P.O. Box 35, FI-40014, Finland. E-mail: kari.t.rissanen@jyu.fi

† CCDC 971032 and 971033. For crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c3ce42288g



crystallography. In general, however, the computational tools are quite different in the two communities, the small-molecule programs usually being incapable of handling the huge macromolecular cases and the macromolecular programs being often hard-wired for the structural specifics of biopolymers.

In this work, we demonstrate that with very little additional effort, the powerful computational tools of protein crystallography can become extremely useful in small molecule crystallography as well, especially when the “small molecules” are not so small at all, as is the case of self-assembling supramolecular systems. We show that application of “routine” macromolecular tools may greatly help with solving crystal structures of supramolecular assemblies that cannot be solved using “routine” small molecule crystallography methods.

Results and discussion

Experimental problems with crystal structure determination of capsular assemblies

For the last few decades, most small-molecule structures have been routinely solved by direct methods. Direct methods are a subclass of *ab initio* methods, *i.e.* methods of crystal structure determination that do not require prior knowledge of any atomic positions. Direct methods algorithms, as implemented in the programs SHELXS⁷ and SIR,⁸ usually are not effective with more than ~200 non-hydrogen atoms, although there are cases of spectacular success even with much larger structures.^{9–11} The more recently developed methods based on dual space algorithms, as implemented in, for example, the programs Shake-and-Bake,¹² SHELXD⁷ or SUPERFLIP,¹³ have significantly pushed the boundaries of *ab initio* crystallographic methods. All *ab initio* methods rely on the atomicity constraint, which is implemented by requiring the electron density to be concentrated at randomly distributed, resolved, and equal-atom positions. The mathematical solution requires atomic-resolution data, which is often difficult to achieve for macromolecular structures and also for some supramolecular structures. However, when the atomicity condition is met (*i.e.* accurate diffraction data have been measured to a resolution of 1.2 Å or better), the dual space methods have proven capable of solving complete structures containing as many as 2000 independent non-H atoms.

Supramolecular structures (artificially constructed non-covalent assemblies), with their increasingly larger size ranging from a few nanometers up to tens of nanometers, are located at the interface between small molecules and macromolecules. With the spectacular advances in data quality (mostly owing to synchrotron radiation sources)¹⁴ and development of dual space algorithms, many crystal structures of large supramolecular assemblies are now solved using *ab initio* methods.¹⁵ However, the special case of assemblies with a capsular shape presents a particular challenge for crystallography, particularly when they are made of light atoms and are chiral, like those that have been recently the subject of interest of our group.^{16–19} There are good structural reasons

for that. Capsular assemblies, by definition, contain vaults or cavities that are often filled with highly disordered solvent. Since the capsules resemble large spherical objects, their inter-capsular voids are also quite large and often also filled with disordered solvent. Therefore, the volume ratio between the well-defined capsule framework and the poorly defined regions can be quite low. Organic capsules are usually crystallized from organic solvents, which makes the crystals fragile and prone to fast decomposition due to solvent volatility. Such crystals often diffract poorly and only low resolution data can be obtained. Further problems that are particularly relevant to capsular assemblies are related to their high symmetry. Symmetry may be of great help if the capsule molecular symmetry coincides with crystallographic symmetry. However, in many cases, the molecular symmetry does not overlap or only approximately overlaps with crystal lattice symmetry. As a result of this symmetry mismatch, the crystals are very prone to twinning, and this effect is aggravated by the often weak inter-capsular interactions. Therefore, space group determination may be problematic because of twinning and pseudosymmetry.

Solution of the problem – molecular replacement

Despite the above difficulties, one great structural advantage of supramolecular capsules is that they are often built from well-defined molecular “bricks”. Out of the arsenal of several known “bricks”, chemists have made an enormous number of covalent derivatives and sophisticated multicomponent assemblies. For example, there are more than 2500 structures containing calix[4]arene skeleton, ~960 resorcin[4]arenes, and ~690 various cucurbiturils (CSD, version 5.34).²⁰ The advantage of these “bricks” consists in the fact that their 3D structures are well known and in most cases not susceptible to conformational changes (at least not considerable). Because of that, supramolecular crystallography can benefit from building crystal structures from known molecular fragments, *i.e.* can exploit the methods of molecular replacement.

Molecular replacement (MR) involves the rigid-body placement of a search model in the asymmetric unit of the target crystal, with the aim of finding the best match between the search model and the target structure. Computer programs for MR have been around for several decades. The success of the method depends predominantly on two factors: the fraction of the asymmetric unit for which there is a suitable model, and the RMS deviation (after optimal superposition) between the model and target structures. Although the availability of a good model is a prerequisite for MR, the quality of the target functions and the search strategy are also important for success. Traditionally, molecular replacement has been based on the properties of the Patterson function. The factors that can complicate the problem are high symmetry, tight packing and/or multiple search components in the asymmetric unit. Large numbers of components in the asymmetric unit are particularly problematic for traditional MR algorithms, where each component of the asymmetric unit is



found independently and therefore the fraction of the total scattering contributed by each component is low. As an alternative to Patterson-based MR, a maximum-likelihood (ML) MR approach is now playing an increasingly important role, particularly for difficult molecular replacement problems.^{21–23} The ML algorithm is implemented, for example, in the program PHASER.²⁴ The method significantly improves the success rate in cases where there are multiple search components in the asymmetric unit because it has more discriminating (maximum-likelihood) rotation and translation functions than other methods, and these functions also utilize the information about the orientation and translation of a given component to increase the signal-to-noise ratio of both the rotation and translation search for other components. A recent PHASER version also finds pseudo-translational NCS (non-crystallographic symmetry) and corrects the data for intensity variations using likelihood methods, yielding molecular replacement solutions with even higher signal-to-noise level.²³ The ML MR functions implemented in PHASER have allowed many previously intractable macromolecular MR problems to be solved.^{23,25–27}

Working example – chiral organic capsule with polar interior

The example presented to illustrate our approach is a chiral organic capsule, **1**, non-covalently assembled from two chiral hemispheres (Fig. 1).¹⁹ The assembly motif consists of a system of ionic hydrogen bonds (salt bridges) between carboxylic and amine groups. The capsule has a reversed polarity (in analogy to reverse micelles), with polar groups gathered inside and a hydrophobic outer shell. The hemispheres consist of resorcin[4]arene scaffolds decorated with four L-alanine arms. Although the amino acid arms are highly flexible, solution studies have indicated that the association motif

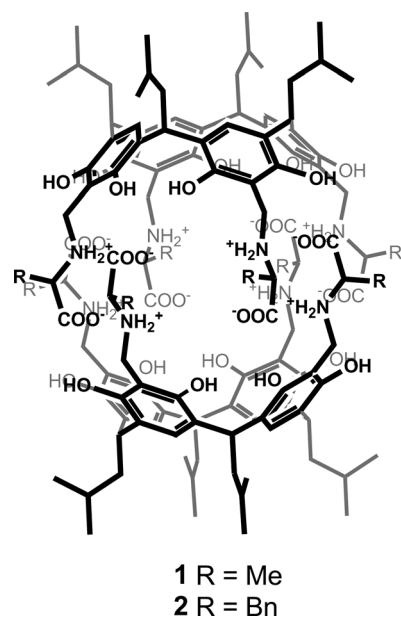


Fig. 1 Chemical structures of the chiral capsules with reversed polarity.

for **1** is similar to that reported previously for L-phenylalanine analogue **2**.¹⁶ Therefore, we expected that the present structure would have a capsular shape with a cavity volume of $\sim 310 \text{ \AA}^3$, capable of binding small polar molecules.^{17,18} Considering the size of the unit cell and its contents, the structure presents a medium-sized crystallographic problem according to current standards (Table 1). The quality of the dataset, which extends to 0.90 \AA resolution, is quite high, as indicated by $R_{\text{int}} = 0.044$ for orthorhombic lattice. Statistics of the systematic absences indicated the $P2_12_12_1$ space group. However, our previous experience suggests that some of the reflection intensities might be artificially low due to the high symmetry of the assemblies. Therefore, in the subsequent MR calculations, we tested all primitive space groups in the 222 class by allowing all possible combinations of twofold and twofold screw axes (2 and 2_1).

The dataset for the crystal of **1** seemed suitable for the *ab initio* structure solution methods owing to a quite high

Table 1 Crystal data for **1** and refinement statistics

Crystal data	
Moiety formula	1 (acetone) _{9.1} ·(MeCN) _{0.7} ·H ₂ O
Empirical formula	(C ₆₀ H ₈₄ N ₄ O ₁₆) ₂ ·(C ₃ H ₆ O) _{9.1} ·(C ₂ H ₃ N) _{0.7} ·H ₂ O
Formula weight	2833.46
Temperature (K)	150
Wavelength (Å)	1.54178
Crystal system	Orthorhombic
Space group	$P2_12_12_1$
Unit cell dimensions	15.7322(4)
<i>a/b/c</i> (Å)	24.0717(7) 41.3778(12)
Unit cell volume (Å ³)	15 669.8(8)
<i>Z</i>	4
Calculated density (g cm ⁻³)	1.191
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.710
<i>F</i> (000)	6066
θ range for data collection (°)	58.99–3.00
Index ranges	$-11 < h < 17$ $-26 < k < 24$ $-44 < l < 45$
Reflections collected	33 459
Independent reflections (Friedel opposites not merged/merged)	20 458 ($R_{\text{int}} = 0.0462$) 11 872 ($R_{\text{int}} = 0.0491$)
Completeness to θ_{max}	0.967
Refinement statistics (with disordered solvent molecules)	
Final <i>R</i> indices [$>2\sigma(I)$]	0.0995
<i>R</i> indices [all data]	0.1037
Goodness-of-fit	1.160
Extinction coefficient	0.00212(10)
Largest diff. peak and hole (e Å ⁻³)	0.471/–0.396
Refinement statistics (with solvent masking procedure)	
Final <i>R</i> indices [$>2\sigma(I)$]	0.0757
<i>R</i> indices [all data]	0.0815
Goodness-of-fit	1.055
Extinction coefficient	—
Largest diff. peak and hole (e Å ⁻³)	0.463/–0.312



diffraction quality. We therefore first attempted to solve the structure by *ab initio* methods using virtually all routine procedures available in SHELXS, SIR and SUPERFLIP. The attempts were carried out independently in laboratories in Poland (Szumna) and in Finland (Rissanen). In those runs, for example SHELXS, produced many trial solutions with very similar figures of merit, none above a conclusive threshold. We also tested SUPERFLIP and SHELXD. In the multi-run mode, SUPERFLIP generated many potential solutions that met the default criteria for convergence. However, none of them had any expected features of the capsule structure.

The previously reported structure of a chiral capsule with L-phenylalanine arms (2) was solved using DIRDIF.²⁸ DIRDIF is a computer program that uses a traditional Patterson-based version of molecular replacement in combination with direct methods in an implementation suitable for small molecule problems. In the past, it has proven to be very successful in our hands for solving many problematic structures, often using twinned data.^{16,29} However, in the present case, multiple trials using various models (Fig. 2) in all tested space groups have failed to find a solution.

As most of the “standard” small-molecule crystallographic tools failed to give a solution, we turned our attention to macromolecular software. The advantages of using maximum-likelihood MR as implemented in PHASER include searching for many independent fragments simultaneously and checking of all chiral space groups within a given crystal class and Bravais lattice. As the initial model, we used the core of capsule 2 (model A1, Fig. 2). With model A1, the structure was easily solved using a standard PHASER procedure (without modification of any of the default parameters) and the program returned the solution in the $P2_12_12_1$ space group. The structure was subsequently refined using SHELXH to the final $R_1 = 0.0995$ with modelled solvent disorder or to $R_1 = 0.0757$ with solvent masking procedure in OLEX2.³⁰ The asymmetric unit is composed of dimer 1 with one water and 9.1 acetone molecules and 0.7 of an acetonitrile molecule (Fig. 3). Two acetone molecules and one water molecule are found inside the cavity; the remaining acetone molecules are located between the capsules and mostly disordered. Interestingly, inspection of the contour electron density maps, as it is common for macromolecules, allowed for the unequivocal location of

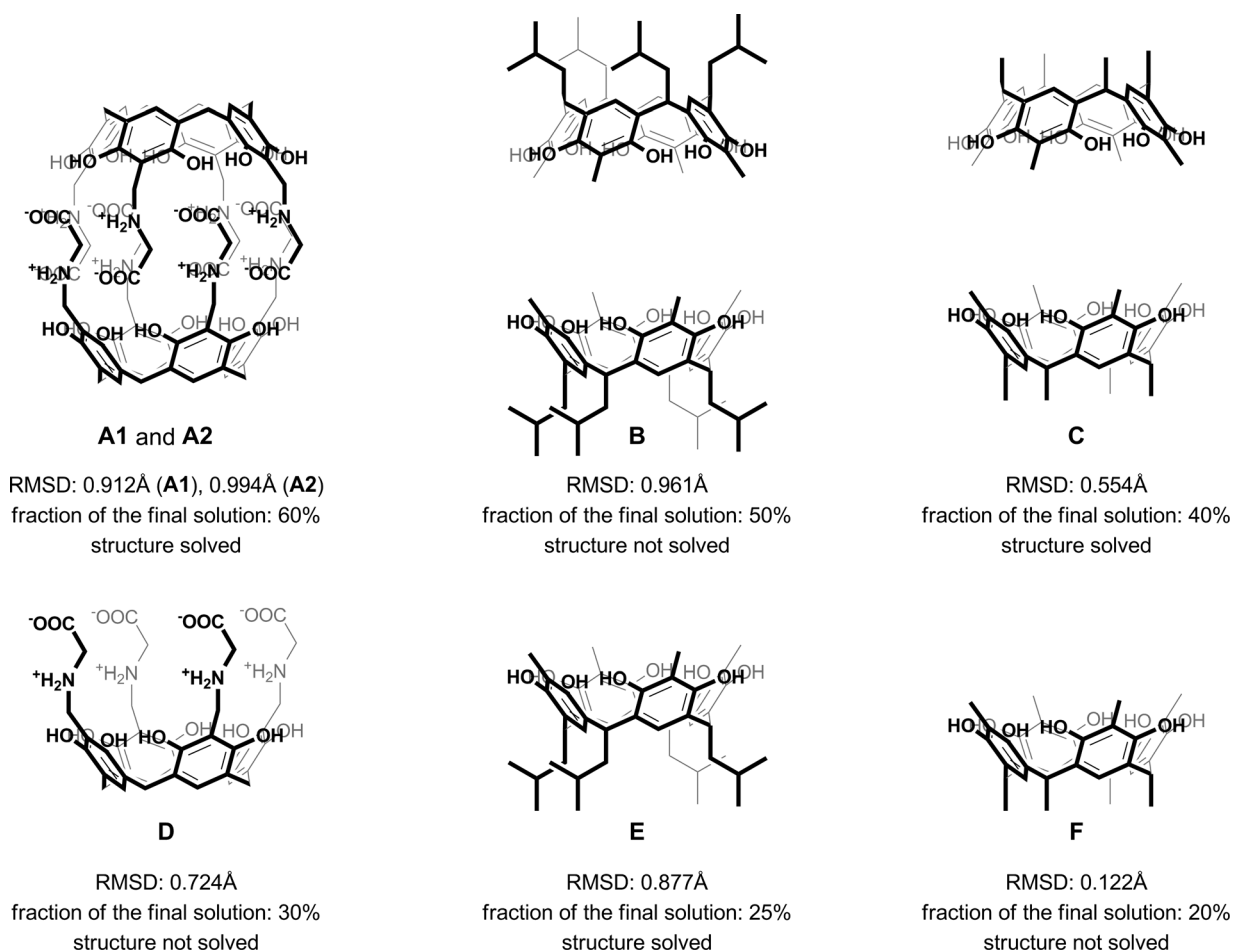


Fig. 2 Chemical structures of models that were tested for solving the structure of 1 using molecular replacement methods. RMSD value and fraction of the final structure (by weight) for each model are given below. The comment indicates if the model resulted in solved structure using PHASER program with default parameters.



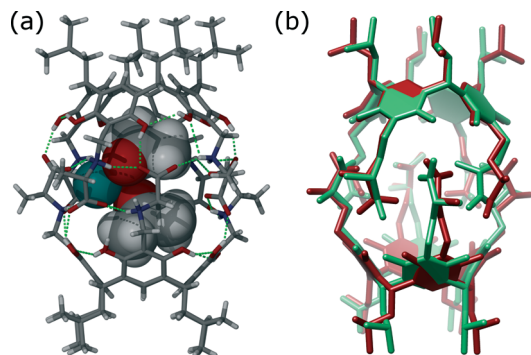


Fig. 3 (a) Structure of **1** (sticks) with two molecules of acetone (van der Waals spheres) and one water molecule (aquamarine) trapped inside the cavity; (b) superposition of the corresponding parts of the structures of **1** (green) and **2** (red).

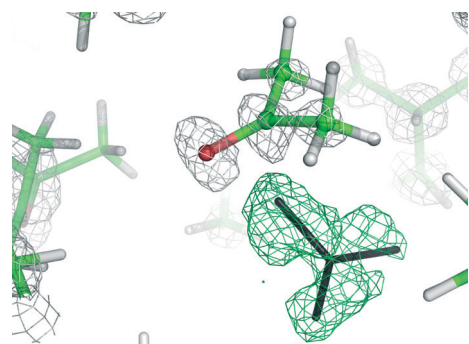


Fig. 4 A section of $2F_o - F_c$ (grey) and difference $F_o - F_c$ (green) electron density maps contoured at the 1.5 and 3.0σ level, respectively. The difference map was used for the identification of an acetone molecule (black sticks).

some acetone molecules (Fig. 4). These solvent molecules with partial occupancies are not clearly visible using electron density peaks, typically generated during small molecule refinement. The final structure of capsular dimer **1** is found to deviate significantly from the “model”, at least more than expected (Fig. 3b). The differences involve

different conformations of the amino acid arms. In particular, one of the L-alanine arms has a conformation, with the side chain located inside the cavity, that has not been observed in any of the previous structures, either in the solid state or in solution. Additionally, the relative position of the resorcin[4]arene scaffolds is significantly different. In the structure of **2** (used as a model), the dihedral angle between the scaffolds is 44° . In the present structure of **1**, this angle is only 29° . As a result of those differences, the RMSD value between the corresponding parts of the structures of capsules **1** and **2** is as high as 1.082 \AA (Fig. 3b).

The A1 model that was used for MR in the initial PHASER attempt accounted for quite a substantial fraction of the unknown structure (60% by weight). Its creation was possible due to the availability of structural data for **2**. However, the model is not very accurate in small-molecule standards (RMSD 0.912 \AA , Fig. 5a). One can expect that a model of similar quality could also be obtained through molecular modelling. To check this, we constructed a model “from scratch” using the qualitative information on the interaction mode between the monomers and the approximate symmetry from NMR experiments. The fragment was optimized using molecular mechanics (with various force fields). The modelling afforded fragment A2 with visually different positions of the arms and different geometry of the resorcin[4]arene scaffold (Fig. 5b, RMSD 0.994 \AA). The modelled fragment A2 also produced a correct solution of the crystal structure in PHASER. This example indicates that molecular modelling with some hints from NMR models can also be of great help in solving crystal structures by molecular replacement.

We also tested whether smaller fragments could be used for solving the crystal structure. We gradually reduced the size of the model down to the most characteristic “brick” of the present capsule, consisting of just the resorcin[4]arene skeleton (Fig. 2). The results show that with the use of default procedures in PHASER, the success rate is not a simple function of model size. Application of the two rigid resorcin[4]arene scaffolds at the correct distance but with wrong relative rotation (model C, model size 40% by weight, RMSD 0.554 \AA)

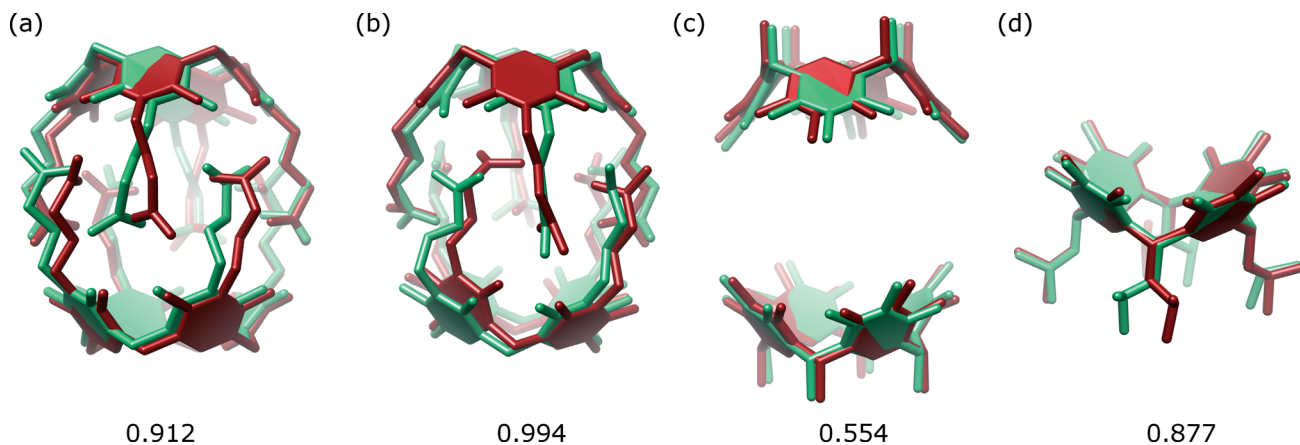


Fig. 5 Superposition of the corresponding sections of the structure of **1** (green) and models (red): (a) A1; (b) A2; (c) C and (d) E. The RMSD value for each case is given below in \AA .



still allowed for a successful solution of the structure. Also, a model consisting of only a single resorcin[4]arene skeleton with flexible lower-rim alkyl chains (model E, 25%, RMSD 0.877 Å) allowed us to solve the structure. In this case, even though the location of two copies was requested, PHASER found only one of them (or at least only one was visible after the peak-search interpretation of the electron density map). Thus, initially, only a small part of the structure was available in this case. However, subsequent step-by-step expansion of the model led to successful completion and refinement of the whole structure. With the use of the smallest rigid building block, *i.e.* the resorcin[4]arene skeleton itself (model F, 20%, RMSD 0.122 Å), the structure cannot be solved by the default runs of PHASER.

An interesting discontinuity in the dependence between model size and the chance of success was observed for models B and D (Fig. 2). Even though both the smaller and larger models gave the correct solution, the medium-sized models did not, although they were not worse in terms of their RMSD values. The reasons for that can be traced down to the packing criterion that is routinely checked by the software. By default for protein structures, the program discards solutions that have too many clashes of C α atoms (more than 5). For supramolecular structures, it is hard to predict what should be classified as C α atoms and tighter packing of the subunits is possible. Therefore, in subsequent runs, we allowed PHASER to accept solutions without checking the packing criterion. The calculation time in this case was much longer (*ca.* five times), but we could obtain the correct solutions for models that were previously unsuccessful (B and D).

Conclusions

In this work we have shown how the powerful computational tools of protein crystallography can be successfully applied to crystal structures of supramolecular assemblies that may not be easily amenable to approaches typical for small-molecule crystallography. Of particular interest are the powerful molecular replacement methods, as many supramolecular structures are assemblies of known fragments. Among those methods, the maximum-likelihood-based MR algorithms with the possibility to simultaneously search for multiple fragments, as implemented in PHASER, seem to be particularly suitable. In many cases, the default parameters used by the MR software can be successfully applied for supramolecular structure solution. However, one has to be aware of the inherent differences between the supramolecular and protein structures, which may require a deviation from the protein-specific default setting. They are mainly related to the substantially different packing characteristics. Although supramolecular structures are quite large by the standards of small molecule crystallography, they are still rather small for typical protein crystallography. A benefit of this is that even very small models can lead to successful structure solution. In the present paper, we have shown that models that are composed of only 25% of the total weight of the asymmetric unit can still yield an appropriate solution of the crystal structure.

As the size and complexity of supramolecular structures are constantly growing, one can predict that the number of examples emerging at the interface between small molecules and macromolecular crystallography will also be growing. The present experiences foretell a great promise for the application of macromolecular methodology in supramolecular crystallography and highlight the unity of these two poles of structural crystallography.

Experimental

Materials

Compound 1 was synthesized as previously reported.¹⁹ A 10 mg sample of 1 was crystallized from acetone. The crystals were quite large but decomposed within seconds after removal from the mother liquid. The crystals were transferred as soon as possible into a loop containing perfluorinated oil and frozen at 150 K. X-Ray diffraction data were measured on a Bruker Kappa Apex II diffractometer at Polish Academy of Sciences (Warsaw, Poland) equipped with a sealed-tube Cu K α source, a APEX2 detector and a low-temperature device. APEX2 software was used for the data measurement for the processing. Crystal mosaicity 0.78°. Data were integrated in an orthorhombic P crystal system with LS profile fitting enabled (using default settings). The data were corrected for Lp and absorption (estimated minimum and maximum transmission: 0.7864 and 1.0000).

The protocol of structure solution using PHASER

A reflection file obtained in the data reduction process was converted from SHELX *hkl* to *mtz* format using the F2MTZ routine of the CCP4 suite. The CTRUNCATE procedure was used to convert the intensities to structure factors, and the scattering power was calculated based on the atom count in the asymmetric unit (excluding any possible solvent, the content of which was not known at that stage). The obtained *mtz* file was then edited using the SFTOOLS module to input the correct wavelength. The models for molecular replacement (in PDB format) were prepared using X-Seed,³¹ starting from a previously refined structure of 2. The PHASER program ver. 2.51 from the CCP4 package was used to solve the structure, taking into account all the possible primitive space groups within the given point group symmetry (222 in this case). The RMSD between each model and the target structure was set to 1 Å. The resulting PDB file, containing the oriented and translated atomic model, and *mtz* file, containing the original diffraction data plus the model-derived structure-factor information and Fourier map coefficients, were then inspected directly in the COOT program, a molecular-graphics application for model building and validation.³² Visualization of the electron density maps calculated on the basis of these data allows one to build and validate the structural model. The peak coordinates located in a peak-search procedure were written in the atomic coordinate PDB file that was subsequently exported to a SHELX res file format using Mercury.³³



Refinement

The structure was refined with SHELXH using the X-Seed interface.³¹ All ordered non-hydrogen atoms were refined with anisotropic thermal parameters (ADP). All H atoms were positioned geometrically. The $-\text{CH}_3$ hydrogen atoms were staggered with respect to the shortest other bond to the atom to which the $-\text{CH}_3$ is attached; water hydrogen atoms were not located. Geometrical restraints were applied for the disordered fragments (FLAT, DFIX, DANG, and SAME). The disorder is mainly observed in the peripheral part of the molecule (alkyl chains) and for the intracapsular acetone molecules. Most of the disordered atoms were located in dual positions. With all solvent molecules located from the electron density peaks, we obtained $R_1 = 0.0995$ (Table 1), CCDC 971032.

Inspection of ADP parameters for intracapsular solvent molecules and peripheral alkyl chains indicates that some additional disorder is still possible. However, numerous attempts to model this residual disorder with alternative occupancies did not yield stereochemically reasonable results. As an alternative to the previous refinement, we have applied a solvent masking procedure as implemented in OLEX2.³⁰ We have only left those acetone molecules having full occupancy (two intracapsular and three intercapsular molecules, no restraints) and masked the remaining solvent molecules (disordered). It resulted in a final $R_1 = 0.0757$, CCDC 971033.

Acknowledgements

We acknowledge the financial support of the Polish National Science Centre (AS grant N N204 187839) and the Academy of Finland (KR, grant no. 265328 and 263256). The interdisciplinary cooperation was supported by the Polish Science Foundation (Mentoring programme, 59/U/SKILLS/2013). We would also like to thank Dr. Oleksandr Shkurenko for independent attempts to solve the structure by direct and dual space methods and Dr. Sarah Perry for worthwhile discussions and valuable suggestions.

Notes and references

- G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.*, 1990, **46**, 467.
- M. Jaskolski, in *High resolution macromolecular crystallography. In: Advancing Methods for Biomolecular Crystallography*, ed. R. Read, A. G. Urzhumtsev and V. Y. Lunin, Springer, 2013.
- H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov and P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.*, 2000, **28**, 235–42.
- T. Y. Teng, *J. Appl. Crystallogr.*, 1990, **23**, 387.
- A. Schmidt, M. Teeter, E. Weckert and V. S. Lamzin, *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 2011, **67**, 424.
- K. Brzezinski, A. Brzuszkiewicz, M. Dauter, M. Kubicki, M. Jaskolski and Z. Dauter, *Nucleic Acids Res.*, 2011, **39**, 6238.
- G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.*, 2008, **64**, 112.
- M. C. Burla, R. Caliandro, M. Camalli, B. Carrozzini, G. L. Cascarano, C. Giacovazzo, M. Mallamo, A. Mazzone, G. Polidori and R. Spagna, *J. Appl. Crystallogr.*, 2012, **45**, 357.
- K. Mandal, B. L. Pentelute, V. Tereshko, V. Thammavongsa, O. Schneewind, A. A. Kossiakoff and S. B. H. Kent, *Protein Sci.*, 2009, **18**, 1146.
- K. Mandal, B. L. Pentelute, V. Tereshko, A. A. Kossiakoff and S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 1362.
- J.-P. Collin, F. Durolo, J. Frey, V. Heitz, F. Reviriego, J.-P. Sauvage, Y. Trolez and K. Rissanen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 6840.
- J. Rappleye, M. Innus, C. M. Weeks and R. Miller, *J. Appl. Crystallogr.*, 2002, **35**, 374.
- L. Palatinus and G. Chapuis, *J. Appl. Crystallogr.*, 2007, **40**, 786.
- E. M. H. Duke and L. N. Johnson, *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, 2010, **466**, 3421.
- M. Kudo, V. Maurizot, B. Kauffmann, A. Tanatani and I. Huc, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 9628; Y. Ferrand, A. M. Kendhale, B. Kauffmann, A. Grelard, C. Marie, V. Blot, M. Pipelier, D. Dubreuil and I. Huc, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 7858; D. Sanchez-Garcia, B. Kauffmann, T. Kawanami, H. Ihara, M. Takafuji, M. H. Delville and I. Huc, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 8642; E. Berni, B. Kauffmann, C. Y. Bao, J. Lefeuvre, D. M. Bassani and I. Huc, *Chem.-Eur. J.*, 2007, **13**, 8463; C. Y. Bao, Q. Gan, B. Kauffmann, H. Jiang and I. Huc, *Chem.-Eur. J.*, 2009, **15**, 11530; Y. Inokuma, S. Yoshioka, J. Ariyoshi, T. Arai, S. Matsunaga, K. Takada, K. Rissanen and M. Fujita, *Nature*, 2013, **495**, 461; P. Metrangolo, Y. Carcenac, M. Lahtinen, T. Pilati, K. Rissanen, A. Vij and G. Resnati, *Science*, 2009, **1461**; P. Mal, B. Breiner, K. Rissanen and J. R. Nitschke, *Science*, 2009, **1697**; J.-P. Collin, S. Durot, M. Keller, J.-P. Sauvage, Y. Trolez, M. Cetina and K. Rissanen, *Chem.-Eur. J.*, 2011, **17**, 947; J.-F. Ayme, J. E. Beves, D. A. Leigh, R. T. McBurney, K. T. Rissanen and D. Schultz, *Nat. Chem.*, 2012, **4**, 15; W. Jiang, K. Nowosinski, E. V. Dzyuba, F. Klautzsch, A. Schäfer, J. Huuskonen, K. Rissanen, N. Löw and C. A. Schalley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 1860; K. Raatikainen and K. Rissanen, *Chem. Sci.*, 2012, **2**, 1235.
- B. Kuberski and A. Szumna, *Chem. Commun.*, 2009, 1959.
- A. Szumna, *Chem. Commun.*, 2009, 4191.
- A. Szumna, *Chem.-Eur. J.*, 2009, **15**, 12381.
- M. Wierzbicki and A. Szumna, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 3860.
- F. H. Allen, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, 2002, **58**, 380.
- L. C. Storoni, A. J. McCoy and R. J. Read, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2004, **60**, 432.
- A. J. McCoy, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2007, **63**, 32.
- J. Sliwiak, M. Jaskolski, Z. Dauter, A. J. McCoy and R. J. Read, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2014, **70**, 471.
- A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni and R. J. Read, *J. Appl. Crystallogr.*, 2007, **40**, 658.
- M. Jaskolski, M. Li, G. Laco, A. Gustchina and A. Wlodawer, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2006, **62**, 208.



- 26 L. C. James, P. C. Jones, A. J. McCoy, G. A. Tennent, M. B. Pepys, K. Famm and G. Winter, *J. Mol. Biol.*, 2007, **367**, 603.
- 27 D. D. Rodríguez, C. Grosse, S. Himmel, C. González, I. M. de Ilarduya, S. Becker, G. M. Sheldrick and I. Usón, *Nat. Methods*, 2009, **6**, 651.
- 28 P. T. Beurskens, G. Beurskens, R. de Gelder, S. Garcia-Granda, R. O. Gould and J. M. M. Smits, The DIRDIF2008 program system, *Crystallography Laboratory*, 2008, University of Nijmegen, The Netherlands.
- 29 B. Kuberski, M. Pecul and A. Szumna, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, 3069.
- 30 O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard and H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.*, 2009, **42**, 339.
- 31 L. J. Barbour, *J. Supramol. Chem.*, 2001, **1**, 189.
- 32 P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott and K. Cowtan, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2010, **66**, 486.
- 33 F. Macrae, I. J. Bruno, J. A. Chisholm, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. van de Streek and P. A. Wood, *J. Appl. Crystallogr.*, 2008, **41**, 466.



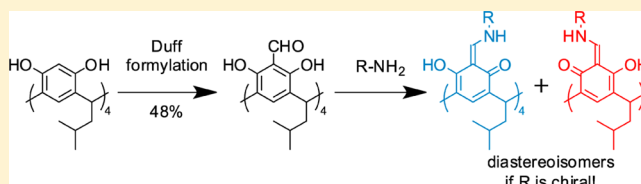
Inherently Chiral Iminoresorcinarenes through Regioselective Unidirectional Tautomerization

Marcin Grajda, Michał Wierzbicki, Piotr Cmoch, and Agnieszka Szumna*

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

S Supporting Information

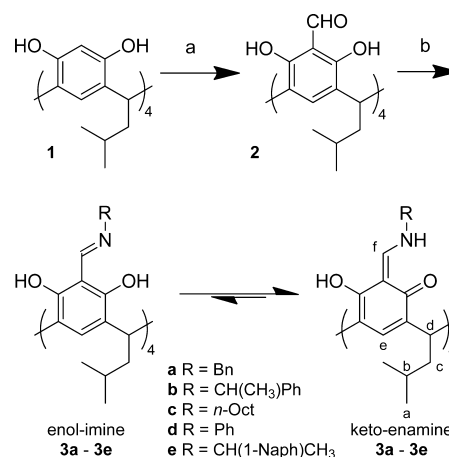
ABSTRACT: Tetraformylresorcin[4]arene is obtained in 48% yield via a chromatography-free Duff reaction. The formylated resorcinarene reacts easily with primary aliphatic and aromatic amines. The resulting imines exist exclusively in keto-enamine forms. Owing to a system of intramolecular hydrogen bonds, the reaction selectively leads to regioisomers with C_4 symmetry. They possess an inherent chirality due to a propeller-like skeleton. For chiral amines, inherently chiral diastereoisomers are observed.



Cavity-containing supramolecular structures have found numerous applications as sensors,¹ components of sorption materials,² supramolecular catalysts,³ and reaction nanovessels.^{4,5} Such structures are often large and highly ordered. The number of bonds that have to be formed during their synthesis and the proper spatial arrangement requires unusual precision that is rarely achievable in kinetically driven processes. Therefore, an approach based on reversible reactions is more effective. It facilitates postsynthetic error corrections and allows the most thermodynamically stable structure to be selected and amplified. For the synthesis of large, cavity-containing structures, reversibility of the formation of coordination bonds^{6–9} or imine bonds^{10–12} has proven to be highly beneficial. We envisioned that tetraformylresorcin[4]arene **2**, possessing free OH groups, would be an important intermediate for the construction of supramolecular assemblies based on imine-forming reactions. The new features were expected to come from the ability of the phenolic hydroxyl group to participate in hydrogen bonding and tautomeric equilibrium (keto–enol). This may introduce directionality and cause the formation of chiral propeller-like structures. In this paper, we describe the first successful synthesis of tetraformylresorcin[4]arene **2** (unknown thus far, Scheme 1). We also prove its great potential in the formation of a new type of inherently chiral cavity-containing compounds¹³ based on regioselective formation of keto–enol tautomers. Additionally, we show that such derivatives can be efficiently formed by chiral self-sorting.

Introduction of formyl functionalities into a preformed macrocyclic skeleton is often problematic. Reactions that work nicely on simple analogues do not transfer easily into macrocyclic scaffolds. For example, the very simple supramolecular building block tetraformylresorcin[4]arene **2** has not been known until now (Scheme 1). Although the synthesis of its *O*-alkylated analogue was previously reported^{14–19} using tetrabromo-*O*-alkylated resorcinarene, BuLi, and DMF (or *N*-formylmorpholine), a similar procedure cannot be applied to obtain **2**. Numerous attempts have been made by many

Scheme 1. Formylation of Resorcin[4]arene and the Formation of Imines^a



^aReaction conditions: (a) HMTA, TFA, see Table 1; (b) R-NH₂, CHCl₃.

research groups to directly formylate resorcin[4]arene **1** using other methods. The classical Reimer–Tiemann reaction (CHCl₃/KOH) was used with different substrate/reagents ratios but failed for various resorcinarenes.^{20,21} Under Gross–Rieche conditions (SnCl₄, Cl₂CHOCH₃) mono- and diformylation products were obtained in low yield (highest yield for diformylated product was 13% using 65 equiv of a formylating agent).^{20,22} The Duff reaction under classical conditions (HMTA, AcOH) did not give product **2** in our hands. In 2012, Mendoza and co-workers reported on the beneficial application of microwaves in the Duff formylation of calix[4]- and calix[5]arenes in TFA.²³ We applied this microwave method to resorcin[4]arene **1** and obtained tetrasubstituted

Received: August 29, 2013

Published: October 22, 2013

product **2** in 42% yield (Table 1, entry 1). Optimization of the reaction conditions allowed for the substantial reduction the

Table 1. Synthesis of 2 (Scheme 1)

entry	C(1) (mM)	C(HMTA) (mM)	temp (°C)	time (h)	yield (%)
1	0.03	1.14	120 (MW) ^a	1	42
2	0.16	1.14	120 (MW) ^a	1	48
3	0.15	1.14	100 (MW) ^a	1	21
4	0.16	1.14	150 (MW) ^a	1	23
5	0.16	1.14	120 ^a	1	44
6	0.16	1.14	120 ^a	24	38
7	0.16	1.14	72	1	2
8	0.16	1.14	72	24	34

^aReaction in a sealed pressure vial, MW = microwave conditions.

amount of TFA and HMTA (Table 1, entry 2). Additionally, we tested microwave-free conditions at the same temperature (reaction in a sealed pressure vial). The product was obtained in 44% yield (entry 5). This result indicates that the microwave heating is not mandatory for effective formylation. However, under normal pressure and reflux conditions, the yield of **2** was lower even for longer reaction times (entries 7 and 8). An important feature of the developed synthetic procedure for synthesis of **2** is a simple, precipitation-based isolation method that allows for easy scale-up and therefore is highly beneficial for future applications of **2** as a building block.

The ¹H NMR spectrum of **2** in CDCl₃ reflects the C₄ symmetry of the molecule. The signal for a formyl group is observed at 10.3 ppm, and two separate OH signals appear at 8.4 and 13.1 ppm (at rt, Supporting Information). Such a large difference between OH groups indicates a system of two different intramolecular hydrogen bonds.^{24,25} We assume that the low-field signal (13.1 ppm) comes from an OH group involved in hydrogen bonding with a carbonyl oxygen atom (stronger acceptor, better geometry), while the higher field signal (8.4 ppm) is for an OH group engaged in hydrogen bonding between neighboring phenolic rings. Interestingly, strong hydrogen bonding also leads to separation of signals for the aromatic carbon (six signals are present; see the Supporting Information). In a more polar solvent (DMSO-*d*₆), only one signal for the OH groups and four signals for the aromatic carbon atoms are present, indicative of fast exchange between the two forms (Supporting Information). The IR spectrum of **2** shows an intense absorption at 1639 cm⁻¹, characteristic of an aldehyde (Supporting Information).

Reaction of **2** with primary amines may lead to a variety of products due to the large number of possible regioisomers (or even atropoisomers) and also due to possible keto-enamine and enol-imine tautomers. On the basis of literature examples, it is not straightforward to predict the enol-imine versus keto-enamine equilibrium for resorcin[4]arene. Simple monosubstituted *N*-salicylideneanilines exist predominately in enol-imine forms.^{26,27} Stable keto-enamine forms are observed for triimines of 2,4,6-triformylphloroglucinol (mixtures of regioisomers)²⁸ and diimines of 3,6-diformylcatechol.²⁹ However, to the best of our knowledge there are no examples of monoimines of 2-formylresorcinol. For previously reported mono- and diformylresorcin[4]arenes the conclusions were equivocal.²⁰

We tested the reactivity of **2** toward various amines including aliphatic primary, secondary, and aromatic amines. For primary

amines (both aliphatic and aromatic), the imine formation reactions proceeded smoothly without any catalyst in CHCl₃. All imine derivatives **3a–e** have simple NMR spectra (Figure 1). It indicates that the products exist in a highly symmetrical,

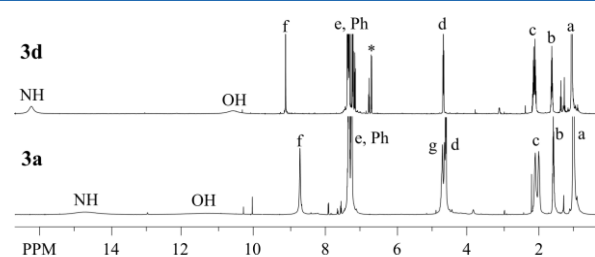


Figure 1. ¹H NMR spectra of **3a** and **3d** (CDCl₃, 600 MHz). The asterisk denotes residual aniline; for atom numbering, see Scheme 1; g, NCH₂Ph protons.

single tautomeric forms. The number of ¹H and ¹³C signals indicates that all arms are equivalent. In all cases, there are six different signals for carbon atoms of the resorcinol rings with one highly shifted toward low field (at approximately 168 ppm). The 2D COSY spectrum of **3a** detected coupling between NH protons and f as well as g protons (Figure 2a).

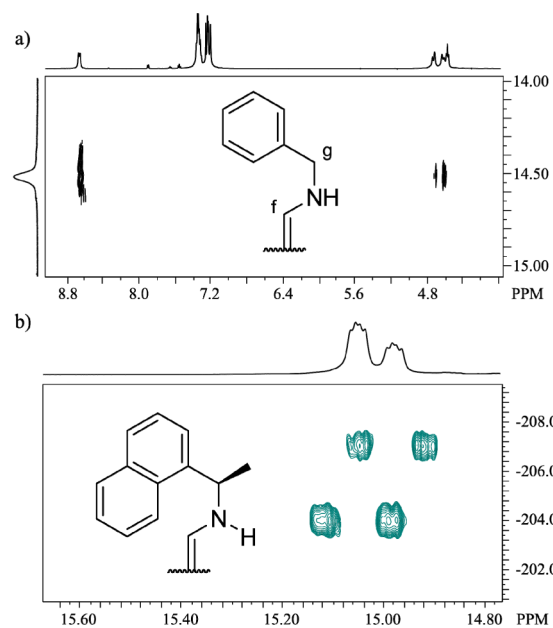


Figure 2. (a) Fragment of the ¹H–¹H COSY spectrum of **3a** (–25 °C) revealing the coupling between the NH proton and g and f protons; (b) ¹H–¹⁵N HSQC spectrum of **3e** (–45 °C).

The spectra suggest exclusive (within the NMR detection limit) formation of keto-enamine tautomers. Additionally, the existence of **3a–e** in keto-enamine forms was confirmed using ¹H–¹⁵N g-HMBC and HSQC experiments. In the spectra, the ¹⁵N signals were observed at –204.6 and –201.8 ppm for **3b** and –184.2 ppm for **3d**. The nitrogen signals for **3e** were observed at –206.8 and –203.7 ppm. For enol-imines, ¹⁵N signals are typically observed at –60 to –90 ppm.³⁰ For keto-enamines, ¹⁵N signals are shifted and usually observed at –150 to –200 ppm.³¹ The ¹H–¹⁵N HSQC spectra of **3b** and **3e** confirmed that the proton resides at the nitrogen atom (with

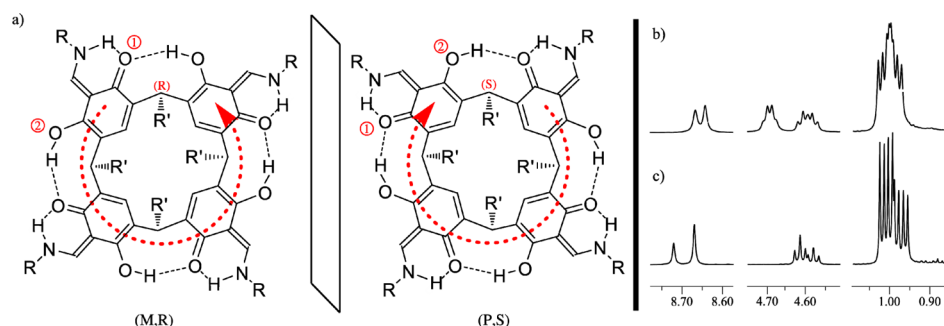


Figure 3. Inherently chiral forms of the keto-enamine tautomers of **3a–e** (a) (R groups according to Scheme 1, R' denotes isobutyl). Fragments of ^1H NMR spectra of **3b** (b) and **3e** (c) showing the ratio of diastereoisomers (CDCl_3 , 600 MHz).

a typical coupling constants for a single bond of 70 Hz, Figure 2b).

The number of signals in the NMR spectra suggest that keto-enamines **3a–e** have C_4 symmetry, indicating that all double bonds are formed highly regioselectively (Figure 3). The stabilization of this high-symmetry structure comes from the system of eight intramolecular hydrogen bonds (Figure 3). Indeed, in the solution both labile protons are highly shifted toward lower field (ca. 15 ppm and 13 ppm for NH and OH, respectively). The X-ray structure of **3a** also confirms the highly regioselective formation of the C_4 symmetric keto-enamine form (Figure 4 and Figure S34, Supporting Information). The

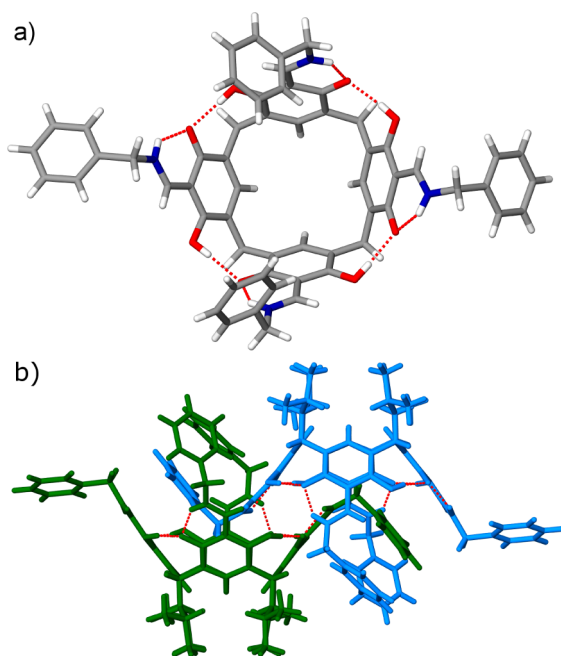


Figure 4. X-ray structure of keto-enamine **3a**: (a) top view (lower rim alkyl chains and solvent molecules were removed for clarity); (b) formation of a noncovalent dimer in the crystal lattice.

structure shows a systematic variation of bond lengths involving the whole keto-enamine fragment (Figure S35, Supporting Information). For example, all of the postulated $\text{C}=\text{O}$ double bonds were found in the range of 1.298–1.310 Å, while all the postulated $\text{C}-\text{OH}$ bonds were found in the range of 1.354–1.358 Å. Additionally, the system of hydrogen bonds (based on distances between non-hydrogen atoms) is also in agreement with the suggested structure.

The C_4 symmetry of a keto-enamine form implies that the whole molecule is propeller-shaped. This feature for cavity-containing molecules is known as inherent chirality.²⁵ Even without any additional stereogenic centers the molecule is chiral (although racemic for achiral amines). An additional stereogenic center, for example, coming from the amine part, should cause formation of diastereoisomers that can be detected using NMR. In order to prove this, we used chiral (*R*)-1-phenylethylamine. In the ^1H and ^{13}C NMR spectra we observed a double set of signals as compared with achiral analogues. All signals were assigned using 2D NMR spectra and are consistent with formation of two diastereoisomers of **3b** at 45:55 ratio. Using a more bulky amine, (*R*)-2-naphthylethylamine, diastereomeric induction is higher (dr 62:38 for **3e**). The 2D ROESY spectrum of **3b** showed no correlation between the two sets of signals. It confirmed that the signals do not come from a single less-symmetrical form (e.g., C_2 symmetrical). In order to find the possible chemical exchange between two diastereoisomers, EXSY experiments were performed using long mixing times (upper limit for EXSY experiments is set by relaxation time T_1 , in this case $T_1 = 1.4$ s). No exchange was detected in this experiment. This result indicates that the diastereomeric C_4 symmetrical structures do not undergo exchange on the NMR time scale, meaning that the configuration of keto-enamines is quite stable. However, all attempts to separate diastereoisomers by chromatographic methods have been unsuccessful thus far.

A unique property of a dynamical system is the ability of self-sorting. This property allows for selective formation of thermodynamically favored structures even from complex mixtures of reagents. We have tested the chiral self-sorting abilities by application of racemic mixtures of chiral amines. For (*R,S*)-1-phenylethylamine the resulting mixture consisted of randomly substituted keto-enamines. However, for (*R,S*)-2-naphthylethylamine, the resulting mixture was identical to the one obtained for a single enantiomer (both ^1H and ^{13}C NMR, see the Supporting Information). These results indicate that the system is capable of very efficient self-sorting. Homochiral structures of C_4 symmetry are thermodynamically preferred. The plausible explanation of such preferences involves combination of three elements: (a) unidirectional system of hydrogen bonds; (b) regioselectivity of a keto-enamine form; and (c) bulky naphthyl substituents that can be conveniently arranged only in a propeller-like manner.

Application of secondary amines (e.g., diethylamine) in the reaction with **2** led to complicated mixtures of products. Although the enamine form is the only possible form for secondary amines, the products lack stabilization via hydrogen

bonding. Additionally, test experiments with 2-formyl-4,6-*tert*-butylresorcinol³² led to the formation of a mixture of decomposition products. These experiments indicate that stabilization by a system of hydrogen bonds is indispensable for tautomeric equilibrium and regioselectivity of the imine forming reaction.

In conclusion, we have applied a very simple, chromatography-free procedure for formylation of resorcin[4]arene **1**. This new building block is effective in regioselective formation of highly symmetrical imines. The imines of *O*-unprotected resorcin[4]arene exist in keto-enamine forms. These features have led to the formation of a new type of inherently chiral cavity-containing compounds due to regioselective unidirectional tautomerization. We predict that the resulting keto-enamine resorcin[4]arenes have greatly expanded cavities as compared to the parent resorcin[4]arenes due to coplanar arrangement of keto-enamine fragments. They also have modulated electronic properties as a result of the phenol rings existing in keto forms. Additionally, we have shown that the unidirectional pattern of keto-enamine groups have a great potential to drive the homochiral self-sorting. This ability opens up new possibilities into the construction of chiral cavitands and capsules in a dynamical way.

EXPERIMENTAL SECTION

Tetraformylresorcin[4]arene (2). Resorcin[4]arene (**1**) (0.606 g, 0.8 mmol) and urotropine (0.8 g, 5.7 mmol) were put in a 10 mL pressure vial. TFA (5 mL) was added, and the vial was shaken vigorously until the substrates were dispersed in the liquid. The vial was then put in a microwave reactor (CEM Discover SP with an infrared temperature sensor), heated to 120 °C with stirring for 1 h. The resulting dark solution was poured into a flask containing chloroform (25 mL) and aqueous HCl (25 mL, 1 M). The mixture was stirred vigorously overnight. The organic phase was separated, and the aqueous phase was washed with CHCl₃ several times (100 mL totally). The combined chloroform extracts were dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to dryness. The resulting crude precipitate was washed with acetone (50 mL), filtered off, and vacuum-dried to afford 0.315 g of the yellow product (48%). Mp: 267 °C dec. ¹H NMR (DMSO-*d*₆/400 MHz): δ 10.89 (bs, 8H), 10.13 (s, 4H), 7.28 (s, 4H), 4.68 (t, 4H), 1.79 (t, 8H), 1.37 (m, 4H), 0.89 (d, 24H). ¹H NMR (CDCl₃/500 MHz): δ 13.14 (bs, 4H), 10.30 (bs, 4H), 8.35 (bs, 4H), 7.38 (bs, 4H), 4.48 (bt, 4H), 2.05 (bq, 8H), 1.46 (bm, 4H), 1.01 (bd, 24H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆/100 MHz): δ 196.0, 157.4, 135.9, 123.5, 111.3, 44.1, 31.3, 26.3, 23.4. ¹³C NMR (CDCl₃/125 MHz): δ 207.0, 195.8, 156.4, 155.9, 131.8, 123.6, 123.1, 110.6, 41.8, 30.9, 29.4, 26.1, 22.7. Anal. Calcd for C₄₈H₅₆O₁₂(CHCl₃)_n (chloroform also found in NMR spectra) (*n* = 1.17): C, 61.07; H, 5.50; Cl, 12.28. Found: C, 61.31; H, 5.99; Cl, 12.75. HRMS (ESI-TOF): calcd *m/z* for C₄₈H₅₆O₁₂Na⁺ [M + Na]⁺ 847.3669, found 847.3652.

Formation of Imines 3a–e: General Procedure. Tetraformylresorcinarene **2** (0.05 mmol, 41 mg) was put in a 2 mL pressure tube along with chloroform (2 mL). Amine (0.2 mmol) was then added with a syringe, the tube was sealed, and the solution was stirred. In a matter of minutes after the addition of the amine, the solution turned red and homogeneous. The solution was stirred overnight and evaporated to dryness. The resulting precipitate was vacuum-dried to afford the product (95–98% yield).

Imine (3a). ¹H NMR (CDCl₃/400 MHz): δ 14.84 (bs, 4H), 11.57 (bs, 4H), 8.68 (s, 4H), 7.40–7.20 (bm, 24H), 4.66 (bdd, 8H), 4.58 (bt, 4H), 2.08 (bm, 4H), 1.96 (bm, 4H), 1.56 (bm, 4H), 0.99 (bt, 24H). ¹³C NMR (CDCl₃/100 MHz): δ 170.9, 163.0, 155.0, 136.1, 131.7, 129.2, 128.6, 128.4, 127.8, 117.7, 105.5, 56.2, 41.2, 30.7, 26.4, 23.5, 23.0. HRMS (ESI-TOF): calcd *m/z* for C₇₆H₈₅N₄O₈⁺ [M + H]⁺ 1181.6367, found 1181.6375.

Imine (3b). ¹H NMR (CDCl₃/600 MHz), mixture of diastereoisomers (most signals overlapping): δ 15.15 (bs, 8H), 11.53 (bs,

4H), 11.40 (bs, 4H), 8.67 (bs, 4H), 8.64 (bs, 4H), 7.40–7.15 (bm, 48H), 4.69 (bq, 8H), 4.59 (bm, 8H), 2.08 (bm, 8H), 1.96 (bm, 8H), 1.66 (bd, 24H), 1.57 (bm, 16H), 1.00 (bm, 48H). ¹³C NMR (CDCl₃/100 MHz), mixture of diastereoisomers: δ 170.5, 170.0, 161.3, 161.2, 155.1, 154.9, 141.9, 141.7, 131.6, 131.3, 129.2, 129.1, 128.5, 128.3, 128.2, 127.9, 126.6, 126.3, 118.0, 117.9, 107.5, 107.4, 61.8, 61.3, 41.2, 41.1, 30.71, 30.68, 26.45, 26.41, 23.6, 23.48, 23.46, 23.05, 23.02. HRMS (ESI-TOF): calcd *m/z* for C₈₀H₉₃N₄O₈⁺ [M + H]⁺ 1237.6993, found 1237.6998.

Imine (3c). ¹H NMR (CDCl₃/400 MHz): δ 14.34 (bs, 4H), 12.03 (bs, 4H), 8.51 (bs, 4H), 7.18 (bs, 4H), 4.59 (bt, 4H), 3.38 (bm, 8H), 2.06 (bm, 4H), 1.95 (bm, 4H), 1.56 (bm, 12H), 1.23 (bm, 48H), 0.99 (bt, 24H), 0.86 (bm, 12H). ¹³C NMR (CDCl₃/100 MHz): δ 172.4, 162.4, 155.2, 131.8, 129.0, 117.1, 107.2, 51.7, 41.1, 32.0, 30.8, 30.5, 29.4, 29.3, 26.8, 26.4, 23.5, 23.1, 22.9, 14.3. HRMS (ESI-TOF): calcd *m/z* for C₈₀H₁₂₅N₄O₈⁺ [M + H]⁺ 1269.9497, found 1269.9517.

Imine (3d). ¹H NMR (CDCl₃/600 MHz): δ 16.28 (bs, 4H), 10.59 (bs, 4H), 9.11 (bs, 4H), 7.40–7.30 (20H), 7.21 (bt, 4H), 4.67 (t, 4H), 2.11 (m, 8H), 1.62 (m, 4H), 1.06 (bt, 24H). ¹³C NMR (CDCl₃/150 MHz): δ 166.2, 157.2, 154.6, 142.6, 130.9, 129.6, 127.0, 126.9, 120.2, 119.6, 108.4, 41.3, 30.4, 26.2, 23.1, 22.8. HRMS (ESI-TOF): calcd *m/z* for C₇₂H₇₇N₄O₈⁺ [M + H]⁺ 1125.5741, found 1125.5747.

Imine (3e). ¹H NMR (CDCl₃/600 MHz), mixture of diastereoisomers: A δ 15.41 (bs, 4H), 11.41 (bs, 4H), 8.72 (bs, 4H), 7.99 (bd, 4H), 7.88 (bd, 4H), 7.80 (bd, 4H), 7.23 (bs, 1H), 5.52 (bq, 4H), 4.58 (bt, 4H), 2.06 (bm, 4H), 1.95 (bm, 4H), 1.80 (bd, 12H), 1.54 (bm, 4H), 0.97 (bdd, 24H); B δ 15.41 (bs, 4H), 11.59 (bs, 4H), 8.67 (bs, 4H), 7.92 (bd, 4H), 7.76 (bd, 4H), 7.40 (bt, 4H), 7.27 (bd, 4H), 7.21 (bs, 4H), 7.04 (bt, 4H), 5.45 (bq, 4H), 4.61 (bt, 4H), 2.08 (bm, 4H), 1.98 (bm, 4H), 1.75 (bd, 12H), 1.58 (bm, 4H), 1.01 (bdd, 24H). Overlapping aromatic signals in the range from 7.56 to 7.44 ppm. Their integration is consistent with four aromatic protons of A and two of B. The integration of the corresponding signals for A and B is in the ratio of A/B = 1: 1.4. ¹³C NMR (CDCl₃/150 MHz), mixture of diastereoisomers: δ 170.3, 169.7, 161.2, 154.9, 154.7, 137.7, 137.2, 133.9, 133.8, 131.4, 131.1, 130.1, 129.8, 129.2, 129.0, 128.6, 128.2, 128.1, 126.7, 126.6, 125.83, 125.75, 125.63, 125.45, 123.7, 123.3, 122.4, 117.9, 117.7, 107.5, 107.4, 57.63, 57.58, 41.0, 40.9, 30.51, 30.46, 26.2, 23.22, 23.20, 23.19, 22.9, 22.82, 22.79. HRMS (ESI-TOF): calcd *m/z* for C₉₆H₁₀₁N₄O₈⁺ [M + H]⁺ 1437.7619, found 1437.7617.

Crystal data for 3a: C_{95.50}H₁₁₀N₄O₉ (3a × EtOH × (toluene)_{2.5}), *M* = 1457.88, orange prism, 0.35 × 0.21 × 0.14 mm³, triclinic, space group *P*-1 (No. 2), *a* = 15.3492(3) Å, *b* = 15.6210(4) Å, *c* = 17.0234(2) Å, α = 89.136(2)°, β = 80.277(2)°, γ = 86.364(2)°, *V* = 4014.93(14) Å³, *Z* = 2, *D*_c = 1.206 g/cm³, *F*₀₀₀ = 1566, *Cu Kα* radiation, λ = 1.5418 Å, *T* = 100.01(10) K, 2θ_{max} = 143.2°, 63014 reflections collected, 15485 unique (*R*_{int} = 0.0608). Final GooF = 1.010, *R*₁ = 0.0840, *wR*₂ = 0.2447, *R* indices based on 13942 reflections with *I* > 2σ(*I*) (refinement on *F*²), 942 parameters, 26 restraints. Lp and absorption corrections applied, μ = 0.602 mm⁻¹. CCDC 965647 contains the supplementary crystallographic data for this paper. This data can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

NMR and MS spectra for enamines **3a–e**; ECD spectra for **3b** and **3e**; UV spectrum for **3b**; crystal structure for **3a**; NMR, MS, and IR spectra for **2**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: agnieszka.szumna@icho.edu.pl.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the financial support of the National Science Centre (Grant No. N N204 187839). We thank prof. D. T. Gryko for providing 2-formyl-4,6-di-*tert*-butylresorcinol.

■ REFERENCES

- (1) Castellano, R. K.; Craig, S. L.; Nuckolls, C.; Rebek, J., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7876.
- (2) Dalgarno, S. J.; Thallapally, P. K.; Barbour, L. J.; Atwood, J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 236.
- (3) Hastings, C. J.; Pluth, M. D.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6938.
- (4) Yoshizawa, M.; Klosterman, J. K.; Fujita, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 3418.
- (5) Koblenz, T. S.; Wassenaar, J.; Reek, J. N. H. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 247.
- (6) Smulders, M. M. J.; Riddell, I. A.; Browne, C.; Nitschke, J. R. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 1728.
- (7) Sun, W. Y.; Yoshizawa, M.; Kusukawa, T.; Fujita, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 757.
- (8) Caulder, D. L.; Raymond, K. N. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 975.
- (9) Dalgarno, S. J.; Power, N. P.; Atwood, J. L. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 825.
- (10) Liu, X.; Liu, Y.; Li, G.; Warmuth, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 901.
- (11) Skowronek, P.; Warzajtis, B.; Rychlewska, U.; Gawroński, J. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2524.
- (12) Skowronek, P.; Gawroński, J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4755.
- (13) Szumna, A. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4274.
- (14) Lin, Z.; Sun, J.; Efremovska, B.; Warmuth, R. *Chem.—Eur. J.* **2012**, *18*, 12864.
- (15) Liu, X.; Sun, J.; Warmuth, R. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 7303.
- (16) Aakeröy, C. B.; Chopade, P. D. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1.
- (17) Nakazawa, J.; Mizuki, M.; Hagiwara, J.; Shimazaki, Y.; Tani, F.; Naruta, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, *79*, 1431.
- (18) Mendoza, S.; Davidov, P. D.; Kaifer, A. E. *Chem.—Eur. J.* **1998**, *4*, 864.
- (19) Quan, M. L. C.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2754.
- (20) Pappalardo, A.; Amato, M. E.; Ballistreri, F. P.; Notti, A.; Tomaselli, G. A.; Toscano, R. M.; Sfrazzetto, G. T. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 7150.
- (21) Our own results.
- (22) Ballistreri, F. P.; Pappalardo, A.; Tomaselli, G. A.; Vittorino, E.; Sortino, S.; Sfrazzetto, G. T. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2828.
- (23) Pasquale, S.; Sattin, S.; Escudero-Adan, E. C.; Martinez-Belmonte, M.; de Mendoza, J. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 785.
- (24) Kuberski, B.; Pecul, M.; Szumna, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3069.
- (25) Szumna, A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1358.
- (26) Ogawa, K.; Kasahara, Y.; Ohtani, Y.; Harada, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7107.
- (27) Makal, A.; Schilf, W.; Kamiński, B.; Szady-Chelmieniecka, A.; Grech, E.; Wozniak, K. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 421.
- (28) Chong, J. H.; Sauer, M.; Patrick, B. O.; MacLachlan, M. J. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3823.
- (29) Gallant, A. J.; Yun, M.; Sauer, M.; Yeung, C. S.; MacLachlan, M. J. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4827.
- (30) Gawinecki, R.; Kuczek, A.; Kolehmainen, E.; Osmialowski, B.; Krygowski, T. M.; Kauppinen, R. J. *Org. Chem.* **2007**, *72*, 5598.
- (31) Kamiński, B.; Schilf, W.; Dziembowska, T.; Rozwadowski, Z.; Szady-Chelmieniecka, A. *Solid State NMR* **2000**, *16*, 285.
- (32) Skonieczny, K.; Charalambidis, G.; Tasiór, M.; Krzeszewski, M.; Kalkan-Burat, A.; Coutsolelos, A. G.; Gryko, D. T. *Synthesis* **2012**, *44*, 3683.

Dynamic Formation of Hybrid Peptidic Capsules by Chiral Self-Sorting and Self-Assembly**

Hanna Jędrzejewska, Michał Wierzbicki, Piotr Cmoch, Kari Rissanen, and Agnieszka Szumna*

Abstract: Owing to their versatility and biocompatibility, peptide-based self-assembled structures constitute valuable targets for complex functional designs. It is now shown that artificial capsules based on β -barrel binding motifs can be obtained by means of dynamic covalent chemistry (DCC) and self-assembly. Short peptides (up to tetrapeptides) are reversibly attached to resorcinarene scaffolds. Peptidic capsules are thus selectively formed in either a heterochiral or a homochiral way by simultaneous and spontaneous processes, involving chiral sorting, tautomerization, diastereoselective induction of inherent chirality, and chiral self-assembly. Self-assembly is shown to direct the regioselectivity of reversible chemical reactions. It is also responsible for shifting the tautomeric equilibrium for one of the homochiral capsules. Two different tautomers (keto-enamine hemisphere and enol-imine hemisphere) are observed in this capsule, allowing the structure to adapt for self-assembly.

Self-sorting processes, which involve the formation of well-defined subsystems from mixtures containing many different components and facilitate the synthesis/organization of well-defined functional structures, are universal in Nature. In chemistry, the applicability of self-sorting is restricted by requirements of high relative thermodynamic stability of particular products and reversibility of their formation.^[1] In this regard, a combination of dynamic covalent chemistry (DCC), which exploits reversible chemical reactions,^[2] and self-assembly, which is able to provide substantial stabilization, has been recognized as a very useful method for designing a variety of synthetic self-sorting systems.

Peptides, with their natural tendency to form specific secondary structures and their capability to produce novel biocompatible materials,^[3] are valuable components of self-sorting mixtures that are driven by self-assembly.^[4] However,

short peptides remain challenging building blocks owing to their inherent flexibility, which makes precise complementarity between interacting molecules (required to keep the entropic costs of ordering as low as possible) difficult to achieve. Nevertheless, short peptides can still become structure-ordering and biocompatible fragments of self-sorting systems when their ordering is reinforced by interactions provided by additional groups. Examples of such hybrid designs have been illustrated by the groups of Otto^[5] and Ulijn.^[6] Among the possible peptide structural motifs, β -sheets are recognized as the most reliable secondary structure, and they are therefore predominately used in dynamic self-sorting systems, producing various fibrous structures.^[3e,6,7] The formation of discrete, well-defined peptidic structures, such as virus-like cages, is more demanding and usually requires either the use of larger protein motifs^[8] with oligomerization properties programmed by genetic methods^[9] or the binding of small chemical molecules^[10] or metal-mediated assembly.^[11] Although the construction of discrete self-assembled structures using short peptides has already been reported,^[12] their formation by means of dynamic covalent chemistry remains an unexplored area. Herein, we report the results of our efforts to create discrete capsules by self-assembly and self-sorting of short peptides at the macrocyclic scaffold.

Tetraformylresorcin[4]arene **1** was used as a macrocyclic scaffold as it possesses a proper vase-like shape and easily reacts with aliphatic and aromatic primary amines to form imines in a reversible process.^[13] It has been reported that the resulting imines quantitatively tautomerize to their keto-enamine forms (Scheme 1 a, b). Owing to the isomerism of the double bond and the inherent chirality of the bowl-shaped molecule, for an optically pure chiral amine, the formation of six different isomers is possible (Table S1). However, a network of intramolecular hydrogen bonds drives the equilibrium towards two diastereoisomers (with C_4 symmetry and either *M* or *P* inherent chirality, Scheme 1 b), albeit with very low diastereoselectivity.^[13]

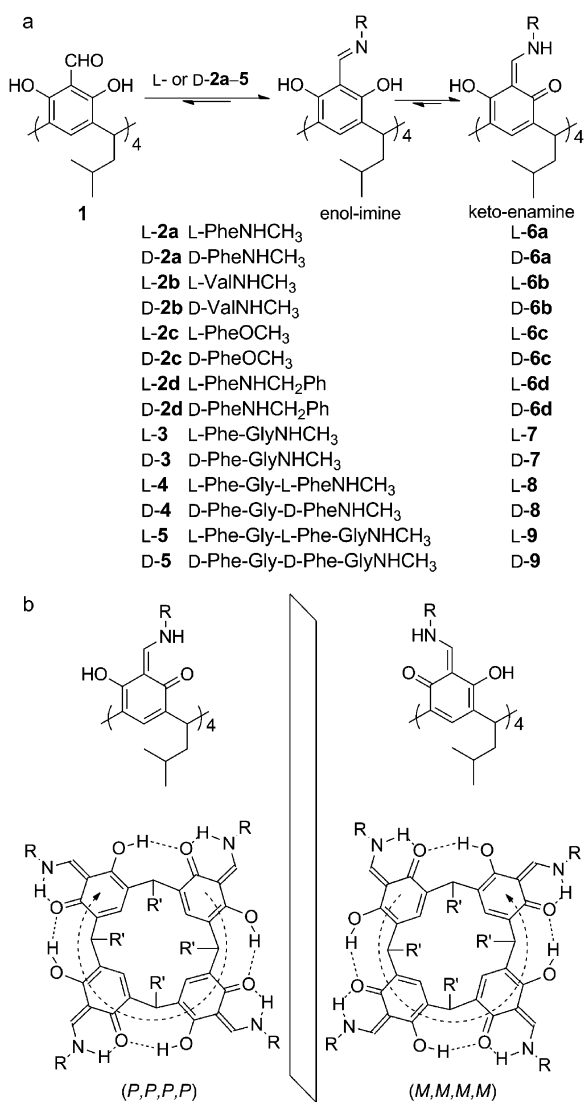
Currently, we used the short peptides **2a–5** containing L- or D-amino acids as the amine components of the imine forming reaction. Sequences with alternating hydrophobic (Phe) and hydrophilic (Gly) amino acids were chosen inspired by natural β -barrels. It should be noted that attempts have previously been made to construct self-assembled capsules based on peptides covalently attached to calixarene-type skeletons.^[14] Although many interesting applications have been reported for these products (e.g., effective cell transfection),^[15] self-assembly was only detected in rare cases and characterized by moderate association constants.^[12c] None of

[*] H. Jędrzejewska, M. Wierzbicki, Dr. P. Cmoch, Prof. A. Szumna
Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences
M. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw (Poland)
E-mail: agnieszka.szumna@icho.edu.pl

Prof. K. Rissanen
Department of Chemistry, Nanoscience Center
University of Jyväskylä
P.O. Box 35, FI-40014 (Finland)

[**] This work was supported by the Foundation for Polish Science (H.J. and A.S., POMOST/2011-4/10), the National Science Center (A.S. and P.C., 2013/09/B/ST5/01026), and the Wrocław Centre for Networking and Supercomputing (20299). We would also like to thank Dr. Oleksandr Shkurenko for independent attempts to measure the structures.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201407802>.



Scheme 1. a) Reversible imine formation with **1** and with various peptides and reversible tautomerization. b) C₄-symmetric diastereoisomers.

these systems has been shown to assemble in a dynamic covalent way.

The reaction of **1** with amino acid derivative L-2a, which contains a methylamide-functionalized C terminus, yielded a single diastereoisomer, namely L-6a (Scheme 1 a). Thus, the reaction proceeded with high regioselectivity and also high diastereoselectivity (*de* > 95%, based on NMR analysis). Upon mixing of L-6a with its enantiomer D-6a in CDCl₃, a new set of signals emerged in the NMR spectrum in addition to the original signals, indicating the formation of new, heterochiral species (Figure 1 b). In solution, they exhibited average S₈ symmetry with a substantially upfield-shifted amide NH signal. ROESY and DOSY spectra (see the Supporting Information, Figures S9 and S10, Table S2) indicate that the heterochiral species are capsular hydrogen-bonded dimers of the composition (L-6a)(D-6a) with *K*_{dim} ≈ 180 M⁻¹ (calculated from the NMR spectrum; Figure S8). X-ray analysis confirmed that the dimer (L-6a)(D-6a) had

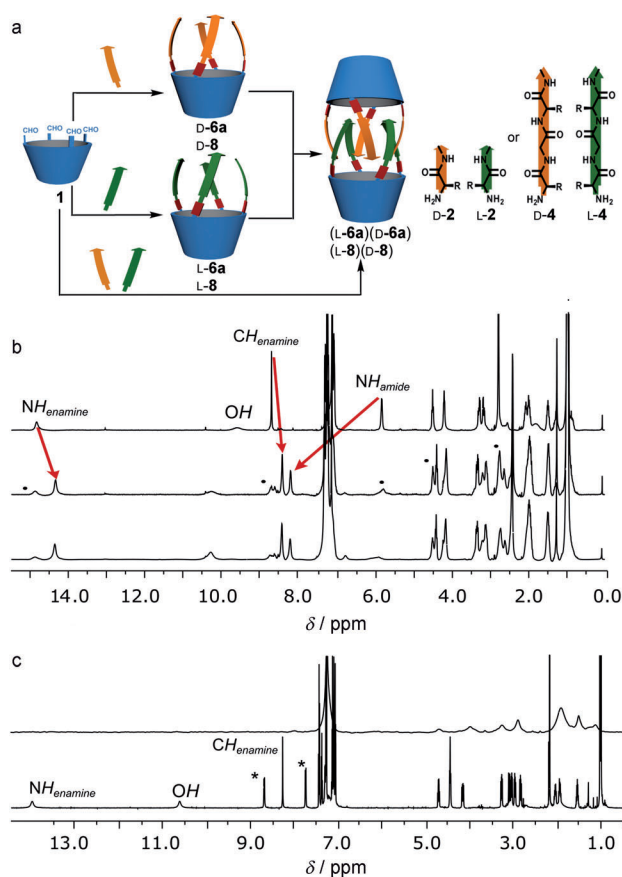


Figure 1. Heterochiral capsules obtained by self-sorting. a) Formation of capsules by self-assembly of pre-synthesized hemispheres (top) or by self-sorting (bottom). b) ¹H NMR spectra of L-6a (top), a mixture containing L-6a and D-6a (middle), and of the reaction mixture of the self-sorting process leading to (L-6a)(D-6a) (bottom). ●: Peaks that are due to the non-associated hemisphere. Spectra recorded in CDCl₃ at 298 K and 400 MHz. c) ¹H NMR spectra of L-8 (top) and of the reaction mixture of the self-sorting process leading to (L-8)(D-8) (bottom). Spectra recorded in CDCl₃ at 298 K and 600 MHz. *: -NH_{amide}.

been formed by interdigitation of the peptide backbones and was sealed by a seam of hydrogen bonds (Figure 3 a) as also postulated for the species in solution. In the solid state, the seam of hydrogen bonds is partially disturbed by the protruding guest molecules (toluene).

To explore the self-sorting ability, we carried out a one-pot reaction between **1** and a racemic mixture of L-2a and D-2a (Figure 1 a). It should be noted that the statistical yield of heterodimer (L-6a)(D-6a) was expected to be (2/2⁸) × 100% ≈ 0.78%. However, in this case, the reaction gave a mixture that was identical to that obtained in the self-assembly experiment (as demonstrated by the identical ¹H and ¹³C NMR spectra, Figure 1 b and Figure S7), indicating social chiral self-sorting (“non-self”, i.e., occurring between different species).^[1b] To confirm that this chiral self-sorting process was driven by self-assembly, control experiments were carried out with amino acid derivatives **2c** or **2d**, which, upon reaction with **1**, gave products incapable of self-assembling. In both cases, complicated product mixtures

were obtained, indicating that no chiral sorting had occurred in the absence of self-assembly (Figure S17 and S18). Additional control experiments were also performed to demonstrate the reversibility of the imine formation reactions (scrambling experiments, Figure S19).

In the case of dipeptides **L-3** and **D-3**, the reaction of **1** with either enantiomerically pure **L-3** or with a racemic mixture of **L-3** and **D-3** led to products having identical NMR spectra (Figure 2a, b, Figures S22, S23). 2D NMR spectra indicated that capsular homochiral self-assembled dimers were formed exclusively in both reactions [i.e., (**L-7**)(**L-7'**) for enantiomerically pure **L-3**]. Therefore, the reaction proceeded with complete chiral narcissistic self-sorting (“self”,

occurring between the same species)^[1b] and with a high dimerization constant as no monomeric products were detected. Even though the two hemispheres of dimer (**L-7**)(**L-7'**) were chemically equivalent, they were not identical, as the imine linkers were present in different tautomeric forms. One of the hemispheres contains four linkers in the typical keto-enamine forms. This hemisphere exhibits a ¹⁵N NMR signal at –205 ppm (characteristic of an enamine) and a set of ¹³C NMR signals characteristic of a ketone (δ 170.6 ppm for the ketone C atom). On the other hand, the opposite hemisphere features linkers in their enol-imine forms, an unknown occurrence for compounds of this type. The enol-imine hemisphere exhibits a ¹⁵N NMR signal at –103 ppm (typical for an imine) and ¹³C NMR signals at typical values for an enol (Figure S20–S25).

The structure of the capsular dimer (**L-7**)(**L-7'**) was also confirmed by X-ray analysis (Figures 2d–f, 3b). The sample was crystallized from a reaction mixture containing **1** and racemic dipeptide (**L-3** and **D-3**). The crystals of the product exhibited the centrosymmetric space group *P4/n* meaning that both enantiomers are present in the structure. However, each single capsule consists of eight dipeptides of the same chirality. This observation corroborates that narcissistic chiral self-sorting has taken place. The dimer is sealed by a seam of twelve hydrogen bonds between the peptide backbones. Comparative analysis of the bond lengths, torsion angles, and non-covalent interactions indicates that the two hemispheres indeed have different tautomeric forms. The keto-enamine hemisphere (A, Figure 2e) was characterized by four of the C_{ar}–O bonds being substantially shorter than the remaining four, an asymmetric bond-length distribution for the dearomatized rings, and a co-planar arrangement of the rings with respect to the enamine moiety. The enol-imine hemisphere (B, Figure 2f) displays C_{ar}–O bonds that are all of the same length and considerably twisted arrangements of the aromatic rings and the imine moieties. Thus, the X-ray structure confirms the homochiral arrangement of (**D-7**)(**D-7'**) with one of the hemispheres assuming a more flexible, albeit less preferred, enol-imine tautomeric form to adapt for self-assembly.

The self-sorting experiments were also carried out for tri- and tetrapeptides. For the tripeptide, the reaction between **1** and enantiomerically pure **L-4** or **D-4** proceeded (as indicated by TLC), but the homochiral products were not soluble in CDCl₃, presumably owing to non-specific aggregation. On the contrary, the reaction between **1** and a racemic mixture of **L-4** and **D-4** gave a single product, which was identified by ROESY and DOSY spectroscopy as heterochiral dimer (**L-8**)(**D-8**) (Figure 1c; see also Figures S32 and S34 and Table S2). The capsular structure of (**L-8**)(**D-8**) was also confirmed by X-ray crystallography (Figure 3c). In the solid state, the binding motif involves the formation of 24 hydrogen bonds. The structure is self-complementary, that is, all possible hydrogen bond donors and acceptors are involved in interactions with neighboring peptide chains. A similar binding motif was also postulated in solution based on ROESY spectroscopy (Figure S32). In contrast to the previous capsules, the internal cavity of the (**L-8**)(**D-8**) capsule is

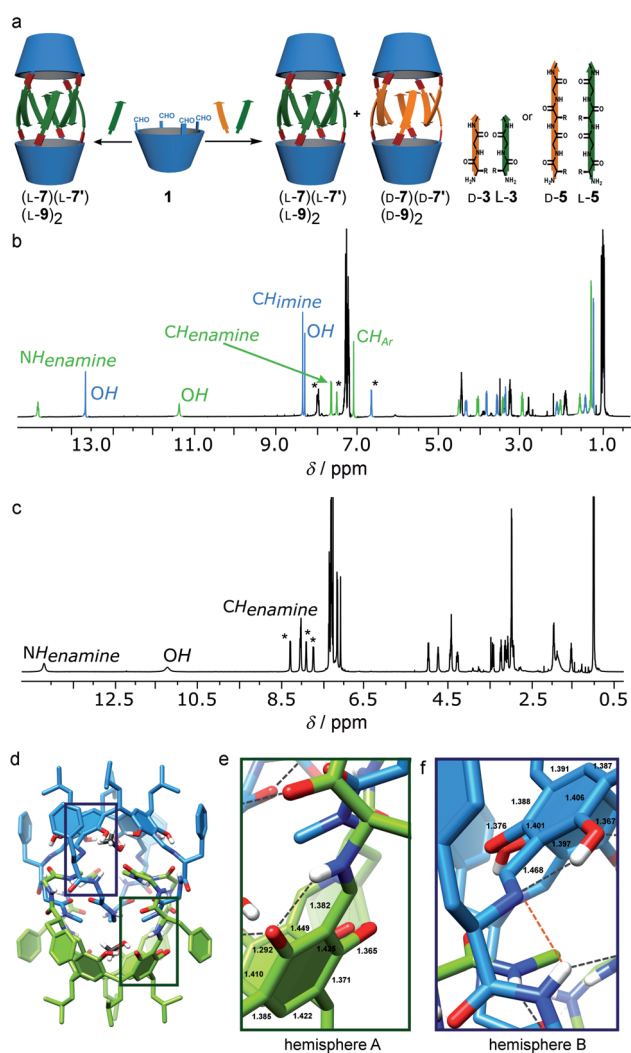


Figure 2. Homochiral capsules obtained by self-sorting. a) Formation of capsules by self-assembly of hemispheres (left) or by self-sorting (right). b) ¹H NMR spectrum of (**L-7**)(**L-7'**). Blue: signals of the enol-imine form; green: signals of the keto-enamine form; black: overlapping signals. *: –NH_{amide}. Spectra recorded in CDCl₃ at 298 K and 600 MHz. c) ¹H NMR spectrum of (**L-9**)₂ (CDCl₃, 298 K, 600 MHz). *: –NH_{amide}. d) X-ray structure of (**D-7**)(**D-7'**). e) Enlarged structure of the keto-enamine part of (**D-7**)(**D-7'**). f) Enlarged structure of the enol-imine part of (**D-7**)(**D-7'**). Gray dashed lines: hydrogen bonds; orange dashed line: short non-covalent interactions.

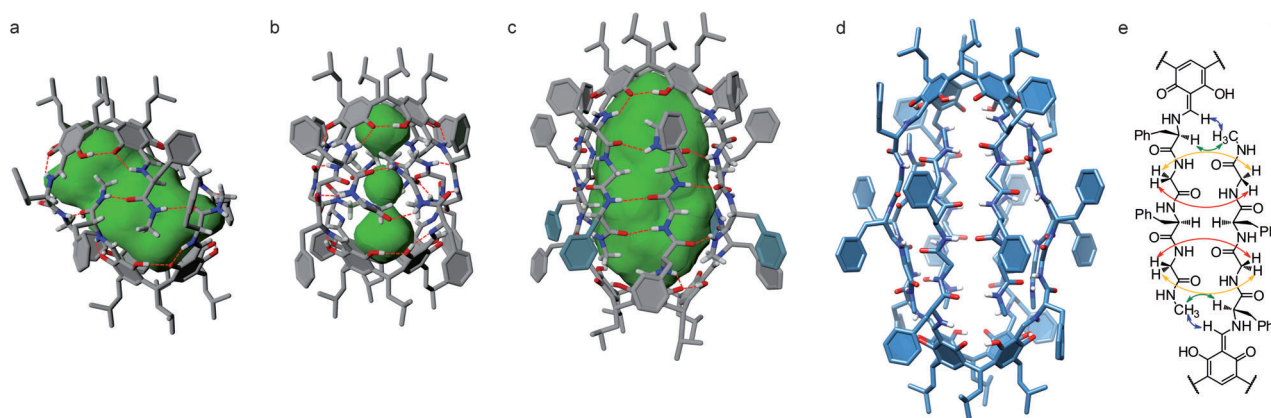


Figure 3. Structures of the peptidic capsules. X-ray structures of a) (L-6a)(D-6a), b) (D-7)(D-7'), and c) (L-8)(D-8). d) Modelled structure of (L-9)₂. e) Experimental NOE correlations for (L-9)₂. H atoms attached to C atoms omitted for clarity. Carbon gray or pale blue, hydrogen white, nitrogen blue, oxygen red. Green surfaces: molecular surfaces of the interior of the capsules calculated with the Chimera program using the MSMS method with a probe size of 1.4 Å.

quite spacious (883 Å³), offering the possibility of accommodating suitable guest molecules.

Self-assembled capsular dimers were also formed by self-sorting using tetrapeptides L-5 and D-5. Similarly to the dipeptides, tetrapeptides L-5 and D-5 also gave homochiral dimers, (L-9)₂ and (D-9)₂ (Figure 2a,c). Dimer (L-9)₂ has the lowest diffusion coefficient among all of the capsules presented herein (Table S2), in agreement with the largest radius of the species. The observed NOEs indicated deep interdigitation of the peptide chains and suggested a binding motif resembling the previous barrel structures (Figure 3d,e; see also Figure S39, Table S2). In the current homochiral structure, the change in the tautomeric form and the deep encapsulation of the terminal methyl groups, as observed for the smaller homochiral (L-7)(L-7') dimer, were not observed. This can be attributed to the higher flexibility of a tetrapeptidic structure, which allows for adaptation without sacrificing its most stable tautomeric form.

The self-sorting phenomenon was observed not only between peptides of different chirality but also between peptides of different lengths (Figure S42). This observation underlines the importance of precise complementarity of binding motifs for effective self-sorting. Similarly, complementarity of the binding motifs for peptides with even and odd number of amino acids provides a tentative explanation for homochiral versus heterochiral selectivity (Figure S43).

In summary, we have designed and synthesized new self-assembled capsules based on short peptides of various chiralities. A great advantage of the approach, which combines dynamic covalent synthesis with self-assembly, is that through the use of very short sequences and a macrocyclic skeleton that provides additional preorganization, it is possible to induce self-organization of complex nanosized chiral molecular containers. The dynamic character of a covalent linkage offers unique possibilities for controlling integration–disintegration processes. Together with potential encapsulation properties, dynamic libraries of such peptidic capsules constitute a promising approach for the development

of new materials with the prospect of gaining properties, such as controlled cargo-release or chirality-driven self-healing.

Received: July 31, 2014

Revised: September 2, 2014

Published online: October 8, 2014

Keywords: calixarenes · chirality · self-assembly · self-sorting · supramolecular chemistry

- [1] a) M. Lal Saha, M. Schmittel, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4651–4684; b) A. X. Wu, L. Isaacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4831–4835.
- [2] a) S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders, J. F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 898–952; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 938–993; b) Y. H. Jin, C. Yu, R. J. Denman, W. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6634–6654.
- [3] a) M. Zelzer, R. V. Ulijn, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3351–3357; b) R. Afrasiabi, H.-B. Kraatz, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1769–1777; c) S. H. Kim, J. R. Parquette, *Nanoscale* **2012**, *4*, 6940–6947; d) J. B. Matson, S. I. Stupp, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 26–33; e) R. L. Schoch, L. E. Kapinos, R. Y. H. Lim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 16911–16916.
- [4] J. W. Sadownik, R. V. Ulijn, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 401–411.
- [5] J. M. A. Carnall, C. A. Waudby, A. M. Belenguer, M. C. A. Stuart, J. J. P. Peyralans, S. Otto, *Science* **2010**, *327*, 1502–1506.
- [6] R. J. Williams, A. M. Smith, R. Collins, N. Hodson, A. K. Das, R. V. Ulijn, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 19–24.
- [7] Y. Krishnan-Ghosh, S. Balasubramanian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2171–2173; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2221–2223.
- [8] J. M. Fletcher et al., *Science* **2013**, *340*, 595–599.
- [9] a) G. Bellapadrona, M. Elbaum, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1534–1537; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 1560–1563; b) L. A. Lee, Z. Niu, Q. Wang, *Nano Res.* **2009**, *2*, 349–364; c) Y.-T. Lai, D. Cascio, T. O. Yeates, *Science* **2012**, *336*, 1129; d) Y.-T. Lai, N. P. King, T. O. Yeates, *Trends Cell Biol.* **2012**, *22*, 653–661; e) N. P. King, J. B. Bale, W. Sheffler, D. E. McNamara, S. Gonen, T. Gonen, T. O. Yeates, D. Baker, *Nature* **2014**, *510*, 103–108.

- [10] a) A. Moure, S. V. Luis, I. Alfonso, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5496–5500; b) S. V. Luis, I. Alfonso, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 112–124.
- [11] E. N. Salgado, R. J. Radford, F. A. Tezcan, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 661–672.
- [12] a) B. Baumeister, S. Matile, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1739–1749; b) N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1354–1365; c) L. Baldini, F. Sansone, G. Faimani, C. Massera, A. Casnati, R. Ungaro, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 869–886.
- [13] M. Grajda, M. Wierzbicki, P. Cmoch, A. Szumna, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 11597–11601.
- [14] a) A. Casnati, F. Sansone, R. Ungaro, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 246–254; b) J. O. Freeman, W. C. Lee, M. E. P. Murphy, J. C. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7421–7429.
- [15] V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donorfio, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1721.
-

Mechanochemical Encapsulation of Fullerenes in Peptidic Containers Prepared by Dynamic Chiral Self-sorting and Self-assembly

Marek Szymański,^{[a],†} Michał Wierzbicki,^{[a],†} Mirosław Gilski,^[b,c] Hanna Jędrzejewska,^[a] Marcin Sztylko,^[a] Piotr Cmoch,^[a] Aleksander Shkurenko,^[d] Mariusz Jaskólski,^{*,[b,c]} and Agnieszka Szumna^{*,[a]}

Abstract: Molecular capsules composed of amino acid or peptide derivatives connected to resorcin[4]arene scaffolds via acylhydrazone linkers were synthesized using the dynamic covalent chemistry (DCC) and hydrogen-bond-based self-assembly. The dynamic character of linkers and preference of peptides to self-assemble into β -barrel-type of motifs lead to spontaneous amplification of formation of homochiral capsules from mixtures of different substrates. The capsules have cavities of ca. 800 Å³ and exhibit good kinetic stability. Although they retain the dynamic character, allowing processes such as chiral self-sorting and chiral self-assembly to work with high fidelity, guest complexation is hindered in solution. However, quantitative complexation of even very large guests, such as fullerenes C₆₀ or C₇₀, is possible with the utilization of reversible covalent bonds or application of mechanochemical methods. The NMR spectra show the influence of the chiral environment on the symmetry of the fullerene molecules, resulting in differentiation of diastereotopic carbon atoms for C₇₀, and the X-ray structures provide unique information on the modes of peptide-fullerene interactions.

Introduction

The chemical diversity and biocompatibility of peptides have stimulated intensive research on their application as supramolecular building blocks in the field of artificial nanomaterials. Numerous examples of the application of peptide-based synthetic materials have been reported, including targeted drug delivery systems,^[1] materials for regenerative medicine,^[2] retroviral gene transfer, and even capturing carbon dioxide from fuel gas.^[3] However, relatively long peptidic or peptidomimetic sequences^[4] or presence of additional interacting groups are required to obtain predictable and functional 3D structures. Consequently, practical applications of peptidic building blocks are often limited by their synthesis.^[5] In this regard, the utilization of relatively easily available, modified short peptides has proven to be more practical.^[6] A promising

but largely unexplored approach involves combination of short peptides with dynamic covalent chemistry (DCC). This approach can take advantage of the natural tendency of peptides for self-assembly as well as of the reversible character of chemical reactions, in order to amplify the formation of complex functional structures.^[7] Dynamic structures based on peptides can also potentially benefit from the unique features of the DCC approach, such as the possibility of self-sorting, ligand-templating/complexation and self-healing. However, they also present significant challenges, such as the need to strike a balance between the kinetic and thermodynamic parameters, or the need to control the flow of energy to the system in order to cross various energy barriers.

In this paper we present the formation of new, highly stable and yet dynamic peptidic capsules and show various ways to cross energy barriers for covalent and non-covalent processes (reversible chemical reactions, self-assembly and complexation). Our *de novo* designed capsules have acylhydrazone linkers and peptides connected using their C-termini which results in enhanced kinetic and thermodynamic stability. On the other hand, high stability implies the existence of large energy barriers that hamper complexation of guests. We show that the barriers can be surmounted by the utilization of the reversible character of covalent bonds or by mechanochemical methods. Although the mechanisms of chemical processes under extreme mechanical forces are still poorly understood, mechanochemistry has recently demonstrated its high potential in controlling supramolecular and dynamic systems.^[8] We conclusively demonstrate effective complexation of non-intuitive guest molecules, fullerenes C₆₀ and C₇₀, inside our peptidic capsules and analyze fullerene-peptide interactions.

Results and Discussion

Design and synthesis

We have previously demonstrated that short peptides can serve as building blocks for dynamic formation of capsules, provided that they are properly preorganized by, for example, connection to a macrocyclic skeleton.^[9] The peptides have been connected to the scaffolds by imine linkers using their N-termini. However, intrinsically low energy barrier for the imine formation/hydrolysis reaction precluded further applications of such capsules for complexation (under ambient conditions, the imine linkers were prone to disruption even by simple neutral molecules). A new generation of dynamic peptidic capsules was designed using the resorcin[4]arene scaffold **1**^[10] and peptidic fragments (**2a** – **3b**) connected *via* acylhydrazones as dynamic linkages (Fig. 1). The acylhydrazone linkers display an excellent balance between facile reversibility and stability as suggested^[11] and exploited by

[a] M. Szymański,[†] M. Wierzbicki,[†] H. Jędrzejewska, M. Sztylko, Dr. P. Cmoch, Prof. A. Szumna
Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences
Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland
E-mail: agnieszka.szumna@icho.edu.pl

[b] Dr. M. Gilski, Prof. M. Jaskólski
Faculty of Chemistry
A. Mickiewicz University
Umultowska 89b, 61-614 Poznan, Poland.
E-mail: mariuszj@amu.edu.pl

[c] Dr. M. Gilski, Prof. M. Jaskólski
Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences
Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznan, Poland

[d] Dr. A. Shkurenko
Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences
Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland

[†] These individuals contributed equally to this work

the group of Sanders.^[12] Additionally, acylhydrazones are compatible with water and biological environments^[13] and their formation can be catalyzed under mild conditions in media of various pH.^[14] It should be noted that simple aromatic acylhydrazones attached to resorcinarene scaffold have been previously used for the formation of molecular capsules, however, not in a dynamic way.^[15]

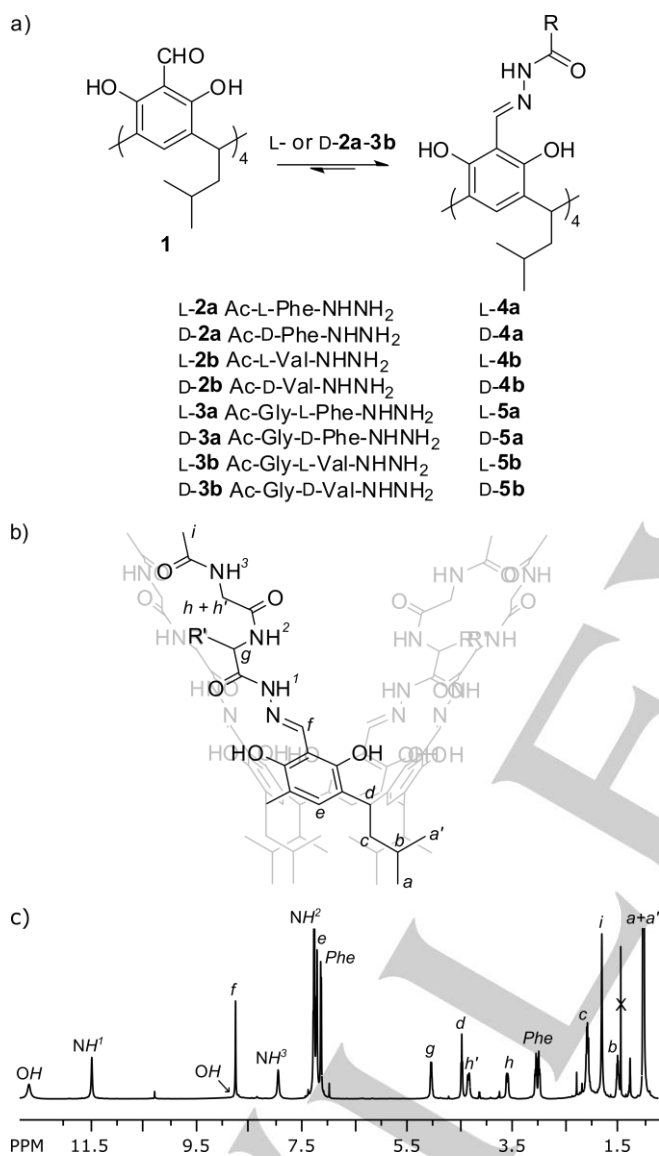


Figure 1. (a) Synthesis of acylhydrazones; (b) full chemical structure of a capsule hemisphere, with numbering scheme. The front arm is shown in heavy line, the remaining ones, shown in perspective, are in gray; (c) ^1H NMR spectrum of $(\text{L-5a})_2$ (CDCl_3 , 300 K, 600 MHz).

The peptide hydrazides **2a** – **3b** were synthesized using EDCI/OXYMA peptide coupling strategy (SI). Reaction of **1** with peptide hydrazides **2a** – **3b** gave tetrasubstituted acylhydrazones **4a** – **5b** in high yields (85–97 %, Fig. 1a). Control experiments were performed in order to check the

reversibility of the reaction under the current conditions. When **L-4a** was mixed with **L-4b** and heated at 70°C for 7 days, scrambling of the acylhydrazone fragments was observed, indicating the reversibility of the reaction under such conditions (Fig. S24 – S28).

Isomerism

Acylhydrazones **4a** – **5b** have many possible isomers including regioisomers, tautomers and atropoisomers. The isomerism originates from keto-enol and amide-iminol tautomerism and from E/Z isomerization of the double and partially-double bonds at various positions. All the isomerization processes have been previously reported for analogous functional groups.^[16] In the present case, the acylhydrazones **4a** – **5b** exhibit simple ^1H and ^{13}C NMR spectra in non-polar solvents, consistent with the C_4 symmetry of the molecules assuming single tautomeric forms in all arms (Fig. 1c). Analysis of the ^1H - ^{15}N and ^1H - ^{13}C HSQC and HMBC spectra for **4a** – **5b** allowed us to determine the positions of the hydrogen atoms and thus to assign the specific tautomeric forms (SI). For all **4a** – **5b** products, the resorcinol rings exist in enol forms and the acylhydrazone groups assume the amide forms (Fig. 1b). X-ray crystal structures of **4b** and **5a** also confirmed that all the $\text{C}_{\text{ar}}\text{-OH}$ bonds are of the same length, indicating the enol form of the resorcinol rings. It should be noted that the tautomeric form of the resorcin[4]arene skeleton in the case of acylhydrazones **4a** – **5b** is different from the keto-enamine form reported previously for the peptidic capsules based on imine linkages.^[10]

Self-assembly

The NMR spectra and X-ray structures confirm that all the synthesized peptidic acylhydrazones **4a** – **5b** form self-assembled capsular dimers in solution and in the solid state. ROESY spectra of acylhydrazones **4a** and **4b** (amino acid derivatives) show the ROE effect between protons *f* and *h* in both cases (Fig. S5 and S10). For acylhydrazones **5a** and **5b** (dipeptides), ROE was observed between protons *f* and *h, h'* (Fig. S15 and S20). Proximity of these protons is consistent with the formation of self-assembled structures. Additionally, the diffusion coefficients observed for the present acylhydrazones are similar to the values reported for other dimeric capsules (Table S1). All these findings strongly suggest that in solution the acylhydrazones exist as dimers.

The X-ray crystal structure of $(\text{D-4b})_2$ confirms the formation of self-assembled dimers with two hemispheres interacting via hydrogen bonding between their peptide backbones (Fig. 2a). The hydrogen bonding motif involves the formation of four pairs of antiparallel strands, resembling the antiparallel β -sheet binding motif in a β -barrel (Fig. 2c and 2e). The conformation of the peptidic chains also corresponds to typical Ramachandran angles of natural β -sheet structures ($\phi = -118.4^\circ$, $\psi = 107.2^\circ$). The inter-strand hydrogen-bonded cycles are formed as 10-membered rings (orange motif). Notably, the binding motif is not fully complementary; the strands are grouped pairwise, with unmatched amide groups (Fig. 2a), which act to bridge the paired-strands through the recruitment of hydrogen-bonded ethanol molecules.

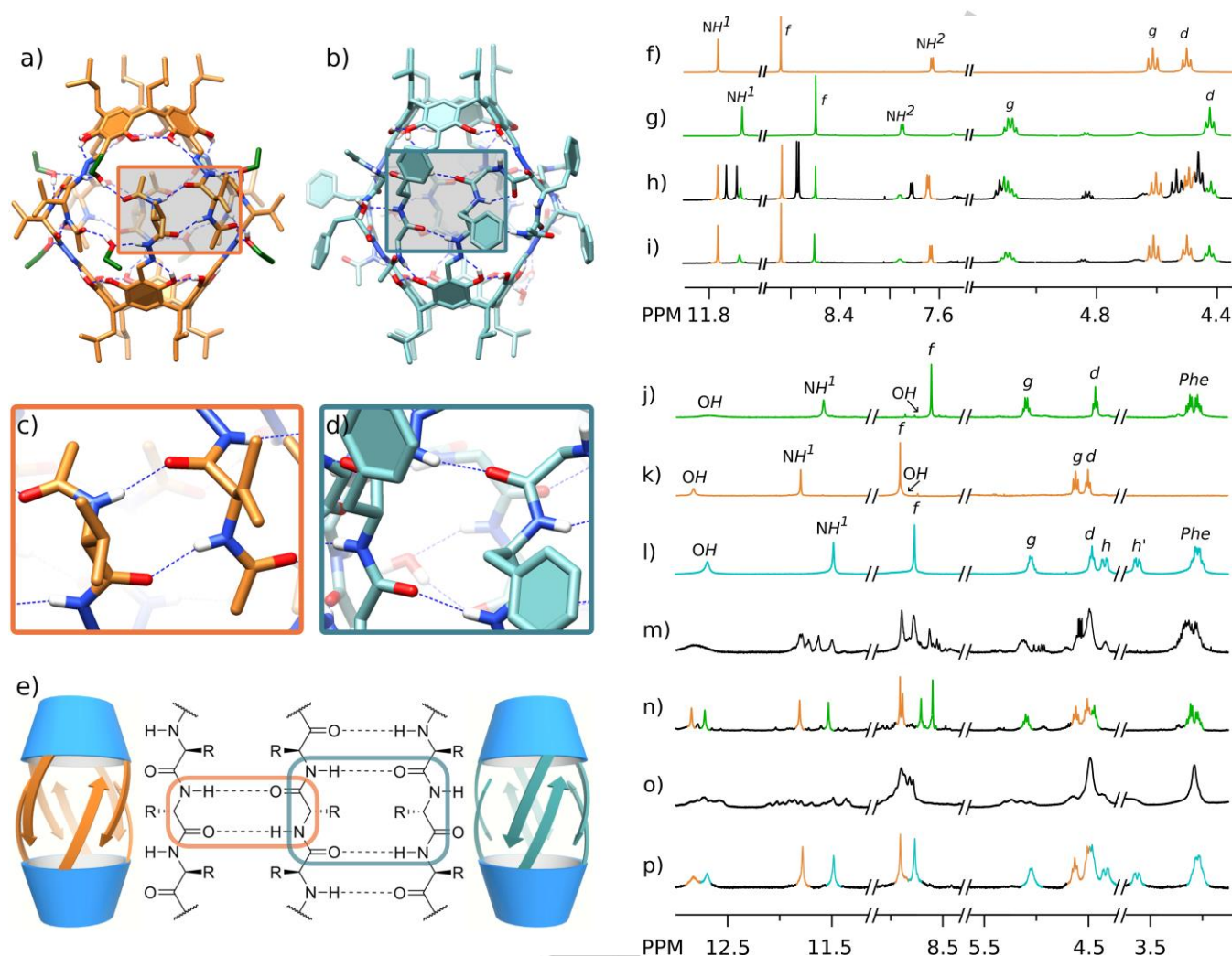


Figure 2. X-ray crystal structures of $(D-4b)_2$ (a,c) and $(D,L-5a)_2$ (b,d), with characteristic binding motifs; (e) schematic representation of the capsules and the β -sheet binding motifs, illustrating the differences in the relative arrangement of the peptide chains. NMR monitoring of the exchange of hemispheres. 1H NMR spectra of: (f) $(L-4b)_2$; (g) $(L-4a)_2$; (h) $(L-4a)_2 + (L-4b)_2$ after 3 days, (i) $(L-4a)_2 + (D-4b)_2$ after 3 days ($CDCl_3$:MeOH 95:5, 300 K, 600 MHz). Chiral self-sorting during synthesis. 1H NMR spectra of: (j) $(L-4a)_2$; (k) $(L-4b)_2$; (l) $(L-5a)_2$; (m) the product of the reaction of **1** + **L-2a** + **L-2b**; (n) the product of the reaction of **1** + **L-2a** + **D-2b**; (o) the product of the reaction of **1** + **L-2b** + **L-3a**; (p) the product of the reaction of **1** + **L-2b** + **D-3a** (reaction conditions: 7 days, 70°C, $CHCl_3$; NMR spectra in $CDCl_3$, 300 K, 600 MHz).

The X-ray structure of $(D,L-5a)_2$ (Fig. 2b) also confirms the formation of a dimeric self-assembled capsule. The binding motif also involves the formation of four antiparallel β -sheet “pairs of strands” (Fig. 2d). However, an important difference between the binding motifs of capsules $(D-4b)_2$ and $(D,L-5a)_2$ is that in the latter case the inter-strand pairing leads to the formation of 14-membered rings (Fig. 2d and 2e, blue motif). The second amino acid residue in each strand (Gly) plays a less defined role as it interconnects the “pairs of strands” or mediates interactions with other capsules and solvent molecules in the crystal. It is important to note that although the sample was crystallized from a racemate and the space group is centrosymmetric, each individual capsule contains only homochiral hemispheres. This

strongly suggests a preference towards the formation of homochiral dimers for the dipeptidic acylhydrazones.

Stability

In order to probe the stability of the dimers and preference for chiral self-assembly, we analyzed two mixtures of capsules: $(L-4a)_2 + (L-4b)_2$ (homochiral mixture) and $(L-4a)_2 + (D-4b)_2$ (heterochiral mixture) in various media. In $CDCl_3$ at rt, 1H NMR spectra remained unchanged in both cases even after 7 days. Heating of the mixtures results in covalent scrambling, without a stage when hybrid capsules made of two different hemispheres could be detected. To promote non-covalent exchange of the hemispheres, a small amount of a polar solvent was added (5% v/v MeOH). After 3 days, the equilibration process has led to the formation of a statistical mixture of hybrid capsules in the case of

the homochiral mixture (Fig. 2h) whereas no change was observed in the composition of the heterochiral mixture (Fig. 2i). These results provide further evidence of the existence of the dimeric forms in solution, even after addition of polar solvents. They also indicate that homochiral dimers are highly preferred. Additionally, it should be noted that the self-assembled dimers have an unusually high kinetic stability in a non-polar solvent (CDCl_3) and relatively slow rates of hemisphere exchange (days) even after the addition of polar solvent.

Self-sorting

Various types of calixarene-based molecular capsules have shown self-sorting abilities at the stage of their non-covalent self-assembly.^[17] There are also several examples of using peptides to induce chiral self-sorting.^[7a-b] However, a combination of non-covalent stabilization and of the dynamic character of chemical reactions that leads to effective self-sorting already at the stage of covalent synthesis of such capsules, have only been reported by us for imine-based capsules.^[9] In the present work, we performed a series of experiments to test the possibility of self-sorting for hydrazide substrates with different lengths and different chirality. For the reaction of **1** with a mixture of hydrazides of the same length but different chirality, e.g. **L-2a** + **D-2b**, exclusive formation of homochiral dimers was observed (Fig. 2n and S30-S32) in agreement with previously observed preference towards homochiral dimers (by both X-ray diffraction and solution experiments). Effective chiral self-sorting also took place when racemic mixtures of dipeptidic hydrazides were used, e.g. **L-3a** + **D-3a**, resulting in exclusive formation of homochiral dimers (Fig. S30f). However, when a mixture of hydrazides having the same length and the same chirality was used, e.g. **L-2a** + **L-2b**, no sorting was observed (confirmed also by ^{13}C NMR, ESI MS and HPLC, Fig. 2m and S30-S32). These results indicate that chirality of peptides governs the self-sorting process. The lack of self-sorting in the case of using two peptides of the same chirality excludes the possibility that self-sorting is caused by interactions that are specific for these two particular peptides (e.g. C-H... π interactions between Val and Phe side chains).

A plausible explanation of the amplification of homochiral capsules over heterochiral or mixed capsules may involve a concurrent involvement of various factors, for example: (1) preference of acylhydrazone linkages towards planar *E* conformation about N-N bond (99.6% of the structures based on CSD search, Fig. S49, and structures presented in this paper) and (2) conformational preferences of peptides within β -sheet binding motif according to the Ramachandran plot (especially for Val).^[18]

Interestingly, no self-sorting was observed based on the length of the peptides. A reaction of **1** with a mixture of **L-2b** + **L-3a** (hydrazides of different length but the same chirality) led to a mixture of many products (Fig. 2o). However, reaction of **1** with a mixture of **L-2b** + **D-3a** (hydrazides of different length and different chirality) led to a well-defined mixture of only two products (**L-4b**)₂ + (**D-5a**)₂ (Fig. 2p). Thus, in the present case, only the chirality but not the length of the peptides plays a critical role in self-sorting. This is an intriguing observation since complementarity of the binding motifs is the key factor in the

self-sorting processes, resulting in the amplification of products composed of substrates with the same lengths. Complementarity is especially important for conformationally labile substrates, and, in fact, high fidelity self-sorting based on length was previously observed for imine-based peptidic capsules.^[9] In the present case, the lack of length-dependence can be explained by a comparison of the binding motifs for capsules (**L-4b**)₂ and (**D,L-5a**)₂. In both capsules, the conserved binding motifs involve only the first amino acid residue in each strand. The presence of a second amino acid residue, Gly, in (**D,L-5a**)₂, does not lead to any significant elongation of the (**D,L-5a**)₂ capsule compared to capsule (**L-4b**)₂ since it only forms additional interconnections between the "pairs of strands". However, the binding motifs in (**L-4b**)₂ and (**D,L-5a**)₂ are slightly different (Fig. 2e). The difference can be minimized provided a twist of the hemispheres with respect to each other is possible, resulting in a change of the binding motif from a 10-membered to 14-membered hydrogen-bonded ring. Assisted by such a rotation, strands composed of amino acid derivatives and dipeptides could easily fit into the same binding motif, leading to ineffective length-based self-sorting.

Complexation

The cavity volumes of capsules were estimated using two different procedures. The calcVoid procedure^[19] implemented in OLEX2^[20] gave 801 Å³ for (**D-4b**)₂ and 758 Å³ for (**D,L-5a**)₂ (default solvent radius 1.42 Å, shrink truncation radius 1.42 Å). The Spaceball program^[21] gave a value of 830 Å³ for (**D-4b**)₂. Based on shape and size complementarity, we predicted that fullerene C₆₀ ($V = 549 \text{ \AA}^3$)^[22] can fit into these cavities. Fullerene is also considered a good probe for monitoring intrinsic open-close processes of capsules due to its size and lack of highly directional interactions with capsule external surface.

Complexation experiments in CDCl_3 did not show any traces of C₆₀ encapsulation within the (**L-4a**)₂ or (**L-5a**)₂ capsules, even after several weeks (at rt and at 70°C). The complexes also failed to form after the addition of various amounts of MeOH, which was shown to promote capsule disassembly. However, when reaction between **1** and hydrazides **L-2b** or **L-3a** was carried out in the presence of stoichiometric amounts of C₆₀ or C₇₀, quantitative formation of the respective complexes C₆₀ ⊂ (**L-4b**)₂, C₆₀ ⊂ (**L-5a**)₂, and C₇₀ ⊂ (**L-5a**)₂ was observed. The formation of these complexes was unambiguously confirmed by clear new sets of signals in the ^1H and ^{13}C NMR and ESI MS spectra (Fig. 3a-g and S35-S39). After the complexes have been formed, the fullerenes are not released even under the conditions at which covalent scrambling is observed for free capsules (CDCl_3 , 7 days, 70°C).

These results indicate that the capsules have high thermodynamic affinity towards complexation of C₆₀ and C₇₀, therefore the equilibrium is shifted towards formation of complexes. However, complexation of these guests is hedged by a high kinetic barrier that precludes complexation inside the capsules that have already been formed. But the complexation also doesn't proceed under the specific conditions for which covalent scrambling occurs (exchange of peptidic arms by rupture of covalent bonds). It may be rationalized assuming that covalent scrambling proceeds through "one-at-a-time

mechanism", i.e. at a single moment only one or two arms are removed while the rest of the capsule remains intact. Therefore, even though covalent scrambling proceeds, complexation or release of large fullerene guest is still hampered, because it requires a considerable opening. Although complexation of fullerenes by the pre-assembled capsules did not proceed in solution, successful complexation could be achieved using mechanochemical methods in the solid state. When a mixture of (L-5a)₂ and C₆₀ was ball-milled for 1 hour, complexation of C₆₀ was observed. This result indicates that mechanochemical methods can be valuable tools for loading cargo into molecular

capsules of high kinetic stability, and that they are able to overcome kinetic barriers more effectively than in solution. Although mechanochemical encapsulation in micelles or liposomes is widely known, to the best of our knowledge, this is the first demonstration of mechanochemically induced encapsulation in molecular containers. The mechanism of action, as in many other mechanochemical processes, remains mostly unknown. We think that explanations involving conformational changes and/or chemical reversibility under mechanochemical conditions due to local overheating are plausible.

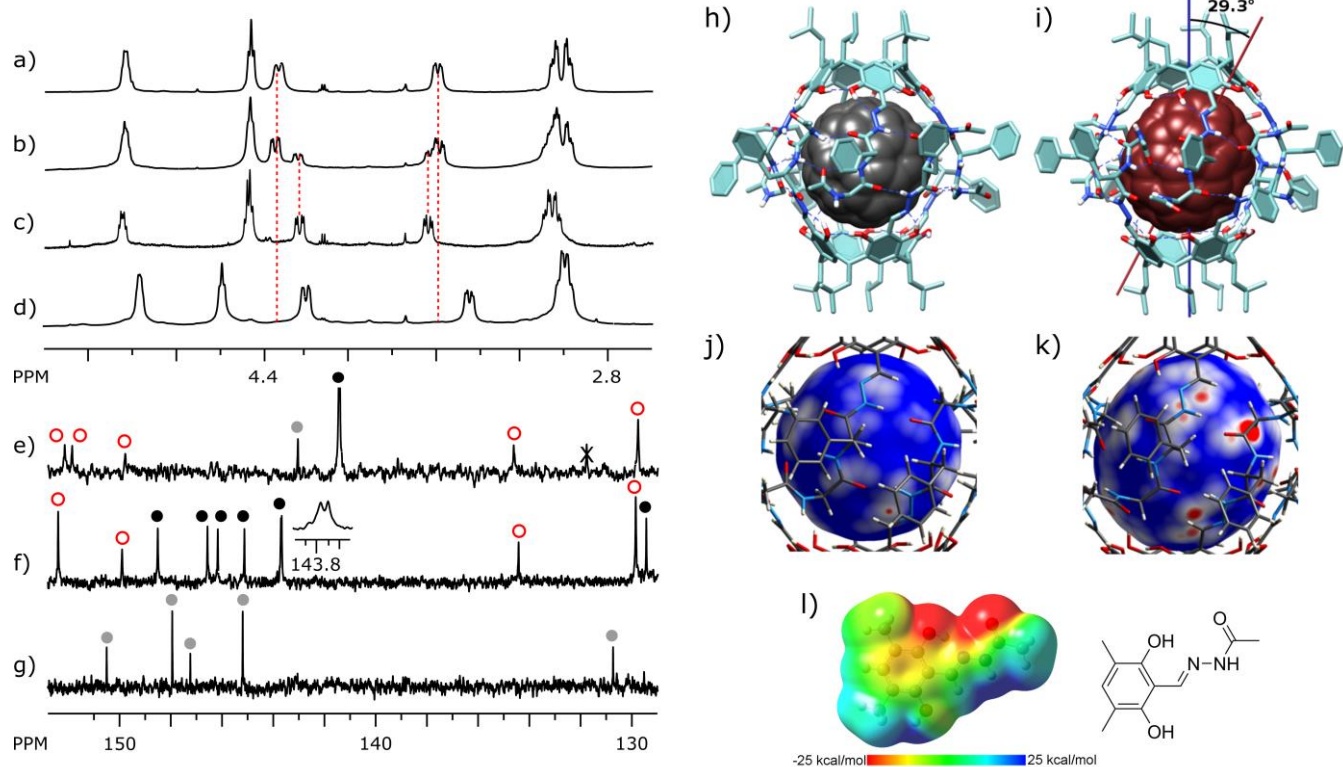


Figure 3. Complexation of fullerenes shown by ¹H NMR (a-d) and ¹³C (e-g) NMR spectra of: (a) (L-5a)₂; (b) (L-5a)₂ + C₆₀ after ball-milling; (c) the product of the reaction of 1 + L-3a + C₆₀; (d) the product of the reaction of 1 + L-3a + C₇₀; (e) the product of the reaction of 1 + L-3a + C₆₀; (f) the product of reaction of 1 + L-3a + C₇₀; (g) C₇₀ (○ capsules, ● free fullerene, ● encapsulated fullerene, CDCl₃, 600 MHz, 300 K). X-ray crystal structures of: (h, j) C₆₀ ⊂ (D-5a)₂ and (i, k) C₇₀ ⊂ (D-5a)₂. The capsules are shown in stick representation and the fullerenes as van der Waals surfaces. The surfaces in (j,k) are color-coded for host-guest contacts after subtraction of the sum of the van der Waals radii, as red (<0 Å), white (=0 Å) and blue (>0 Å). The scale in the top and bottom panels is different for better visibility. The lines and angle in (i) show the mutual orientation of the principal axes of C₇₀ and (D-5a)₂. (l) Electrostatic potential mapped onto a total electron density isosurface of monomeric acylhydrazone (*ab initio* calculations, DFTB3LYP).

The C₆₀ ⊂ (L-5a)₂ complex was characterized by NMR and X-ray crystallography (C₆₀ ⊂ (L-5a)₂, and C₆₀ ⊂ (D-5a)₂ are enantiomeric but otherwise identical, Fig. S42). In the ¹³C NMR spectrum, the signal of encapsulated C₆₀ appears as a sharp singlet shifted upfield by 2.0 ppm compared to a free guest molecule (Fig. 3e). The symmetry rules for C₆₀ predict that all carbon atoms are homotopic, therefore, their chemical shifts are not differentiated upon encapsulation in a chiral capsule. The presence of a single signal for encapsulated C₆₀ indicates that spinning of the fullerene within the capsule is fast on the NMR

timescale. Despite this high rotational freedom in solution, in the solid state the guest molecule is perfectly ordered. The C₆₀ molecule in the crystal structure was modeled and refined using only two soft geometrical restraints (SADI for equivalence of the two unique C-C bonding distances) and the experimental electron density showed a well-resolved guest structure at full occupancy (Fig. 3h, S46). A van der Waals representation of the host-guest complex indicates that the geometric match is very good. However, the intramolecular distances between the host and guest molecules are systematically higher than the sum of

the corresponding van der Waals radii (Fig. 3j). Interestingly, the closest distances are observed between C_{60} and the acylhydrazone groups (3.37 Å for $C_{\text{fullerene}} \cdots C=N$).

In contrast to C_{60} complexation, the larger C_{70} guest complex could be just barely detected even after prolonged mechanochemical procedures. However, the fullerene molecule could be stoichiometrically complexed when the chemical reaction of **1** and **L-3a** was carried out in the presence of C_{70} . A comparison of the ^{13}C NMR spectra of free C_{70} and $C_{70} \subset (\text{L-5a})_2$ shows significant complexation-induced shifts and symmetry changes. The ^{13}C NMR spectrum of $C_{70} \subset (\text{L-5a})_2$ contains seven signals of equal intensity that were attributed to complexed C_{70} (Fig. 3f). The spectrum of free C_{70} contains five signals, two of which have doubled intensity in accordance with the D_{5h} symmetry (in all solvents reported, including the spectrum in CDCl_3 recorded in this work, Fig. 3g). The change of symmetry upon complexation can be attributed to the influence of the chiral environment. In chiral environments, enantiotopic carbon atoms (related by mirror planes) become diastereotopic and have different chemical shifts. Thus, the resulting symmetry of C_{70} in a chiral environment is D_5 . In addition, hindered rotation of C_{70} within the cavity would result in further lowering of the symmetry of both the C_{70} guest and the capsule. Since such a symmetry reduction is not observed here, it must be concluded that the tumbling of C_{70} in the cavity is fast. The X-ray crystal structure of $C_{70} \subset (\text{D-5a})_2$ shows a well resolved C_{70} molecule inside the cavity. Interestingly, the long axis of the C_{70} prolate spheroid is not aligned with the long axis of the capsule but has a $\sim 29^\circ$ tilt (angle in Fig. 3i). A comparison of the three X-ray structures: $(\text{D-5a})_2$, $C_{60} \subset (\text{D-5a})_2$ and of $C_{70} \subset (\text{D-5a})_2$, indicates that, in all cases, the capsule skeleton has highly similar geometry with symmetry close to C_4 (deviations $< 1\%$, Fig. S48 and Supplementary movie). The association motif is conserved and the internal cavity volumes are similar in all structures. This indicates that the tilting of C_{70} inside the cavity is not caused by a distortion of the capsule's shape, induced, for example, by packing forces or, indeed, by the guest molecule itself. The tilt must result, therefore, from favorable host–guest interactions. Indeed, analysis of the van der Waals contacts indicates that the host–guest distances are shorter for $C_{70} \subset (\text{L-5a})_2$ than for $C_{60} \subset (\text{L-5a})_2$ (Fig. 3k). The shortest distances are observed between C_{70} and the acylhydrazone groups and glycine methylene H atoms of $(\text{L-5a})_2$ (3.20 Å for $C_{\text{fullerene}} \cdots C=N$ and 2.38 Å for $C_{\text{fullerene}} \cdots \text{H}_{\text{Gly}}$).

Stoichiometric and quantitative complexation of fullerenes by peptide-resorcinarene capsules is non-intuitive due to the apparently different chemical characters of the host and guest molecules. Previously reported fullerene receptors were based mainly on extended complementary aromatic surfaces, for example, of cyclotrimerarylenes and unmodified calixarenes, cycloparaphenylenes,^[23] corannulenes,^[24] phthalocyanines,^[25] porphyrines,^[26] anthracenes^[27] and even anthanthrenylene (six conjugated aromatic rings) macrocycles.^[28] Even though large proteins have also been used for stabilizing fullerenes in water, the stabilizing forces are largely unknown.^[29] It has been postulated that internal hydrophobic cavities of those proteins are mainly responsible for the interactions. In the present

capsules, the shortest molecular interactions can be precisely determined, therefore they shed some light on the peptide–fullerene interactions. Surprisingly, the shortest intramolecular distances are observed not between the fullerenes and (as expected) the aromatic rings, but involve the acylhydrazone groups or the glycine methylene protons (part of the peptide backbone). To elucidate the participation of the acylhydrazone groups in the fullerene interactions, we performed *ab initio* DFT calculations (at the B3LYP level of theory) for a monomeric acylhydrazone unit (Fig. 3l).^[30] Calculations of the electrostatic potential indicate that a slightly negative potential extends from the aromatic ring to the acylhydrazone double bond. Therefore, interactions of this electron-rich fragment with fullerenes, (which can be considered as π -acceptors) seem to be favourable. However, other factors can also contribute to the overall stabilization of these complexes (e.g. solvophobic interactions, as it was previously suggested for complexation of C_{60} in naphthalenediimide nanotubes).^[31]

Conclusions

A series of molecular capsules based on amino acid and peptide derivatives attached to macrocyclic scaffolds have been synthesized. The dynamic character of the acylhydrazone moiety, used as the linker, and effective self-assembly, enabled highly selective syntheses from racemic mixtures of hydrazides by high-fidelity chiral self-sorting. The capsules have greatly enhanced thermodynamic and kinetic stability compared with the previously reported capsules based on imine linkers. The stability enhancement stems from the robustness of the non-covalent binding motif and from higher hydrolytic stability of the covalent linker. Although the capsules retain their dynamic character, allowing processes such as chiral self-sorting and chiral self-assembly to work with high precision, other processes, like complexation by pre-assembled capsules are markedly hampered. Therefore, encapsulation of fullerene buckyballs, that match the size and shape of the cavity of pre-assembled capsules, cannot be accomplished in solution. However, as conclusively demonstrated in this work, the complexation energy barrier can be successfully overcome by the utilization of the reversible character of the covalent bonds, or by mechanochemical methods.

Experimental Section

The use of CDCl_3 or CHCl_3 as solvent was dictated by the experimental conditions (e.g. in situ experiments in NMR tubes). The use of deuterated solvent had no influence on the properties of the investigated capsules.

Synthesis of capsules: Tetraformylresorcin[4]arene **1**^[10] (0.05 mmol, 41 mg) and respective hydrazide (0.2 mmol) were dissolved in CHCl_3 (2 ml) in a sealed pressure vial. The mixture was heated at 70°C for 20 h. Then the reaction mixture was cooled down and filtered. The solution was evaporated under reduced pressure and vacuum dried. Acylhydrazones **4a** – **5b** (as non-covalent dimers $(\text{L-4a})_2$ – $(\text{D-5b})_2$) were obtained as yellow solids in 92–98% yields.

Scrambling experiment: (L-4a)₂ (0.006 mmol, 9.8 mg) and (L-4b)₂ (0.006 mmol, 8.6 mg) were dissolved in CDCl₃ (1 ml). The mixture was stirred at 70°C for 7 days in a sealed pressure vial. After cooling the sample was analyzed using ¹H NMR and ESI MS. Presence of mixed products (scrambled) was detected.

Self-sorting experiments: Tetraformylresorcin[4]arene **1** (0.05 mmol, 41 mg) and two different hydrazides (0.1 mmol each) were dissolved in CHCl₃ (2 ml) in a sealed pressure vial. The reaction was stirred at 70°C for 7 days. Then, the mixture was cooled down and filtrated. The solution was evaporated under reduced pressure. The solid was analyzed using ¹H and ¹³C NMR.

Complexation of fullerenes using mechanochemical methods: (L-5a)₂ (0.005 mmol, 16.4 mg) and C₆₀ (0.005 mmol, 3.6 mg) were placed in a grinding vial. The sample was ball-milled at milling rate of 500 min⁻¹ for 1 h. Then, the sample was dissolved in CDCl₃ (1 ml) and filtered. Products were analyzed using NMR. Complexation of C₇₀ was studied by analogous procedures. Partial complexation of C₆₀ (c.a. 30%) and C₇₀ (c.a. 5%) was detected.

Complexation of fullerenes during chemical reaction: Tetraformylresorcin[4]arene **1** (0.02 mmol, 16.5 mg), L-3a (0.08 mmol, 22.2 mg) and C₆₀ (0.01 mmol, 7.2 mg) were dissolved in CHCl₃ (2 ml) in a sealed pressure vial. The reaction was stirred at 70°C for 4 days. Then, the mixture was cooled down and filtrated. The solution was evaporated under reduced pressure. Products were analyzed using NMR. Complexation of C₇₀ was studied using analogous procedures. Hydrazides D-3a and L-2b were tested in a similar way. In all cases, quantitative formation of stoichiometric complexes was detected.

X-ray structure determination: Single crystals of (D-4b)₂ were grown through slow diffusion of ethanol vapor into a chloroform solution. Single crystals of (D,L-5a)₂ were grown through slow diffusion of isopropanol vapor into a chloroform solution. Single crystals of C₆₀ ⊂ (L-5a)₂ were grown through slow diffusion of acetonitrile vapor into a chloroform solution. Single crystals of C₇₀ ⊂ (L-5a)₂ were grown through slow diffusion of methanol vapor into a chloroform solution. X-ray measurements were carried out using an Agilent SuperNova diffractometer (CuKα radiation) for (D-4b)₂ and C₇₀ ⊂ (L-5a)₂ and at the MaxLab II synchrotron beamline 1911-3 (Lund, Sweden) at λ = 0.8000 Å for (D,L-5a)₂ and C₆₀ ⊂ (L-5a)₂. The structures were solved using SHELXS^[32] (the capsules) or by molecular replacement using the PHASER^[33] module of the CCP4 suite^[34] and capsule skeletons as molecular probes (in case of fullerene complexes).^[35] The structures were refined in SHELXL with anisotropic displacement parameters for all non-H atoms. All hydrogen atoms were included at geometrically predicted coordinates. For (D,L-5a)₂, C₆₀ ⊂ (L-5a)₂ and C₇₀ ⊂ (L-5a)₂, stereochemical restraints were applied to bond lengths in the peptidic chains and the fullerene molecules. Soft restraints were also applied to thermal parameters where necessary (in disordered regions). Highly disordered solvent molecules were removed from the electron density using the Solvent Masking procedure in OLEX2.^[20] CCDC files 1060617 – 1060620 contain the supplementary crystallographic data for this paper and can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

Acknowledgements

This work was supported by the Foundation for Polish Science (A. S. and H. J. grant POMOST/2011-4/10), National Science

Center (MJ and MG grant 2013/10/M/NZ1/00251) and Wrocław Centre for Networking and Supercomputing (grant No. 299). The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under BioStruct-X (grant agreement No. 283570). We thank MAX IV Laboratory in Lund for the allocation of synchrotron radiation beamtime.

We would like to acknowledge Prof. Kinga Suwińska for her help with in-house X-ray data collection, Dr. Michał Michalak and Paweł Czerwiński for their assistance with ball-milling and HPLC experiments.

Keywords: peptide mimics, chirality, supramolecular chemistry, fullerenes

- [1] a) D. G. Fatouros, D. A. Lamprou, A. J. Urquhart, S. N. Yannopoulos, I. S. Vizirianakis, S. Zhang, S. Koutsopoulos, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 8184–8189; b) J. J. Panda, V. S. Chauhan, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 4418–4436.
- [2] a) J. B. Matson, S. I. Stupp, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 26–33; b) H. Hosseinkhani, P. D. Hong, D. S. Yu, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4837–4861; c) R. Ravichandran, M. Griffith, J. Phopase, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 8466–8478.
- [3] D. Li, E. M. Jones, M. R. Sawaya, H. Furukawa, F. Luo, M. Ivanova, S. A. Sievers, W. Wang, O. M. Yaghi, C. Liu, D. S. Eisenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 18044–18051.
- [4] G. W. Collie, K. P. Ziach, C. M. Lombardo, J. Fremaux, F. Rosu, M. Decossas, L. Mauran, O. Lambert, V. Gabelica, C. D. Mackereth, G. Guichard, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 871–878.
- [5] B. E. I. Ramakers, J. C. M. Hest, D. W. P. M. van Löwik, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 2743–2756.
- [6] a) L. Adler-Abramovich, E. Gazit, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6881–6893; b) H. Cui, M. J. Webber, S. I. Stupp, *Biopolymers* **2010**, *94*, 1–18; c) S. Fleming, R. V. Ulijn, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 8150–8177.
- [7] a) N. Ponnuswamy, F. B. L. Cougnon, J. M. Clough, G. Dan Pantos, J. K. M. Sanders, *Science* **2012**, *338*, 783–785; b) N. Ponnuswamy, F. B. L. Cougnon, G. Dan Pantos, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8243–8251; c) J. M. A. Carnall, C. A. Waudby, A. M. Belenguer, M. C. A. Stuart, J. J. P. Peyralans, S. Otto, *Science* **2010**, *327*, 1502–1506; d) J. W. Sadownik, R. V. Ulijn, *Curr. Opin. Biotech.* **2010**, *21*, 401–411; e) R. L. Schoch, L. E. Kapiros, R. Y. H. Lim, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 16911–16916. f) A. Pal, M. Malakoutikhah, G. Leonetti, M. Tezcan, M. Colomb-Delsuc, V. D. Nguyen, J. van der Gucht, S. Otto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7852–7856; g) A. Moure, S. V. Luis, I. Alfonso, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5496–5500; h) Y. Krishnan-Ghosh, S. Balasubramanian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2171–2173.
- [8] a) T. Friščić, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3493–3510; b) D. W. R. Balkenende, S. Coulibaly, S. Balog, Y. C. Simon, G. L. Fiore, C. Weder, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 10493–10498.
- [9] H. Jędrzejewska, M. Wierzbicki, P. Cmoch, K. Rissanen, A. Szumna, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13760–13764.
- [10] M. Grajda, M. Wierzbicki, P. Cmoch, A. Szumna, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 11597–11601.
- [11] G. R. L. Cousins, S. A. Poulsen, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **1999**, 1575–1576.
- [12] a) R. T. S. Lam, A. Belenguer, S. L. Roberts, C. Naumann, T. Jarrosson, S. Otto, J. K. M. Sanders, *Science* **2005**, *308*, 667–669; b) D. W. R. Balkenende, S. Coulibaly, S. Balog, Y. C. Simon, G. L. Fiore, C. Weder, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 10493–10498; c) F. B. L. Cougnon, J. K. M. Sanders, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2211–2221.

- [13] a) J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21; b) V. T. Bhat, A. M. Caniard, T. Luksch, R. Brenk, D. J. Campopiano, M. F. Greaney, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 490–497.
- [14] a) A. Dirksen, S. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15602–15603; b) P. Crisalli, E. T. Kool, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1184–1189.
- [15] a) Y. S. Park, J. Park, K. Paek, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6006–6009; b) Y. S. Park, J. Park, K. Paek, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 6316–6318.
- [16] a) N. Galić, I. Brođanac, D. Kontrec, S. Miljanić, *Spectrochim. Acta A* **2013**, *107*, 263–270; b) A. Manimekalai, N. Saradhadevi, A. Thiruvalluvar, *Spectrochim. Acta A* **2010**, *77*, 687–695; c) V. I. Minkin, A. V. Tsukanov, A. D. Dubonosov, V. A. Bren, *J. Mol. Struct.* **2011**, *998*, 179–191.
- [17] a) H. Gan, B. C. Gibb, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1656–1658; b) M. Chas, G. Gil-Ramirez, P. Ballester, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3402–3405; c) M. Chas, G. Gil-Ramirez, E. C. Escudero-Adan, J. Benet-Buchholz, P. Ballester, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1740–1743; d) D. Ajami, J. L. Hou, T. J. Dale, E. Barrett, J. Rebek, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 10430–10434; e) E. S. Barrett, T. J. Dale, J. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2344–2350; f) D. Braekers, C. Peters, A. Bogdan, Y. Rudzevich, V. Bohmer, J. F. Desreux, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 701–706; g) A. Wu, L. Isaacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4831–4835.
- [18] S. Hovmoller, T. Zhou, T. Ohlson, *Acta Cryst.* **2002**, *D58*, 768–776.
- [19] B. Rees, L. Jenner, M. Yusupov, *Acta Cryst.* **2005**, *D61*, 1299–1301.
- [20] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Cryst.* **2009**, *42*, 339–341.
- [21] M. Chwastyk, M. Jaskolski, M. Cieplak, *FEBS J.* **2014**, *281*, 416–429.
- [22] G. B. Adams, M. O’Keeffe, R. S. Ruoff, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 9465–9469.
- [23] T. Iwamoto, Y. Watanabe, H. Takaya, T. Haino, N. Yasuda, S. Yamago, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 14061–14068.
- [24] A. S. Filatov, M. V. Ferguson, S. N. Spisak, B. Li, C. F. Campana, M. A. Petrukhnina, *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14*, 756–762.
- [25] I. Sanchez-Molina, C. G. Claessens, B. Grimm, D. M. Guldiand, T. Torres, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1338–1344.
- [26] X. Fang, Y. Z. Zhu, J. Y. Zheng, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 1184–1191.
- [27] N. Kishi, M. Akita, M. Yoshizawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3604–3607.
- [28] T. Matsuno, S. Sato, R. Iizuka, H. Isobe, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 909–916.
- [29] a) H. Wu, L. Lin, P. Wang, S. Jiang, Z. Dai, X. Zou, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10659–10661; b) M. Calvaresi, F. Arnesano, S. Bonacchi, A. Bottoni, V. Calò, S. Contè, G. Falini, S. Fermani, M. Losacco, M. Montalti, G. Natile, L. Prodi, F. Sparla, F. Zerbetto, *ACS Nano* **2014**, *8*, 1871–1877.
- [30] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian 09, Revision B.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [31] N. Ponnuswamy, G. D. Pantoş, M. M. J. Smulders, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 566–573.
- [32] G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* **2008**, *A64*, 112–122.
- [33] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read, *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674.
- [34] M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. W. Leslie, A. McCoy, *Acta Crystallogr.* **2011**, *D67*, 235–242.
- [35] M. Wierzbicki, M. Gilski, K. Rissanen, M. Jaskolski, A. Szumna, *CrystEngComm* **2014**, *16*, 3773–3780.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ

DEPARTMENT OF
CHEMISTRY



Academy Professor Kari Rissanen, FRSC
Department of Chemistry
Nanoscience Center
University of Jyväskylä
Finland
Puh. +358-14-2602672
FAX. +358-14-2602651
E-mail: kari.t.rissanen@jyu.fi

14.12.2015

TO WHOM IT MAY CONCERN

Statement of contribution

Hereby I would like to claim that my contribution to the papers:

- “Experiences with applications of macromolecular tools in supramolecular crystallography” (M. Wierzbicki, M. Gilski, K. Rissanen, M. Jaskólski, A. Szumna, *CrystEngComm*, 2014, **16**, 3773-3780) was as follows: attempts to solve one crystal structure using *ab initio* methods and participation in the refinement of the solved structure.
- and “Dynamic Formation of Hybrid Peptidic Capsules by Chiral Self-sorting and Self-assembly” (H. Jędrzejewska, M. Wierzbicki, P. Cmoch, K. Rissanen, A. Szumna, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 13760-13764) was as follows: performing one X-ray diffraction experiment and the data processing for the said experiment.

Jyväskylä, 14th December, 2015

Kari Rissanen, Dr., Academy Professor, FRSC
Head of the Organic Chemistry

Postal address:
P.O. Box 35
FI-40014 University of Jyväskylä
Finland
Street address:
Survontie 9
FI-40500 Jyväskylä

Telephone: www.jyu.fi
+358 14 260 1211 BIC
Office: 0245894-7
+358 14 260 2500
Telefax:
+358 14 260 2501



INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY

POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Agnieszka Szumna, Assoc. Prof.
Head of Molecular Recognition Group
Institute of Organic Chemistry
Polish Academy of Sciences
ul. Kasprzaka 44/52
01-224 Warsaw
Phone: +48 (22) 343 21 10
Email: agnieszka.szumna@icho.edu.pl

January 12, 2016

Statement of contribution

Hereby I would like to claim that my contribution to the papers:

- "Mechanochemical Encapsulation of Fullerenes in Peptidic Containers Prepared by Dynamic Chiral Self-sorting and Self-assembly" M. Szymański, M. Wierzbicki, M. Gilski, H. Jędrzejewska, M. Sztylko, P. Cmoch, A. Shkurenko, M. Jaskolski, A. Szumna, *Chem. Eur. J.*, 2016, accepted.
- "Dynamic Formation of Hybrid Peptidic Capsules by Chiral Self-sorting and Self-assembly" H. Jędrzejewska, M. Wierzbicki, P. Cmoch, K. Rissanen, A. Szumna, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 13760-13764.
- "Experiences with applications of macromolecular tools in supramolecular crystallography" M. Wierzbicki, M. Gilski, K. Rissanen, M. Jaskólski, A. Szumna, *CrystEngComm*, 2014, **16**, 3773-3780.
- "Inherently Chiral Iminoresorcinarenes through Regioselective Unidirectional Tautomerization" M. Grajda, M. Wierzbicki, P. Cmoch, A. Szumna, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 11597-11601.
- "Assembly-driven synthesis of hybrid molecular capsules controlled by chiral sorting" M. Wierzbicki, A. Szumna, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 3860-3862.
- M. Wierzbicki, H. Jędrzejewska, A. Szumna, "Chemistry, Molecular Sciences and Engineering" edited by Jan Reedijk, Elsevier, 2013, chapter "Chiral calixarenes"

was as follows: advisory work as well as the correction of final manuscripts.

Agnieszka Szumna

Agnieszka Szumna

Prof. Mariusz Jaskólski
Department of Crystallography
Faculty of Chemistry
A. Mickiewicz University
Poznan

Statement of contribution

Hereby I would like to state that my contribution to the papers:

- "Mechanochemical Encapsulation of Fullerenes in Peptidic Containers Prepared by Dynamic Chiral Self-sorting and Self-assembly" M. Szymański, M. Wierzbicki, M. Gilski, H. Jędrzejewska, M. Sztylko, P. Cmoch, A. Shkurenko, M. Jaskolski, A. Szumna, *Chem. Eur. J.*, accepted.
- "Experiences with applications of macromolecular tools in supramolecular crystallography" M. Wierzbicki, M. Gilski, K. Rissanen, M. Jaskólski, A. Szumna, *CrystEngComm*, 2014, **16**, 3773-3780.

was as follows: conceptual work, consultations on crystallographic calculations, and correction of the final manuscripts.



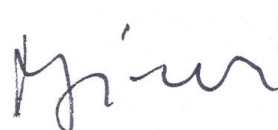
Mariusz Jaskólski

Statement of contribution

Hereby I would like to claim that my contribution to the papers:

- "Mechanochemical Encapsulation of Fullerenes in Peptidic Containers Prepared by Dynamic Chiral Self-sorting and Self-assembly" M. Szymański, M. Wierzbicki, M. Gilski, H. Jędrzejewska, M. Sztylko, P. Cmoch, A. Shkurenko, M. Jaskolski, A. Szumna, *Chem. Eur. J.*, 2015, accepted.
- "Experiences with applications of macromolecular tools in supramolecular crystallography" M. Wierzbicki, M. Gilski, K. Rissanen, M. Jaskólski, A. Szumna, *CrystEngComm*, 2014, **16**, 3773-3780.

was as follows: participation in solution and refinement of the crystal structures.



Mirosław Gilski

Thuwal 23955-5900 Saudi Arabia
+966 (12) 808-3256 or 808-3307



December 9, 2015

TO WHOM IT MAY CONCERN

Statement of contribution

Hereby I would like to claim that my contribution to the paper: "Mechanochemical Encapsulation of Fullerenes in Peptidic Containers Prepared by Dynamic Chiral Self-sorting and Self-assembly " (M. Szymański, M. Wierzbicki, M. Gilski, H. Jędrzejewska, M. Sztylko, P. Cmoch, A. Shkurenko, M. Jaskolski, A. Szumna, Chem. Eur. J., accepted) was as follows: performing two X-ray diffraction measurements.



Aleksander Shkurenko



INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY

POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Hanna Jędrzejewska
Institute of Organic Chemistry
Polish Academy of Sciences
ul. Kasprzaka 44/52
01-224 Warsaw
Phone: +48 (22) 343 21 10
Email: hanna.jedrzejewska@icho.edu.pl

January 12, 2016

Statement of contribution

Hereby I would like to claim that my contribution to the papers:

- "Mechanochemical Encapsulation of Fullerenes in Peptidic Containers Prepared by Dynamic Chiral Self-sorting and Self-assembly " (M. Szymański, M. Wierzbicki, M. Gilski, H. Jędrzejewska, M. Sztylko, P. Cmoch, A. Shkurenko, M. Jaskolski, A. Szumna, *Chem. Eur. J.*, 2016, accepted) was as follows: performing DFT calculations and participation in the editorial work.
- "Dynamic Formation of Hybrid Peptidic Capsules by Chiral Self-sorting and Self-assembly" (H. Jędrzejewska, M. Wierzbicki, P. Cmoch, K. Rissanen, A. Szumna, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 13760-13764) was as follows: performing the synthesis of all chemical compounds.
- M. Wierzbicki, H. Jędrzejewska, A. Szumna, "Chemistry, Molecular Sciences and Engineering" edited by Jan Reedijk, Elsevier, 2013, chapter "Chiral calixarenes" was as follows: participation in the literature search and the editorial work.

Hanna Jędrzejewska

Hanna Jędrzejewska



INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY

POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Dr Piotr Cmoch
Institute of Organic Chemistry
Polish Academy of Sciences
ul. Kasprzaka 44/52
01-224 Warsaw
Phone: +48 (22) 343 25 52
Email: piotr.cmoch@icho.edu.pl

January 12, 2016

Statement of contribution

Hereby I would like to claim that my contribution to the papers:

- "Mechanochemical Encapsulation of Fullerenes in Peptidic Containers Prepared by Dynamic Chiral Self-sorting and Self-assembly" M. Szymański, M. Wierzbicki, M. Gilski, H. Jędrzejewska, M. Sztylko, P. Cmoch, A. Shkurenko, M. Jaskolski, A. Szumna, *Chem. Eur. J.*, accepted.
- "Dynamic Formation of Hybrid Peptidic Capsules by Chiral Self-sorting and Self-assembly" H. Jędrzejewska, M. Wierzbicki, P. Cmoch, K. Rissanen, A. Szumna, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 13760-13764.
- "Inherently Chiral Iminoresorcinarenes through Regioselective Unidirectional Tautomerization" M. Grajda, M. Wierzbicki, P. Cmoch, A. Szumna, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 11597-11601.

was as follows: optimization and registration of multinuclear NMR experiments.


Piotr Cmoch



INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY

POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Marek Szymański
Institute of Organic Chemistry
Polish Academy of Sciences
ul. Kasprzaka 44/52
01-224 Warsaw
Phone: +48 (22) 343 21 01
Email: marass26@gmail.com

January 11, 2016

Statement of contribution

Hereby I would like to claim that my contribution to the paper: "Mechanochemical Encapsulation of Fullerenes in Peptidic Containers Prepared by Dynamic Chiral Self-sorting and Self-assembly" (M. Szymański, M. Wierzbicki, M. Gilski, H. Jędrzejewska, M. Sztylko, P. Cmoch, A. Shkurenko, M. Jaskolski, A. Szumna, *Chem. Eur. J.*, 2016, accepted) was as follows: participation in the synthesis of all compounds.

Marek Szymański
Marek Szymański



INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY

POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Marcin Grajda

Institute of Organic Chemistry

Polish Academy of Sciences

ul. Kasprzaka 44/52

01-224 Warsaw

Phone: +48 (22) 343 21 01

Email: marcin.grajda@icho.edu.pl

January 11, 2016

Statement of contribution

Hereby I would like to claim that my contribution to the paper: "Inherently Chiral Iminoresorcinarenes through Regioselective Unidirectional Tautomerization" (M. Grajda, M. Wierzbicki, P. Cmoch, A. Szumna, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 11597-11601) was as follows: performing the synthesis of one of the chemical compounds described.

Marcin Grajda

Subject: Decision on your Manuscript chem.201504451R1 for Chemistry - A European Journal

Date: 9 Dec 2015 04:06:27 -0500

From: "ChemEurJ" <em@editorialmanager.com>

To: "Agnieszka Szumna" <agnieszka.szumna@icho.edu.pl>

Reply-To: "ChemEurJ" <chemistry@wiley-vch.de>

Title: "Mechanochemical Encapsulation of Fullerenes in Peptidic Containers Prepared by Dynamic Chiral Self-sorting and Self-assembly"

Dear Professor Szumna,

Thank you for your submission of 05 Nov 2015. We are pleased to inform you that the revised version of the above-mentioned manuscript has now been accepted for publication in Chemistry - A European Journal.

To facilitate the production process, and allow the publication of your manuscript as soon as possible, please ensure that your manuscript conforms to the checklist given under:

[CHECKLIST and COST CONFIRMATION](#)

If your article contains color pictures, your contribution to the color costs amounts to 595.00 Euro for the first color figure and 495.00 for each color figure thereafter, with a discount for five or more figures. The color graphic for the Table of Contents will be reproduced at no extra cost. Please confirm that you are willing to pay these costs by completing the form given in the above link.

Please collect the following files for the upload:

- 1) The text file including all pictures, tables, captions, Table-of-Contents, and keywords should be submitted as one word document ("Manuscript").
- 2) In addition to this file, easy-to-handle formats of your artwork such as ChemDraw, and/or Windows metafiles, pict, Photoshop, high-resolution JPEG, TIF, EPS, or PDF files are requested if available. The quality of the graphical material is of particular importance: low-resolution JPEG and GIF files are not suitable. Please save each formula, figure, scheme, and picture for the Table-of-Contents in a separate file ("Graphical Material"). Note: to avoid having to upload multiple files individually, collect all graphical materials in a single compressed (".zip") folder and upload this as the "Graphical Material"; the system will automatically list each file separately thus saving you time.
- 3) Add any Supporting Information data, if applicable, as a single PDF file. Please do not include the title of the article and author names, this will be inserted automatically ("Supporting Information").

To submit your production data, go to <http://chemistry.edmgr.com/> and log in with your username (Your username is: szumnaa-799) and password. If you have forgotten your password, please use the "Send Access Credentials" option given on the login screen. Once in the system choose "Submit Task" under "Current Task Assignments" in the "Production" section. Please note that for technical reasons it may take a few minutes after receipt of this message for the manuscript to appear in this list.

You will shortly receive an email instructing you on the completion of our legal statement. It is a legal requirement for Wiley-VCH to receive a signed Copyright Transfer Agreement (or Open Access Agreement for OnlineOpen articles) before publication of your contribution can proceed. Thus, we kindly ask that you give this matter your prompt attention.

We look forward to receiving the final version of this fine paper soon.

With kind regards,

Dr. Anne Nijs
Associate Editor
Chemistry - A European Journal



INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Dr hab. Agnieszka Szumna, Prof. Nadzw.
Kierownik zespołu 9
ul. Kasprzaka 44/52
01-224 Warszawa
Tel. (22) 3432110
Fax.: (22) 632 66 81
E-mail: agnieszka.szumna@icho.edu.pl

Warszawa, 19 stycznia 2016

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że w okresie powstawania publikacji naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr. inż. Michała Wierzbickiego, współautorzy tych prac pełnili następujące funkcje:

1. Marcin Grajda – magistrant w naszym zespole, będący pod bezpośrednią opieką mgr. inż. Michała Wierzbickiego.
2. Marek Szymański – student – licencjusz w naszym zespole, będący pod bezpośrednią opieką mgr. inż. Michała Wierzbickiego.
3. Marcin Sztylko – uczeń liceum odbywający praktyki w naszym zespole, będący pod bezpośrednią opieką mgr. inż. Michała Wierzbickiego.
4. Hanna Jędrzejewska – mgr inż., doktorantka w naszym zespole.
5. Piotr Cmoch – doktor, specjalista NMR, pracownik pracowni usługowej NMR ICHO PAN.
6. Aleksander Shkurenko – doktorant ICHF PAN z zespołu prof. Kingi Suwińskiej, obsługujący dyfraktometr.
7. Mirosław Gilski – doktor, specjalista od pomiarów synchrotronowych, pracownik z grupy prof. Jaskólskiego UAM w Poznaniu.
8. Mariusz Jaskólski – profesor, kierownik grupy zajmującej się krystalografią makromolekuł w UAM oraz ICB PAN w Poznaniu
9. Kari Rissanen – profesor, University of Jyväskylä, Finlandia, krystalograf, pomiary dyfraktometryczne.
10. Agnieszka Szumna – dr hab., promotor, kierownik grupy badawczej ICHO PAN.

Agnieszka Szumna



INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY

POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Marcin Sztylko
Institute of Organic Chemistry
Polish Academy of Sciences
ul. Kasprzaka 44/52
01-224 Warsaw
Phone: +48 (22) 343 21 01
Email: marcin.sztylko@gmail.com

January 14, 2016

Statement of contribution

Hereby I would like to claim that my contribution to the paper: "Mechanochemical Encapsulation of Fullerenes in Peptidic Containers Prepared by Dynamic Chiral Self-sorting and Self-assembly" (M. Szymański, M. Wierzbicki, M. Gilski, H. Jędrzejewska, M. Sztylko, P. Cmoch, A. Shkurenko, M. Jaskolski, A. Szumna, *Chem. Eur. J.*, 2016, accepted) was as follows: participation in the conceptual work on fullerene complexes.



Marcin Sztylko

Marcin Sztylko

B. Org. 382/16

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.382/16



9000000193736