



**Instytut Farmakologii  
im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk**



**UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE**

**Wojciech Pietruś**

**The role and importance of fluorine in the rational drug design on  
the example of selected class A GPCR receptors**

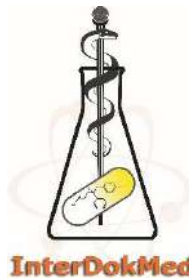
**Rola i znaczenie fluoru w racjonalnym projektowaniu leków na  
przykładzie wybranych receptorów klasy A GPCR**

Pracę doktorską wykonano w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii  
im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

promotor – dyscyplina: nauki farmaceutyczne  
dr hab. Rafał Kurczab

promotor – dyscyplina: nauki chemiczne  
dr hab. Justyna Kalinowska-Tłuścik

***Kraków, 2022***



Rozprawa doktorska powstała w trakcie realizacji  
Środowiskowych Studiów Doktoranckich  
w ramach Projektu nr POWR.03.02.00-00-I013/16,  
"Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej" InterDokMed,  
realizowanych w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020,  
współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego



Pragnę serdecznie podziękować wszystkim osobom, dzięki pomocy których powstała niniejsza praca doktorska;

szczególnie:

**Dr hab. Rafałowi Kurczabowi**, który od pierwszego roku studiów inspirował mnie swoją wiedzą, zaangażowaniem i profesjonalizmem oraz wskazywał drogę pozwalając mi jednocześnie podejmować samodzielne decyzje. Szczególnie chciałbym mu podziękować za niespożyte zasoby cierpliwości, które okazywał mi przez 11 lat współpracy. Przekazał mi wiele – szczególnie pasję i motywację do podejmowania się nowych, często trudnych tematów. Oprócz życia naukowego, wielokrotnie okazał się być świetnym przyjacielem.

**Prof. dr hab. Andrzejowi Bojarskiemu**, który zawsze służył pomocą i angażował się w każdą powstałą pracę. Jego nieocenione pytania, które pomogły wielokrotnie rozwinąć badany temat i zaplanować kolejne eksperymenty.

**Dr hab. Justynie Kalinowskiej-Tłuścik**, za wiele merytorycznych rozmów i dyskusji na każdy naukowy temat, co pozwoliło mi się rozwinąć w nowych dla mnie dziedzinach nauki.

**Dr Ewie Machalskiej**, która przez 11 lat wspólnej drogi studiów była nieocenioną pomocą pod wieloma względami.

Wszystkim **Kolegom i Koleżankom** z Zakładu Chemii Leków za wiele rozmów - merytorycznych, naukowych, jak również świetnie spędzony czas.

**Prof. dr hab. Małgorzacie Barańskiej** za owocną współpracę i zaangażowanie w prowadzonych badaniach ramanowskich oraz **Prof. Jürgenowi Bajorath** za niespotykaną życzliwość, pomoc i chęć współpracy, która pozwoliła na rozwinięcie współpracy pomiędzy naszymi jednostkami.

Chciałbym podziękować **Rodzinie** i moim najlepszym **Przyjaciółom** (Karolowi Brożkowi, Dawidowi Majerczakowi i Marcinowi Krówce), którzy wierzyli we mnie i wspierali mnie w cięższych chwilach i którzy zawsze byli gotowi wysłuchać mojego narzekania.

Badania będące przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej były finansowane ze środków statutowych Zakładu Chemii Leków, jak również dzięki grantowi **Preludium 2019/35/N/NZ7/04312**, pt. „Podstawienie fluorem – nowy algorytm zwiększania aktywności biologicznej” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN).

Praca została wykonana z wykorzystaniem Infrastruktury PLGrid.

## *Abstract*

Nowadays, fluorine is a commonly used element in all aspects of everyday life, e.g. in the pharmaceutical, military, or electromechanical industries. Due to its highest electronegativity amongst the elements of the periodic table, fluorine substitution affects many physicochemical properties of molecules, including acidity of adjacent functional groups, amine alkalinity, bioavailability, lipophilicity, metabolic stability. Currently, fluorination of designed drugs has become a standard strategy aimed at increasing bioavailability and optimizing their biological activity. In the last decade, nearly 30% of the FDA-approved drugs contained fluorine, and fluorinated pharmaceuticals account for over 50% of the most profitable drugs in the world.

The results show that the fluorine substitution significantly changes the basicity of the amino group, the acidity of protons in the aromatic ring, and reduces the availability of a free electron pair at the nitrogen atom (especially in the *meta*-fluoro derivative). In the difluorinated derivatives of 4-halogenoaniline, fluorine becomes a competitive and attractive acceptor for halogen (XB) and hydrogen (HB) bonds and increases the probability of halogen-halogen interactions ( $\text{Cl}\cdots\text{F}$ ,  $\text{Br}\cdots\text{F}$ ,  $\text{F}\cdots\text{F}$ ), partially by increasing the size of the  $\sigma$ -holes at the halogen atoms. Additionally, unlike classical HBs (e.g.,  $\text{N}-\text{H}\cdots\text{N}$ ,  $\text{O}-\text{H}\cdots\text{N}$ ), hydrogen bonds with fluorine lead to a shift of the bands of donor stretching groups towards higher wavenumbers. The obtained results suggest, that fluorine prefers a hydrophobic environment in biological systems, and does not form strong, stabilizing intermolecular interactions with biomolecules, being a weak HB acceptor for all types of donors. It should be emphasized that the energy of HB with fluorine is determined less by the angular parameter of these interactions, but mostly by the acceptor-donor distance, which is related to the three free electron pairs of fluorine.

Activity cliffs analysis for ligands of aminergic G protein-coupled receptors class A indicates that the fluorination at the *ortho* position of the aromatic ring is preferred, while fluorination of aliphatic fragments usually decreases the biological activity. Additionally, fluorine can be used to increase the  $\sigma$ -hole size for the remaining halogens in the molecule and increases the energy of halogen bonds in biological systems.

## Streszczenie

Obecnie fluor jest powszechnie wykorzystywanym pierwiastkiem we wszystkich sferach życia codziennego, jak np. w przemyśle farmaceutycznym, militarnym czy elektromaszynowym. Ze względu na jego najwyższą elektroujemność wśród pierwiastków układu okresowego, podstawienie fluorem wpływa na wiele właściwości fizykochemicznych cząsteczek, m.in. kwasowość sąsiadujących grup funkcyjnych, zasadowość amin, biodostępność, lipofilowość, stabilność metaboliczną. W dzisiejszych czasach, fluorowanie projektowanych leków stało się standardową strategią mającą na celu zwiększenie biodostępności oraz optymalizacji aktywności biologicznej. Tylko w ostatniej dekadzie niemal 30% leków zatwierdzonych przez FDA zawierało fluor, a fluorowane farmaceutyki stanowią ponad 50% najbardziej dochodowych leków na świecie.

Badania prowadzone w ramach przedstawionej pracy doktorskiej wskazują, że wprowadzenie podstawnika fluorowego istotnie zmienia zasadowość grupy aminowej oraz kwasowość protonów znajdujących się w pierścieniu aromatycznym, jednocześnie zmniejszając dostępność wolnej pary elektronowej azotu (szczególnie w *meta*-fluoro pochodnej). W difluorowanych pochodnych 4-halogenoanilin fluor staje się konkurencyjnym i atrakcyjnym akceptorem dla wiązań halogenowych (XB) i wodorowych (HB) oraz zwiększa prawdopodobieństwo powstania oddziaływań halogen-halogen ( $\text{Cl}\cdots\text{F}$ ,  $\text{Br}\cdots\text{F}$ ,  $\text{F}\cdots\text{F}$ ), częściowo poprzez zwiększenie rozmiaru  $\sigma$ -dziury na atomach halogenu. Dodatkowo, w przeciwieństwie do klasycznych HB (np.  $\text{N-H}\cdots\text{N}$ ,  $\text{O-H}\cdots\text{N}$ ), wiązania wodorowe z fluorem powodują przesunięcie pasm drgań rozciągających grup donorowych w kierunku wyższych liczb falowych. Wyniki sugerują, że fluor preferuje hydrofobowe środowisko w układach biologicznych, jednak nie tworzy on silnych, stabilizujących oddziaływań międzycząsteczkowych z biomolekułami i jest słabym akceptorem HB dla wszystkich typów grup donorowych. Należy również podkreślić, że na energię HB z akceptorem fluorowym wpływa nie kątowy parametr tych oddziaływań a jedynie odległość donor-akceptor HB, co jest związane z trzema wolnymi parami elektronowymi fluoru.

Analiza klifów aktywności dla ligandów aminergicznych receptorów sprzężonych z białkiem G klasy A wskazuje, że korzystnym miejscem dla fluorowania ligandów tych białek w pierścieniu aromatycznym jest pozycja *orto*, natomiast fluorowanie fragmentów alifatycznych najczęściej prowadzi do spadku aktywności biologicznej. Dodatkowo, fluor może być wykorzystany do zwiększenia rozmiaru  $\sigma$ -dziury pozostałych halogenów w cząsteczce i zwiększenia energii wiązań halogenowych w układach biologicznych.

Wykaz skrótów

PDB	<i>Protein Data Bank</i>	baza danych, gromadząca dane o strukturze przestrzennej biomolekuł
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>	Amerykańska agencja ds. żywności i leków
CSD	<i>The Cambridge Structural Database</i>	krystalograficzna baza danych związków organicznych i metaloorganicznych
ADME	<i>A – adsorbtion D – distribution M – metabolism E – elimination</i>	akronim odzwierciedlający losy leku w ustroju (wchłanianie, rozmieszczenie, metabolizm oraz wydalanie)
IR	<i>Infrared Spectroscopy</i>	spektroskopia w podczerwieni
XRD	<i>X-ray Diffraction</i>	rentgenografia strukturalna
DFT	<i>Density Functional Theory</i>	teoria funkcjonału gęstości
HF	<i>Hartree-Fock</i>	metoda Hartree-Focka
EPS	<i>Electrostatic Potential Surface</i>	powierzchnia potencjału elektrostatycznego
MD	<i>Molecular Dynamics</i>	dynamika molekularna
AIMD	<i>Ab Initio Molecular Dynamics</i>	dynamika molekularna <i>ab initio</i>
PCM	<i>Polarizable continuum model</i>	uwzględnienie efektów rozpuszczalnika
CP2K		pakiet oprogramowania, służącego do obliczeń dynamiki molekularnej <i>ab initio</i>
QTAIM	<i>Quantum Theory Atom In Molecules</i>	kwantowa teoria atomów w cząsteczkach
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>	receptory sprzężone z białkiem G
AC	<i>Activity cliffs</i>	klify aktywności

## Spis treści

1. Spis publikacji stanowiących podstawę doktoratu .....	9
2. Wstęp .....	10
2.1. Fluor .....	10
2.1.1. Oddziaływania niekowalencyjne z fluorem .....	11
2.1.2. Fluor w chemii medycznej .....	14
2.2. Metody oparte na oddziaływaniu materii ze światłem .....	17
2.2.1. Spektroskopia oscylacyjna .....	18
2.2.2. Rentgenografia strukturalna .....	21
2.3. Metody obliczeniowe .....	22
2.3.1. Dynamika Molekularna <i>Ab Initio</i> (AIMD) .....	22
2.3.2. <i>Quantum Theory Atom in Molecule</i> (QTAIM) .....	23
2.3.3. Analiza dekompozycji energii (ETS-NOCV) .....	24
2.3.4. Klify aktywności (AC) .....	25
3. Cel badań .....	27
4. Metody i materiały .....	28
5. Wyniki .....	31
5.1. Wpływ fluoru na siłę oraz tendencję tworzenia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych i halogenowych w układach modelowych .....	31
5.1.1. Wpływ fluoru na wiązania wodorowe w układzie modelowym aniliny .....	31
5.1.2. Wpływ fluoru na międzycząsteczkowe wiązania niekowalencyjne w modelowym układzie <i>para</i> -halogenoanilin .....	34
5.2. Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe z fluorem w układach biologicznych ....	39
5.3. Klify aktywności na przykładzie fluorowanych ligandów aminergiczych receptorów klasy A GPCR .....	44
5.4. Modulowanie aktywności biologicznej znanych leków poprzez wprowadzanie atomu halogenu .....	48
6. Wnioski .....	52
7. Bibliografia .....	55
8. Wszystkie publikacje w dorobku naukowym .....	64
9. Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej .....	66
10. Oświadczenie współautorów	



## 1. Spis publikacji stanowiących podstawę doktoratu

**P1:** W. Pietruś, R. Kurczab, R. Kafel, E. Machalska, J. Kalinowska-Tłuścik, A. Hogendorf, M. Żylewski, M. Baranska, A. J. Bojarski, *How can fluorine directly and indirectly affect the hydrogen bonding in molecular systems? – A case study for monofluoroanilines*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2021**, 252, 119536; doi: 10.1016/j.saa.2021.119536

IF<sub>2020</sub> = 4,098, MNiSW<sub>2021</sub> = 140

**P2:** W. Pietruś, R. Kurczab, J. Kalinowska-Tłuścik, E. Machalska, D. Golonka, M. Barańska, A. J. Bojarski, *Influence of Fluorine Substitution on Nonbonding Interactions in Selected Para-Halogeno Anilines*, *ChemPhysChem* **2021**, 22, 2115, doi: 10.1002/cphc.202100383

IF<sub>2020</sub> = 3,102, MNiSW<sub>2021</sub> = 100

**P3:** W. Pietruś, R. Kafel, A. J. Bojarski, R. Kurczab, *Hydrogen Bonds with Fluorine in Ligand–Protein Complexes-the PDB Analysis and Energy Calculations*, *Molecules*, **2022**, 27(3), 1005, doi: 10.3390/molecules27031005

IF<sub>2020</sub> = 4,411, MNiSW<sub>2021</sub> = 140

**P4:** W. Pietruś, R. Kurczab, D. Stumpfe, A. J. Bojarski, J. Bajorath, *Data-Driven Analysis of Fluorination of Ligands of Aminergic G Protein Coupled Receptors*, *Biomolecules* **2021**, 11, 1647, doi: 10.3390/biom11111647

IF<sub>2020</sub> = 4,879, MNiSW<sub>2021</sub> = 100

**P5:** J. Staroń, W. Pietruś, R. Bugno, R. Kurczab, G. Satała, D. Warszycki, T. Lenda, A. Wantuch, A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, *Tuning the activity of known drugs via the introduction of halogen atoms, a case study of SERT ligands – Fluoxetine and fluvoxamine*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2021**, 220, 113533, doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113533

IF<sub>2020</sub> = 6,514, MNiSW<sub>2021</sub> = 140

**Sumaryczny IF<sub>2020</sub> – 23,004; średni IF<sub>2020</sub> – 4,60; punkty MNiSW<sub>2021</sub> = 620**

## 2. Wstęp

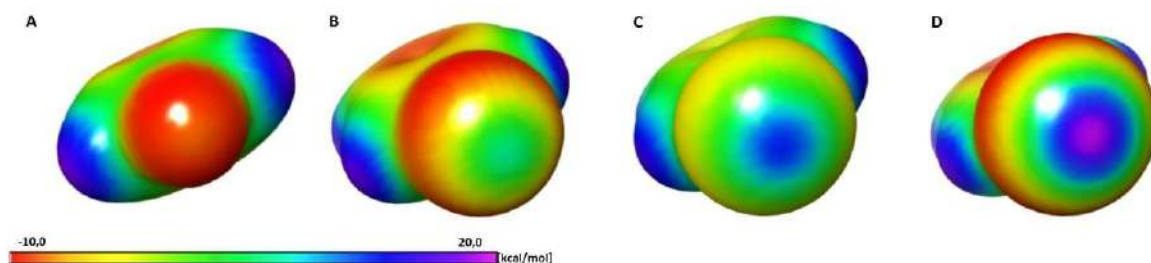
Obecnie fluor jest powszechnie wykorzystywanym pierwiastkiem np. w przemyśle farmaceutycznym, militarnym czy elektromaszynowym. Swoją popularność zyskał dzięki odkryciu podczas II wojny światowej politetrafluoroetyleny (teflonu), który ze względu na unikalne właściwości fizykochemiczne został użyty jako tworzywo do budowy bomb atomowych [1]. W tym samym czasie zaczęto stosować halotan (1,1,1-trifluoro-2-bromo-2-chloroetan), jako środek o silniejszych właściwościach usypiających w porównaniu do ówczesnie stosowanego chloroformu [2]. Prawdziwym przełomem stało się zaprojektowanie w 1954 roku pierwszego leku zawierającego w swojej strukturze fluor – fludrokortyzonu, który wykazywał wyższą aktywność biologiczną w stosunku do niepodstawionej cząsteczki [3]. Od tamtego czasu fluor stał się bardzo pożądanym podstawnikiem stosowanym w chemii medycznej, jednak ze względu na trudną syntezę fluorowanych pochodnych, niewiele leków zawierało ten pierwiastek w swoim strukturze. Wraz z rozwojem zaawansowanych metod syntezy organicznej sytuacja ta uległa zmianie, co umożliwiło opracowanie strategii ukierunkowanego wprowadzania tego pierwiastka do związków bioaktywnych, tak aby mogły się cechować pożądanymi właściwościami bio- oraz fizykochemicznymi (m.in. wysoką aktywnością biologiczną, stabilnością chemiczną, czy optymalną biodostępnością) [4].

### 2.1. Fluor

W środowisku fluor występuje głównie w dwóch minerałach: fluorycie oraz apatycie. W stanie gazowym jest dwuatomową cząsteczką o żółtej barwie i ostrym zapachu. Posiada trwały izotop  $^{19}\text{F}$  używany w spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), oraz  $^{18}\text{F}$  używany jako radioizotop w pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) [5,6]. Spośród wszystkich pierwiastków układu okresowego, fluor charakteryzuje się najwyższą elektroujemnością (4,11 według skali Allred'a–Rochow; 3,98 według skali Paulinga) [1]. Ze względu na wysoką elektroujemność, nieorganiczne związki fluoru posiadają unikalne właściwości, np. kwas fluorowodorowy jest najsilniejszym kwasem, którego moc można zwiększyć poprzez wprowadzenie do układu dodatkowych związków fluoru ( $\text{BF}_3$  czy  $\text{SbF}_5$ ), natomiast mieszanina  $\text{HSO}_3\text{F}$  z  $\text{SbF}_5$  tworzy tzw. „kwas magiczny” – najsilniejszy znany kwas, który wykazuje ujemną wartość pH nawet w rozcieńczonych roztworach [7].

W wyniku znacznej różnicy elektroujemności oraz silnej polaryzacji wiązania C–F, na atomach powstają wysokie wartości ładunków cząstkowych. W związku z tym jest to najsilniejsze wiązanie pojedyncze w chemii organicznej ( $105,4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) [8]. Fluor często

wykorzystywany jest jako izoster wodoru, gdyż nie ma znaczącego wpływu na geometrię cząsteczki związku organicznego, jednak porównanie promieni van der Waalsa ( $r_v(\text{H}) = 1,2 \text{ \AA}$ ,  $r_v(\text{F}) = 1,47 \text{ \AA}$ ,  $r_v(\text{O}) = 1,52 \text{ \AA}$ ) wskazuje, iż jest on bardziej zbliżony do atomu tlenu [9]. Choć wprowadzenie podstawnika fluorowego to drobna zmiana steryczna, może istotnie zmienić właściwości cząsteczki, np. modulować kwasowość grup  $-\text{COOH}$  lub  $-\text{OH}$  lub zasadowość grup aminowych, natomiast w układach aromatycznych wpływa w znaczący sposób na efekty rezonansowe oraz indukcyjne [8,9]. W odróżnieniu od pozostałych fluorowców występujących w układach organicznych, wyższa elektroujemność fluoru daje mu nieproporcjonalnie duży udział elektronów wiążących  $\sigma_{\text{C-X}}$ , co pomaga zneutralizować tzw.  $\sigma$ -dziurę (ang.  $\sigma$ -hole) (Rys. 1) [10].



**Rysunek 1.** Mapy rozkładu gęstości chmury elektronowej w układach aromatycznych podstawionych atomem halogenu: A) fluorem, B) chlorem, C) bromem, D) jodem. Na czerwono i niebiesko zaznaczono obszary wykazujące odpowiednio ładunek ujemny i dodatni.

Obserwowana dla większych halogenowców  $\sigma$ -dziura jest dodatnio naładowanym obszarem, powstającym wzdłuż osi wiązania  $\text{C-X}$ , w którym uczestniczą elektrony z orbitalu  $p_z$ . Trzy wolne pary elektronów niewiążących halogenu o konfiguracji  $s^2p_x^2p_y^2$ , tworzą pas o ujemnym ładunku. Taki rozkład ładunku powoduje odpływ elektronów z orbitalu  $p_z$  w stronę rezonansu pierścienia aromatycznego i powstanie elektrododatniego obszaru na „wierzchołku” halogenu [11,12].

### 2.1.1. Oddziaływania niekowalencyjne z fluorem

Ze względu na wysoką elektroujemność, fluor w związkach nieorganicznych występuje w postaci jonu  $\text{F}^-$ , tworząc głównie związki o charakterze jonowym. Dodatkowo, pod względem reaktywności  $\text{F}^-$  różni się znacznie od innych halogenków i jest silniej solwatowany w rozpuszczalnikach protonowych ze względu na mniejszy stosunek promienia do ładunku [13,14]. W związkach organicznych fluor tworzy silnie spolaryzowane i stabilne wiązanie kowalencyjne  $\text{C-F}$ , dlatego właściwości fluoru organicznego, a co za tym idzie charakter

oddziaływań, wykazują znaczące różnice [8]. Ze względu na specyfikę i zakres prowadzonych badań, w niniejszym rozdziale omówione zostaną oddziaływania niekowalencyjne fluoru w układach organicznych.

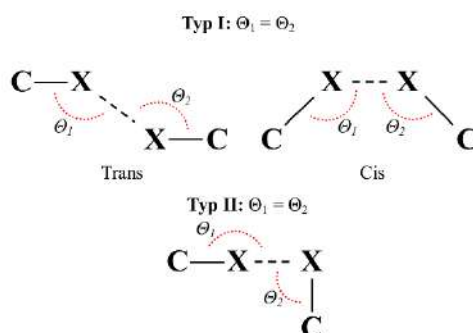
Fluor jest unikalnym halogenowcem, który wykazuje odmienne tendencje do tworzenia niekowalencyjnych oddziaływań w porównaniu z pozostałymi reprezentantami grupy, jak również z tlenowcami bądź węglowcami [15,16]. Badania statystyczne bazy struktur krystalicznych małych cząsteczek (CSD) wykazały, że fluor tworzy znaczną liczbę krótkich kontaktów z różnymi typami atomów (H, C, O czy pozostałymi halogenowcami). Wiele grup badawczych zajmuje się wyjaśnieniem natury i mechanizmu niekowalencyjnych oddziaływań z udziałem fluoru [17–25].

**Wiązanie wodorowe** (*hydrogen bond*, HB) jest przede wszystkim elektrostatycznym oddziaływaniem pomiędzy atomem wodoru (H) kowalencyjnie związanym z silnie elektroujemnym atomem donora (D) a innym elektroujemnym atomem akceptora (A), który posiada wolną parę elektronową [26]. Wiązania wodorowe wpływają na zmianę wielu właściwości fizykochemicznych, takich jak np. temperatura wrzenia czy gęstość [27]. W układach biologicznych wiązania wodorowe odpowiedzialne są za stabilizację drugo- i trzeciorzędowej struktury białek i kwasów nukleinowych, a także odgrywają istotną rolę w procesie tworzenia kompleksu ligand–receptor (L–R) [28]. Energia wiązania wodorowego zależy od odległości  $D \cdots A$ , kąta  $D-H \cdots A$ , elektroujemności, polaryzowalności oraz ładunku cząstkowego D i A. Zgodnie z wartościami entalpii tworzenia ( $\Delta H$ ), wiązania wodorowe można podzielić na trzy kategorie: słabe, średnie oraz silnie [29].

Fluor jako akceptor wiązań wodorowych był i wciąż jest przedmiotem badań i dyskusji, jednak w większości jest uznawany za słaby akceptor HB [8,18,30–33]. Jednym z najczęściej postulowanych powodów jest słaba polaryzowalność fluoru, związana z wysoką elektroujemnością i małą objętością [34]. Dodatkowo, właściwości akceptorowe fluoru zależą od hybrydyzacji związanego z nim atomu węgla (w układzie  $F-C(sp^3)$  fluor jest lepszym akceptorem, niż  $F-C(sp^2)$ ) i różnią się w układach alifatycznych i aromatycznych [35]. Zostało również potwierdzone eksperymentalnie, że własności akceptorowe fluoru są zależne od jego najbliższego otoczenia i rosną w szeregu  $CH_2F > CHF_2 > CF_3$  [36,37]. Jeżeli w układzie znajdują się inne polarne atomy, fluor staje się nieatrakcyjnym akceptorem i nie wykazuje tendencji do tworzenia wiązań wodorowych [21,35].

**Wiązanie halogenowe** (*halogen bond*, XB) jest oddziaływaniem często opisywanym jako analogiczne do HB. Zgodnie z definicją zaproponowaną przez IUPAC, powstaje ono pomiędzy obszarem elektrofilowym znajdującym się na atomie fluorowca w cząsteczce ( $\sigma$ -dziurą), a atomem o charakterze nukleofilowym w sąsiadującej molekuale (akceptor z wolną parą elektronową). Wiązanie halogenowe jest znacznie słabsze niż wodorowe, jednak pełni istotną rolę w chemii i biochemii [38–40]. Ze względu na wiążący charakter oddziaływania halogenowego, odległość  $X \cdots A$  jest krótsza niż suma promieni van der Waalsa, a  $\sigma$ -dziura i jej położenie odpowiada za powstanie, liniowość i siłę wiązania halogenowego [12,41]. Jednocześnie wielkość  $\sigma$ -dziury, a tym samym siła wiązania halogenowego, rośnie odwrotnie proporcjonalnie do elektroujemności halogenu [42,43]. Spośród wszystkich halogenowców, fluor wykazuje odmienne właściwości i często postulowane jest, że nie tworzy on wiązania halogenowego ze względu na brak  $\sigma$ -dziury. W przypadku obecności dodatkowych, bardzo silnie elektronoakceptorowych grup funkcyjnych w cząsteczce, fluor może wykazać zdolność do tworzenia XB [44]. Wiązanie halogenowe jest bardzo podatne na modyfikacje, a co za tym idzie siła i charakter tego oddziaływania są uzależnione od jednoczesnej obecności innych halogenów jako podstawników w układzie aromatycznym. Efekty indukcyjne oraz rezonansowe prowadzą do zwiększenia rozmiaru i dodatniego potencjału  $\sigma$ -dziury halogenu i tym samym zwiększenia energii XB [16,42,43,45].

**Oddziaływania halogen–halogen** pełnią istotną rolę w upakowaniu cząsteczek i stabilizacji struktur krystalicznych. Wśród nich możemy wyróżnić oddziaływania homo-halogenowe ( $X \cdots X$ ,  $X = F, Cl, Br$  oraz  $I$ ), jak również hetero-halogenowe ( $F \cdots X$ ,  $X = Cl, Br$  oraz  $I$ ). Dodatkowo, oddziaływania te można podzielić na dwa typy, w zależności od przestrzennego ułożenia halogenów względem siebie: Typ I (geometria cis i trans – oddziaływani zamknięto-powłokowe); Typ II (model elektrofilowo-nukleofilowy) (Rys. 2) [15,24,46].



**Rysunek 2.** Klasyfikacja oddziaływań halogen-halogen (Typ I i II) na podstawie obserwowanej geometrii oddziaływania.

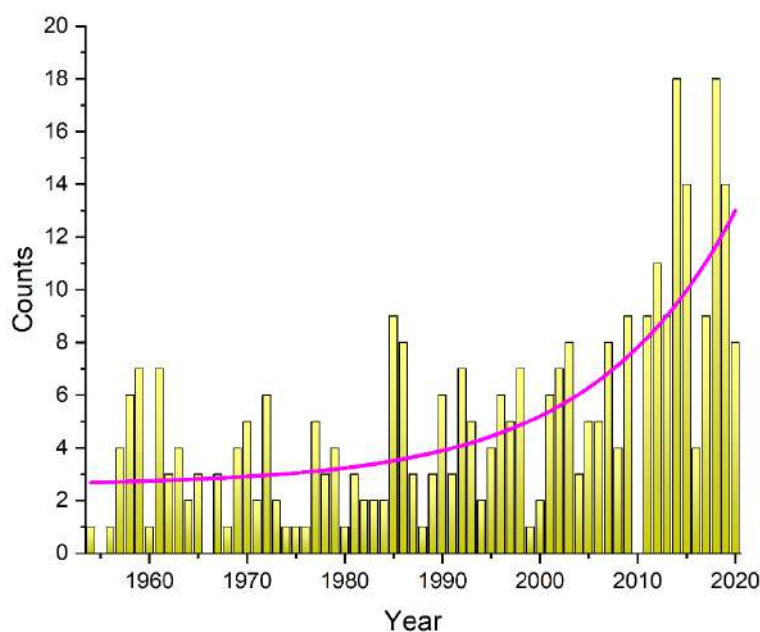
Oddziaływania typu II (kąt  $C-X\cdots X$  równy  $180^\circ$ ) są uważane za bardziej korzystne i odpowiadają oddziaływaniom pojedynczej pary elektronowej jednego halogenu z  $\sigma$ -dziurą na drugim atomie („*peak-hole*”). Zasada ta wydaje się nie obowiązywać w przypadku dwóch atomów fluoru, ponieważ  $\sigma$ -dziura (jeśli w ogóle występuje) ma raczej niską wartość potencjału elektrostatycznego [17,47,48]. Oddziaływania  $F\cdots F$  typu II (o kątach  $C-X\cdots X$  równych  $90^\circ$  i  $180^\circ$ ) wykazują znacznie mocniejszy stabilizujący charakter i są niemal dwukrotnie silniejsze od oddziaływań typu I. Dodatkowo, badania potwierdzają, że czynnikiem stabilizującym oddziaływanie jest głównie składowa elektrostatyczna, a nie dyspersyjna, co oznacza, że są to oddziaływania typu dipol–dipol [48,49]. Oddziaływania  $F\cdots F$  pierwszego typu bardzo często posiadają destabilizujący charakter lub ich wkład w stabilizację układu jest znikomy [49].

**Ortogonalne oddziaływanie multipolowe** ( $C-F\cdots C=O$ ) zostało po raz pierwszy opisane przez Olsena i współpracowników [50], którzy wykrystalizowali pochodne inhibitorów trombiny i zauważyli „fluorofilowe” miejsca wiązania w kieszeni wiążącej. Wiązanie to jest bipolarnym oddziaływaniem cząstkowego ujemnego ładunku znajdującego się na atomie fluoru oraz elektrofilowego, karbonylowego atomu węgla w układzie ortogonalnym, zlokalizowanym zarówno w łańcuchu głównym i bocznym [51]. Oddziaływania te są kierunkowe, o krótkim zasięgu (energia potencjalna oddziałujących dipoli jest funkcją kąta i odległości między nimi) [52]. Pomimo stosunkowo niedużej energii tych oddziaływań (od  $-0,8$  do  $-1,5$  kJ/mol) w stosunku do innych niewiążących interakcji uważa się, że oddziaływania te mają ogromny wpływ na poprawę właściwości farmakodynamicznych związków bioaktywnych i mogą istotnie wpływać na zwiększenie obserwowanej aktywności [51,52].

### 2.1.2. Fluor w chemii medycznej

Od momentu zatwierdzenia przez FDA (Amerykańską Agencję Żywności i Leków) pierwszego leku zawierającego w swojej strukturze atom fluoru, na rynku pojawiło się ponad

320 fluorowanych związków leczniczych [53]. Natomiast wśród związków aktualnie testowanych w fazie klinicznej można znaleźć ponad 1200 fluorowanych cząsteczek (na 8546 wszystkich struktur, które były lub są w trakcie badań klinicznych i nie zostały jeszcze zatwierdzone przez FDA) [<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>, data dostępu 30.03.2022]. Udział fluorowanych leków wzrósł z 2% w 1970 r. do 8% w 1980 r., 13% w 1990 r. i osiągnął 18% na początku XXI wieku. Wśród nich sześć produktów znalazło się na liście „top-12”, stosowanych jako leki przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwbólowe lub przeciwdepresyjne [54]. Około 20% leków dostępnych w 2010 roku zawierało atom(y) fluoru lub grupy fluoroalkilowe [55], podczas gdy w ostatniej dekadzie (2011–2020) 114 z 410 leków zatwierdzonych przez FDA (dane z Centrum Oceny i Badań Leków – CDER [56]) zawierało fluor (Rys. 3). Obecnie fluorowane farmaceutyki stanowią ponad 50% najbardziej dochodowych leków (*blockbuster drugs*), a także uznawane są za najlepsze wśród leków stosowanych w prawie wszystkich obszarach terapeutycznych [57].



**Rysunek 3.** Liczba zatwierdzonych leków zawierających fluor w swojej strukturze w poszczególnych latach. Dane zostały zebrane z bazy DrugCentral 2021 (dostęp 30 kwietnia 2021).

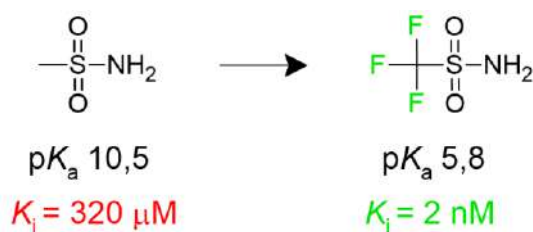
Unikalne właściwości fluoru oraz szereg nowych technik syntetycznych umożliwiają wykorzystanie tego halogenowca jako standardowej strategii przy opracowywaniu nowych leków. Pojedyncza substytucja fluorem może wywołać drastyczne zmiany parametrów ADMET (adsorpcji, dystrybucji, metabolizmu, eliminacji i toksyczności związków biologicznie aktywnych), jak również wpływa na wiele innych cech, jak np. biodostępność, lipofilowość, stabilność metaboliczną czy  $pK_a$  [4,58,59].

Istotnym czynnikiem w projektowaniu leków jest lipofilowość, czyli powinowactwo cząsteczki do fazy lipidowej, która ma wpływ na procesy farmakokinetyczne, w szczególności na dystrybucję cząsteczek w organizmie. Wyższa wartość lipofilowości wiąże się ze wzrostem powinowactwa substancji do błon biologicznych, lepszą przenikalnością, co skutkuje łatwiejszym dostępem do docelowego białka. Z drugiej strony zbyt duża lipofilowość może prowadzić do nadmiernej adsorpcji w błonach biologicznych i ich akumulacji w organizmie [60]. Analiza danych statystycznych wpływu substytucji fluorem na lipofilowość molekuł sugeruje, że pojedynczy podstawnik fluorowy będzie zwiększał ten parametr o około 0,17 jednostki. Jednakże, wymiana atomu wodoru na fluor nie zawsze prowadzi do zwiększenia lipofilowości, dlatego też zasada ta powinna być stosowana ostrożnie [4].

Zmniejszenie lipofilowości związku, może prowadzić do zwiększenia stabilności metabolicznej [61], która jest jedną z najważniejszych właściwości substancji farmakologicznych. Metabolizm leków (biotransformacja), jest biochemicznym procesem przemiany substancji aktywnej w organizmie, zachodzącym głównie w wątrobie na podstawie procesów utleniania, redukcji bądź hydrolizy [62]. W wyniku biotransformacji aktywnego farmakologicznie związku mogą powstawać produkty, tj.: nieaktywny metabolit, aktywny metabolit lub związek toksyczny dla organizmu. Wprowadzenie do cząsteczki atomu fluoru powoduje szereg efektów, które zwiększają stabilność metaboliczną, m.in. wprowadzenie fluoru do pierścienia aromatycznego może zmniejszyć szybkość procesu utlenienia poprzez indukcyjne oddziaływanie na pierścień aromatyczny, co skutkuje jego dezaktywacją poprzez destabilizację rezonansowych stanów pośrednich karbokationów lub steryczną blokadę miejsca utlenienia [4].

Ze względu na swoją wysoką elektroujemność, fluor w znaczący sposób wpływa na wartość  $pK_a$  związków biologicznie aktywnych. Ten parametr fizykochemiczny pośrednio wpływa na lipofilowość, rozpuszczalność, a także na właściwości farmakokinetyczne/farmakodynamiczne farmaceutyków. Szacuje się, że około 75% leków dostępnych handlowo jest słabymi zasadami, 20% słabymi kwasami, natomiast resztę stanowią alkohole i niejonowe amfolyty [63]. Fluor jest silnym modulatorem  $pK_a$  sąsiadujących grup funkcyjnych, co prowadzi do zmiany ich kwasowości i/lub zasadowości, jednocześnie często zwiększając stabilność układu L–R dodatkowymi oddziaływaniami [4]. Ciekawym przykładem jest inhibitor sulfonamidowy dehydrogenazy węglanowej, który po fluorowaniu wykazuje 160 000-krotnie wyższą aktywność biologiczną w porównaniu do niepodstawionej pochodnej (Rys. 4).



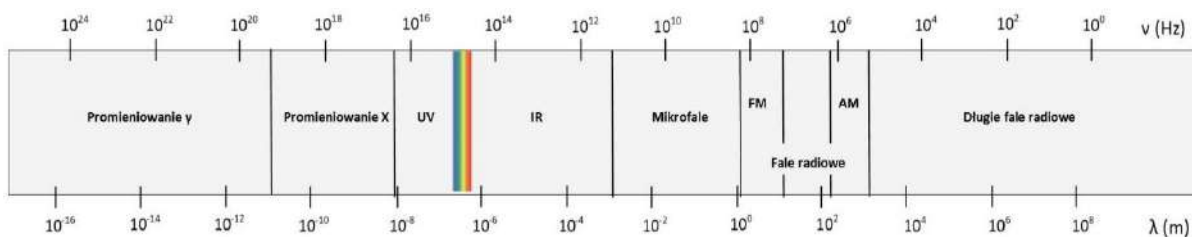


**Rysunek 4.** Wpływ fluorowania na zmianę wartości  $pK_a$  oraz  $K_i$  niepodstawionej oraz podstawionej fluorem struktury.

W ostatnich latach fluorowane związki są często syntezowane z wykorzystaniem nowoczesnych technik chemii organicznej, co prowadzi do znacznego przyrostu liczby związków farmaceutycznych o wysokiej aktywności biologicznej. Wykorzystanie atomu fluoru jest wieloaspektowe – od blokowania miejsc metabolicznie aktywnych do modulowania właściwości fizykochemicznych i farmakologicznych, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia powinowactwa z określonym celem biologicznym. Jednak pomimo wielu lat badań nad wpływem podstawienia fluorem związków aktywnych biologicznie, nadal nie ma jednoznacznej strategii prowadzącej do zwiększenia aktywności i często wykorzystywana jest metoda prób i błędów w projektowaniu nowych leków. Generuje to wysokie koszty syntezy oraz wydłuża czas otrzymywania nowych farmaceutyków. Dodatkowo, bardzo często synteza fluorowanych pochodnych jest niezwykle trudna, a nawet niemożliwa. Dlatego istotnym elementem jest prowadzenie badań w kierunku świadomego i racjonalnego wykorzystania fluoru w projektowaniu nowych leków [61].

## 2.2. Metody oparte na oddziaływaniu materii ze światłem

Ze względu na prowadzenie wielopłaszczyznowych badań wpływu fluoru na szereg właściwości fizykochemicznych wybranych klas związków organicznych, w pracy wykorzystano wiele metod eksperymentalnych oraz obliczeniowych. Część prowadzonych prac dotyczyła wpływu fluoru na energię oraz sposób powstawania międzycząsteczkowych wiązań wodorowych i halogenowych w układach modelowych, jak również w układzie ligand-receptor. Metody eksperymentalne w badaniu własności cząsteczek na poziomie molekularnym opierają się na ich oddziaływaniu z falami elektromagnetycznymi, które w zależności od długości fali, mogą ulec interferencji, dyfrakcji bądź absorpcji. Promieniowanie elektromagnetyczne podzielone zostało na zakresy w zależności od jego częstotliwości (Rys. 5), gdyż niesie ono różną energię, co pozwala na badanie różnych właściwości cząsteczek.



**Rysunek 5.** Zakresy promieniowa elektromagnetycznego z zaznaczonym obszarem dla promieniowania widzialnego [64].

W badaniu oddziaływań międzycząsteczkowych najczęściej wykorzystuje się spektroskopię oscylacyjną – spektroskopię w podczerwieni (*Infrared Spectroscopy* – IR), komplementarną z nią spektroskopię ramanowską, jak również spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (*Nuclear Magnetic Resonance* – NMR). Użyteczność rentgenografii strukturalnej w interpretacji oddziaływań międzycząsteczkowych ma swoje ograniczenia związane z koniecznością uzyskania fazy krystalicznej. Rozwój metod eksperymentalnych, zwłaszcza spektroskopowych, umożliwił wykonanie badań dla związków występujących w innych stanach skupienia lub dla ciał amorficznych [29].

### 2.2.1. Spektroskopia oscylacyjna

Spektroskopia oscylacyjna daje możliwość wglądu w strukturę cząsteczek oraz oddziaływań pomiędzy nimi. Poprzez pomiar widm absorpcyjnych w podczerwieni oraz widm rozpraszania ramanowskiego można uzyskać pełną informację o drganiach danego układu molekularnego w stanie podstawowym.

Spektroskopia w podczerwieni wykorzystuje zakres promieniowania elektromagnetycznego pomiędzy promieniowaniem widzialnym a mikrofalowym (0,8  $\mu\text{m}$  (bliska podczerwień) – 1000  $\mu\text{m}$  (daleka podczerwień)). Energia kwantów promieniowania w zakresie środkowej podczerwieni (głównie ten zakres był użyty w prowadzonych badaniach) jest zbyt niska, aby nastąpiło wzbudzenie elektronowe, jednak posiada wystarczającą energię do wytrącenia atomów z pozycji równowagowej. Podczas naświetlenia cząsteczka absorbuje kwant promieniowania, w wyniku czego wzrasta amplituda odchylenia atomów z położenia równowagi i cząsteczka zostaje wzbudzona. Rejestrując zależność natężenia promieniowania przepuszczonego od długości fali można otrzymać widmo absorpcyjne.

Rejon podczerwieni można podzielić na trzy zakresy częstotliwości: bliska podczerwień (12500–4000  $\text{cm}^{-1}$ , NIR) – w której znajdują się głównie pasma odpowiadające nadtonom oraz

pasmom kombinacyjnym, środkowa podczerwień (4000–400  $\text{cm}^{-1}$ , MIR) – pasma odpowiadające drganiom rozciągającym i zginającym oraz daleka podczerwień (400–10  $\text{cm}^{-1}$ , FIR) – w którym znajdują się pasma odpowiadające przejściom rotacyjnym oraz pasma drgań szkieletowych. Widma w podczerwieni dla ciał stałych i cieczy nazywane są widmami oscylacyjnymi, natomiast te dla gazów widmami oscylacyjno-rotacyjnymi. W podczerwieni obserwuje się tylko drgania, podczas których następuje zmiana momentu dipolowego cząsteczki. Można wyróżnić dwa rodzaje drgań normalnych: i) rozciągające – tzw. drgania walencyjne – zachodzące wzdłuż wiązań, ii) deformacyjne – związane ze zmianą kątów pomiędzy wiązaniami. Istnieje również podział drgań w zależności od ruchu względem płaszczyzny (drgania w płaszczyźnie i poza nią), oraz podział związany z symetrią drgań (symetryczne i asymetryczne) [65,66].

Przybliżone częstości drgań można obliczyć na podstawie równania Hooke’a, zgodnie z którym wiązanie łączące dwa atomy traktuje się jako prosty oscylator harmoniczny, złożony z dwóch mas połączonych sprężyną. Równanie Hooke’a opisuje zależność pomiędzy częstością oscylacji, masą atomów i stałą siłową wiązania (1) [67].

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{f}{(M_x M_y)/(M_x + M_y)}} \quad (1)$$

Gdzie  $\bar{\nu}$  – częstość drgań [ $\text{cm}^{-1}$ ],  $c$  – prędkość światła [ $\text{cm/s}$ ],  $f$  – stała siłowa wiązania [ $\text{N/cm}$ ],  $M$  – masa poszczególnych atomów. Na podstawie tego równania można określić i zidentyfikować położenie poszczególnych grup funkcyjnych [67]. W zakresie liczb falowych 4000–2500  $\text{cm}^{-1}$  występują pasma, które odpowiadają drganiom rozciągającym Y–H (gdzie Y = O, N, C, S), w zakresie 2500–2000  $\text{cm}^{-1}$  obecne są pasma odpowiadające drganiom rozciągającym wiązań potrójnych lub sprzężony układ wiązań podwójnych, natomiast w zakresie 2000–1500  $\text{cm}^{-1}$  widoczne pasma są wynikiem drgań rozciągających wiązań podwójnych oraz drgania deformacyjne dla grupy N–H. Zakres poniżej 1500  $\text{cm}^{-1}$  nazywany jest obszarem daktyloskopowym (*fingerprint region*), odpowiadającym złożonym drganiom rozciągającym i deformacyjnym, jak również drganiom C–X (gdzie X = F, Cl, Br, I) [66].

Spektroskopia w podczerwieni jest metodą najczęściej wykorzystywaną w badaniach wiązań wodorowych (HBs), gdyż pojawienie się wiązania wodorowego D–H $\cdots$ A (D – atom donora, A – atom akceptora), powoduje pojawienie się istotnych zmian na widmach w porównaniu z niezwiązaną grupą D–H. Najważniejszą obserwowaną zmianą na widmie, towarzyszącą występowaniu wiązania wodorowego, jest przesunięcie pasm rozciągających D–H w kierunku

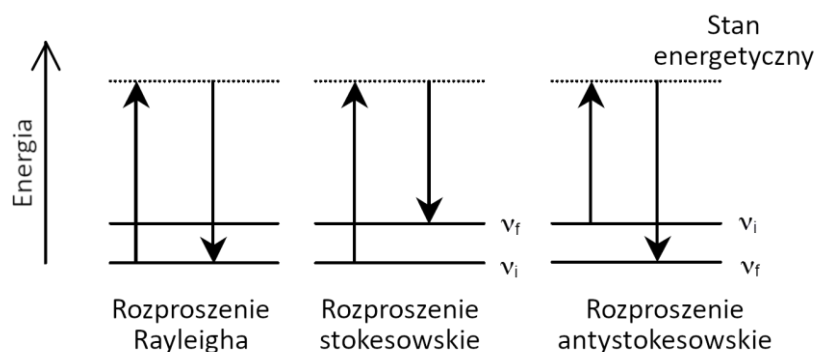
niższych liczb falowych, co spowodowane jest obniżeniem stałej siłowej i wydłużeniem wiązania D–H. Kolejnym zauważalnym efektem jest wzrost szerokości połówkowej tych samych pasm, spowodowaną (głównie) anharmonicznością drgań rozciągających mostek wodorowy oraz jego wysoka polaryzowalność. Ze względu na zmianę momentu dipolowego drgania rozciągającego po utworzeniu wiązania wodorowego, zmianie może ulec również integralna intensywność pasm. Stopień wyżej wymienionych zmian w głównej mierze zależy od siły powstałych wiązań wodorowych [68–70].

Spektroskopia Ramana jest techniką badania widm oscylacyjnych, opierającą się na pomiarze promieniowania rozproszonego, tj. nieelastycznego rozproszenia fotonów. Podczas pomiaru próbka naświetlana jest promieniowaniem o jednej długości fali w zakresie światła widzialnego, nadfioletowym bądź bliskiej podczerwieni i rejestruje się promieniowanie rozproszone prostopadłe do kierunku wiązki padającej. Fala elektromagnetyczna oddziałująca z cząsteczką powoduje przesunięcie chmury elektronowej w stosunku do jąder, co powoduje wytworzenie momentu dipolowego  $\mu$ , który jest proporcjonalny do natężenia pola elektrycznego  $E$  oraz polaryzowalności molekuly  $\alpha$  (2) [71].

$$\mu = \alpha \cdot E \quad (2)$$

W związku z powyższym równaniem na widmie ramanowskim widoczne są tylko drgania, podczas których zmienia się tensor polaryzowalności. Spektroskopie Ramana i IR są metodami komplementarnymi, jednak obowiązuje tzw. zakaz alternatywny, który dotyczy reguł wyboru i cząsteczek posiadających środek symetrii – głosi on, że drganie może być aktywne jedynie w jednej z powyższych spektroskopii.

Podczas pomiaru widma ramanowskiego promieniowanie rozproszone można podzielić na trzy składowe: i) rayleighowską, ii) stokesowską oraz iii) antystokesowską (Rys. 6). Składowa Rayleigha powstaje wskutek oddziaływania kwantów padającego promieniowania o częstotliwości  $\nu_0$ , która nie pasuje do poziomów energetycznych cząsteczki, a promieniowanie rozproszone ma taką samą częstotliwość. Składowa stokesowska powstaje w wyniku wzbudzenia cząsteczki na wyższy poziom oscylacyjny i rozproszony foton ma energię niższą o różnicę energii poziomów oscylacyjnych  $h\nu$ . Składową antystokesowską obserwujemy w sytuacji, gdy cząsteczka znajdująca się na wyższym poziomie oscylacyjnym zostaje wzbudzona, a następnie w efekcie powrotu do stanu podstawowego, rozproszony foton ma energię większą o różnicę poziomów oscylacyjnych  $h\nu$  (Rys. 6).



**Rysunek 6.** Wykresy przedstawiające rozproszenia: Rayleigha, stokesowskie i antystokesowskie, gdzie  $\nu_i$  oznacza energię niewzbudzonej cząsteczki, natomiast  $\nu_f$  energię rozproszonego fotonu.

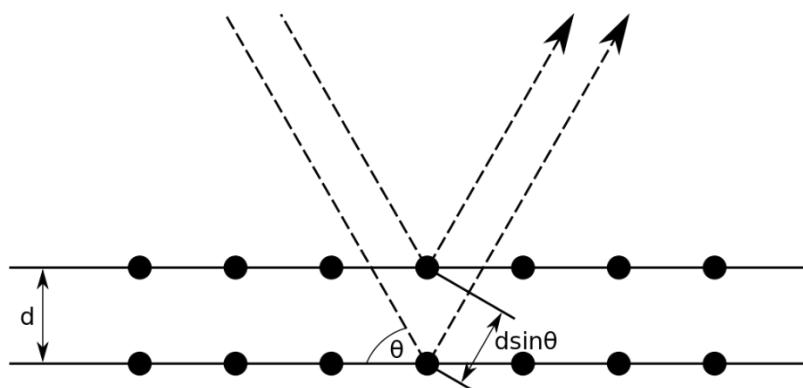
Zgodnie z rozkładem Boltzmana, oscylacyjny poziom podstawowy jest bardziej obsadzony niż wzbudzony, dlatego pasma stokesowskie są bardziej intensywne niż antystokesowskie. Ze względu na małe natężenie promieniowania rozproszonego, wykorzystywanym w doświadczeniu źródłem promieniowania są lasery bądź lampy z monochromatorem [71].

### 2.2.2. Rentgenografia strukturalna

Rentgenografia strukturalna (*X-ray diffraction method*) jest metodą należącą do metod dyfrakcyjnych, do których możemy również zaliczyć neutronografię (*ND – Neutron Diffraction*) oraz dyfrakcję elektronów (*ED – Electron Diffraction*). Metody te wykorzystują monochromatyczne promieniowanie rentgenowskie o długości fali ( $\lambda$ ) elektromagnetycznej rzędu  $10^{-10}$  m [72,73], które ulega dyfrakcji a następnie interferencji na poszczególnych płaszczyznach ( $hkl$ ) (Rys. 7). Wspomniane zjawisko zostało opisane przez Braggów, którzy określili zależność odległości międzypłaszczyznowej ( $d_{hkl}$ ) i obserwowanego kąta odbłyску ( $\theta$ ) od długości fali promieniowania ( $\lambda$ ) padającego na kryształ (3),

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta \quad (3)$$

gdzie uwzględniany jest także rząd ugięcia ( $n$ ) [74].



**Rysunek 7.** Model dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na monokryształach wg. Braggów [75].

W metodach rentgenograficznych, promieniowanie elektromagnetyczne oddziałuje z materią i ulega ugięciu na elektronach. Z tego powodu pozycje atomów wodoru w cząsteczkach są słabo zdefiniowane. Mimo tego, że XRD jest mniej dokładna w opisywaniu położenia atomów wodoru, jest to technika, która może prowadzić do empirycznego opisu wiązań wodorowych [76,77]. Oczywiście istnieją inne metody dyfrakcyjne, pozwalające na precyzyjne określenie położenia atomów H w cząsteczce, jak np. neutronografia, jednak wysoki koszt pomiarów i mała dostępność sprzętu sprawia, że metoda ta nie jest często stosowana [77].

## 2.3. Metody obliczeniowe

### 2.3.1. Dynamika Molekularna *Ab Initio* (AIMD)

Dynamika molekularna jest jedną z metod obliczeniowych (*Molecular Dynamics, MD*) pozwalających na badanie zachowania układu i jego właściwości w czasie, rozwiązując odpowiednie równania ruchu. W klasycznej dynamice molekularnej do rozwiązania równania Schrödingera przyjmuje się przybliżenie adiabatyczne (trajektorie w układzie zależą głównie od masy jąder, natomiast masa elektronów jest zanedbywalna) [78] oraz przybliżenie Born-Oppenheimera zaniebujące pierwszą poprawką rachunku zaburzeń do Hamiltonianu energii elektronowej [79], co w połączeniu z rozwiązaniem klasycznego równania ruchu Newtona pozwala na badanie propagacji układu w czasie. Zastosowanie tych uproszczeń umożliwia z jednej strony symulację dużych układów (np. ligand-receptor), ale z drugiej strony nie jest możliwe badanie dyskretnych zmian elektronowych w układzie [78]. Klasyczna dynamika molekularna wykorzystuje pola siłowe, które są przybliżeniem stosowanym do opisu energii potencjalnej cząsteczek. Parametry pól siłowych są zdefiniowane na podstawie danych

empirycznych, a otrzymane wyniki zależą od wybranego pola siłowego. Popularnymi polami siłowymi są: AMBER [80], CHARMM [81], GROMOS [82] oraz OPLS [83].

Dynamika molekularna *ab initio* (AIMD) prezentuje nowe podejście do symulacji złożonych układów i procesów molekularnych (w tym reakcji chemicznych) poprzez połączenie dynamiki molekularnej i teorii struktury elektronowej. W przeciwieństwie do MD opartej na polach siłowych, energia potencjalna w AIMD jest obliczana na bieżąco (ang. *on the-fly*), podczas generowania trajektorii dynamiki. W ten sposób zmienne elektronowe nie są integrowane wcześniej i reprezentowane przez ustalone potencjały interakcji, gdyż są one aktywne i wykazują stopnie swobody w trakcie symulacji. Oznacza to, że przy odpowiednim przybliżonym rozwiązaniu problemu wielu elektronów, również układy chemicznie złożone lub takie, w których struktura elektronowa zmienia się drastycznie podczas dynamiki, mogą być łatwo traktowane przez AIMD [78]. Niestety, dokładny opis elektronowy implikuje bardzo wysokie koszty obliczeniowe oraz w istotny sposób skraca czas obliczonej trajektorii w porównaniu z MD. Problem ten częściowo został rozwiązany w wersji AIMD Born-Oppenheimer'a, gdzie jądrowe stopnie swobody przeniesione zostały za pomocą sił jonowych, obliczanych w każdej iteracji przez rozwiązanie problemu elektronowego tradycyjnymi metodami diagonalizacji macierzy hamiltonianu. Robert Car i Michelle Parrinello wprowadzili elektronowe stopnie swobody jako fikcyjne zmienne dynamiczne, co doprowadziło do układu sprzężonych równań, a elektrony zostały utrzymane w stanie niewzbudzonym, odpowiadającym każdej nowej konfiguracji elektronowej podczas obliczania trajektorii. Pozwoliło to na uniknięcie iteracyjnej minimalizacji energii, co doprowadziło do otrzymania nowego równania ruchu Lagrange'a (4) [78,84,85].

$$L_{CP} = \sum_I \frac{1}{2} M_I \dot{R}_I^2 + \sum_i \mu \langle \dot{\phi}_i | \dot{\phi}_i \rangle - \langle \psi_0 | H_e | \psi_0 \rangle + ogran. \quad (4)$$

W powyższym równaniu pierwszy człon odpowiada za energię kinetyczną, drugi za energię potencjalną, natomiast ograniczenia (ogran.) są czynnikiem ortonormalnymi.

### 2.3.2. *Quantum Theory Atom in Molecule (QTAIM)*

Kwantowa Teoria Atomów w Cząsteczkach (*Quantum Theory Atoms in Molecules - QTAIM*) jest usystematyzowaną analizą rozkładu gęstości elektronowej opracowaną przez R. F. W. Badera, opierającą się na pomiarze gęstości elektronowej oraz jej właściwości w punktach krytycznych oraz na topologicznej analizie pola gradientu gęstości elektronowej.

W teorii tej można wyróżnić cztery typy punktów krytycznych: i) atraktor (położenie jądra atomowego) jest punktem, w którym gęstość elektronowa maleje we wszystkich trzech prostopadłych kierunkach przestrzeni; ii) krytyczny punkt wiązania (*bond critical point* – *BCP*), jest punktem siodłowym funkcji gęstości elektronowej, która maleje w kierunkach prostopadłych i rośnie wzdłuż osi wiązania; iii) punkt krytyczny pierścienia, dotyczy punktu siodłowego funkcji gęstości elektronowej, która maleje w kierunku prostopadłym do pierścienia i rośnie wzdłuż płaszczyzny pierścienia; iv) klatkowy punkt krytyczny (*cage critical point* – *CCP*) jest punktem, w którym gęstość elektronowa rośnie we wszystkich kierunkach prostopadłych w przestrzeni [86]. Na podstawie wartości gęstości elektronowej ( $\rho$ ), laplasjanu gęstości elektronowej ( $\nabla^2\rho_{BCP}$ ) oraz wartości energii potencjalnej ( $V_{BCP}$ ) i kinetycznej ( $G_{BCP}$ ), wykorzystując równanie zaproponowane przez Espinosa i współ. [87], można szacunkowo określić energię wiązania wodorowego (5).

$$E_{HB} = \frac{1}{2}G_{BCP} \quad (5)$$

Dodatkowo, tylko w oparciu o  $\nabla^2\rho_{BCP}$  oraz całkowitą gęstość energii elektronowej ( $H_{BCP}$ ) można wyznaczyć moc wiązania wodorowego [88]. Gdy  $\nabla^2\rho_{BCP} < 0$  wiązanie wykazuje charakter kowalencyjny, gdy  $\nabla^2\rho_{BCP} > 0$  ale  $H_{BCP} < 0$  jest to silnie HB o częściowym charakterze kowalencyjnym (np. mostki solne), natomiast klasyczne wiązania wodorowe cechuje  $H_{BCP} > 0$ .

### 2.3.3. Analiza dekompozycji energii (*ETS-NOCV*)

Metoda ETS-NOCV (Extended Transition State (ETS) – Natural Orbitals for Chemical Valence – (NOCV)) [89], oblicza energię oddziaływania pomiędzy fragmentami cząsteczek ( $\Delta E_{total}$ ) jako sumę przyczynków (6):

$$\Delta E_{total} = \Delta E_{elstat} + \Delta E_{Pauli} + \Delta E_{orb} \quad (6)$$

gdzie,  $\Delta E_{elstat}$  jest składową elektrostatycznego oddziaływania pomiędzy fragmentami;  $\Delta E_{Pauli}$  to energia destabilizującego oddziaływania pomiędzy zajętymi orbitalami dwóch fragmentów;  $\Delta E_{orb}$  jest energią oddziaływania orbitali molekularnych fragmentów. W powyższym równaniu można dodatkowo uwzględnić zmianę energii oddziaływania dyspersyjnego (7):

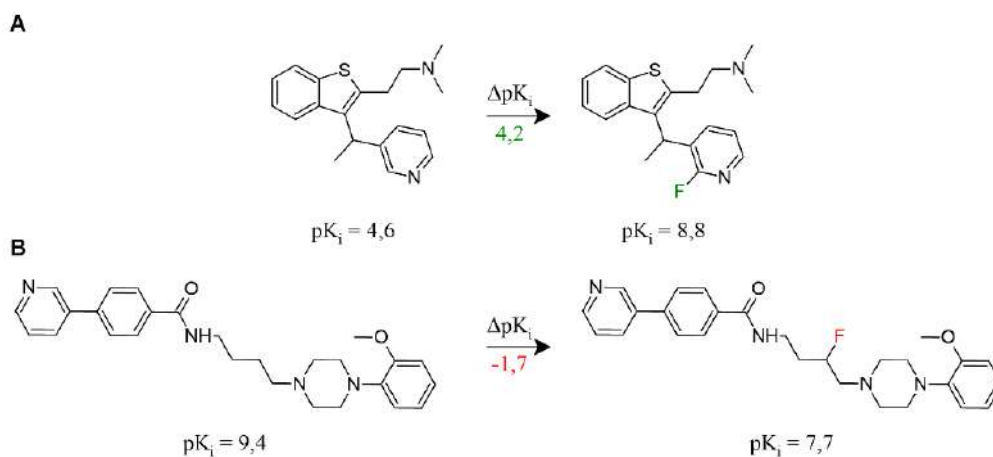
$$\Delta E'_{total} = \Delta E_{total} + \Delta E_{disp} = (\Delta E_{elstat} + \Delta E_{Pauli} + \Delta E_{orb}) + \Delta E_{disp} \quad (7)$$

w którym  $\Delta E_{disp}$  jest różnicą pomiędzy energią dyspersyjną całej cząsteczki a energią dyspersyjną izolowanych fragmentów [90].



### 2.3.4. Klify aktywności (AC)

Klify aktywności (*Activity Cliffs* – AC) są obecne w chemii medycznej i obliczeniowej od prawie trzech dekad [91,92]. Pierwszą wzmiankę o klichach aktywności można znaleźć w książce Micheala Lajnessa z 1991 roku, gdzie zostały zdefiniowane jako pary strukturalnie podobnych związków chemicznych o dużej różnicy aktywności biologicznej (Rys. 8) [91].



**Rysunek 8.** Przykłady klichów aktywności A) pozytywnego efektu podstawienia fluorem, B) negatywnego efektu podstawienia fluorem [93].

W racjonalnym projektowaniu leków AC były niezwykle ciekawym zjawiskiem, gdyż reprezentowały przypadki nieciągłości zależności struktura-aktywność biologiczna (*Structure-Activity Relationship* – SAR), problematyczne w modelowaniu ilościowym (QSAR) [92]. Z czasem jednak zaczęto ową nieciągłość SAR wykorzystywać do identyfikacji niewielkich modyfikacji chemicznych, które determinują wysoką aktywność biologiczną [94]. Występowanie klichów aktywności na wczesnym etapie optymalizacji struktur wiodących jest korzystnym zjawiskiem, gdyż pozwala zawężanie kierunków zmian strukturalnych prowadzących do zwiększenie powinowactwa związku do wybranego celu biologicznego. W późniejszych etapach optymalizacji struktur w badaniach przedklinicznych, AC są raczej niepożądane [95]. Przykładem klichu może być częste występowanie tzw. „magicznego metylu” [96]. Chociaż AC mogą być intuicyjnie oceniane z chemicznego punktu widzenia poprzez analizę serii związków i ocenę SAR, to systematyczne badanie AC wymaga starannego rozważenia kryteriów podobieństwa i różnicy aktywności biologicznej. Istotne jest aby znajdować klify aktywności, które są spotykane w dużej ilości zróżnicowanych rdzeni

molekularnych, działających na dany cel biologiczny lub dla rodziny receptorów, aby móc określić wzorce racjonalnego projektowania nowych związków o wysokiej bioaktywności [94].

### 3. Cel badań

Cele badań realizowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały zdefiniowane jako:

- określenie wpływu podstawnika fluorowego na energię międzycząsteczkowych wiązań wodorowych oraz halogenowych w układach modelowych: mono- i difluoropodstawionych benzenu;
- zbadanie korelacji pomiędzy występowaniem oraz energią między- i wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań z fluorem, a zmianami obserwowanymi w widmach FT-IR oraz ramanowskich;
- określenie wpływu fluoru na parametry  $\sigma$ -dziury i siłę powstających wiązań halogenowych;
- krystalizacja i badania metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich na monokryształach nowych, strukturalnie niescharakteryzowanych mono- i difluoropochodnych benzenu;
- określenie bezpośredniego i pośredniego wpływu podstawnika fluorowego na oddziaływania międzycząsteczkowe obserwowane w strukturach krystalicznych zdeponowanych w bazie Protein Data Bank (PDB);
- wyznaczenie energii wiązań wodorowych z udziałem fluoru w układach biologicznych, a także określenie ich optymalnych parametrów geometrycznych;
- określenie roli i znaczenia fluoru w racjonalnym projektowaniu leków na przykładzie aminergicznych receptorów klasy A GPCR oraz transporterów serotoniny (SERT);
- opracowanie nowych praktycznych zasad racjonalnego projektowania nowych leków na podstawie analizy klifów aktywności dla transformacji wymiany wodoru na atom fluoru.

Wszystkie wyżej wymienione cele cząstkowe miały pomóc w zrozumieniu złożonego i do chwili obecnej trudnego do przewidzenia wpływu fluoru na właściwości farmakodynamiczne związków biologicznie aktywnych.

## 4. Metody i materiały

### Pomiary spektroskopowe

Widma w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) zmierzono za pomocą systemu FT-IR Nicolet™ iS™ 5 Thermo Scientific wykorzystując metodę osłabionego całkowitego odbicia (ATR) oraz jednodobiciowej przystawki wykonanej z selenku cynku (ZnSe). Widma zostały zmierzone w temperaturze pokojowej w zakresie 4000–650  $\text{cm}^{-1}$ ; zebrano 32 skany z rozdzielczością spektralną 2  $\text{cm}^{-1}$ .

Widma Ramana zmierzono stosując spektrometr Bruker MultiRAM FTRaman. Widma ramanowskie próbek zebrano za pomocą stolika makro TLC xyz w zakresie 4000–50  $\text{cm}^{-1}$ , z rozdzielczością spektralną 4  $\text{cm}^{-1}$ , długość fali wzbudzenia 1064 nm, moc lasera 350 mW, z akumulacją 100 skanów.

### Obliczenia kwantowo-mechaniczne

Mapy potencjału elektrostatycznego (ESP) obliczono przy pomocy oprogramowania Gaussian G16 [97,98] z wykorzystaniem funkcjonału Minnesoty M06-2X-D3 [99] oraz bazy aug-cc-pVTZ [100,101] oraz def2-TZVP [102] i PCM (*Polarizable Continuum Model*) [103,104]. Wyniki wizualizowano w programie GaussView 6.0.16 [105].

Analizę wibracyjną badanych układów modelowych wykonano przy pomocy oprogramowania Gaussian G16 (z wykorzystaniem funkcjonału B3LYP, bazy cc-pVDZ i def2-TZVP oraz modelu PCM). Otrzymane widma teoretyczne zostały przeskalowane przez czynnik 0,97 dla bazy cc-pVDZ [106] oraz 0,9855 dla def2-TZVP [107] i posłużyły do przypisania pasm odpowiadającym drganiom w cząsteczkach.

Analizę topologiczną gęstości elektronowej QTAIM [86] wykonano za pomocą programu AIMAll [108], opartej na gęstości elektronowej obliczanej za pomocą oprogramowania Gaussian G16 (z wykorzystaniem funkcjonału B3LYP, bazy cc-pVDZ oraz PCM) dla komórki elementarnej danej sieci krystalicznej. Następnie obliczono energię otrzymanych międzycząsteczkowych wiązań HB, XB, X $\cdots$ X na podstawie równania Espinosa [87,109] (5).

### Wielkość $\sigma$ -dziury

Do obliczenia wielkości  $\sigma$ -dziury wykorzystano oprogramowanie MultiWFN [110] (ze względu na obecność ciężkich atomów). W pierwszym kroku zoptymalizowano struktury za

pomocą oprogramowania Gaussian G16, funkcjonu M06-2X, bazy def2-QTVP [111] oraz modelu PCM. Otrzymana funkcja falowa (wfx) posłużyła do obliczenia maksymalnej wartości potencjału elektrostatycznego na powierzchni izogęstości w MultiWFN.

### **Analiza dekompozycji energii**

Obliczenia zostały wykonane w programie Amsterdam Density Functional (ADF) [43–46], korzystając ze schematu ETS-NOCV. Zastosowano funkcjonal korelacyjno-wymienny (Becke, Lee, Yang i Parr) z korekcją dyspersji Grimme’go (B3LYP-D3). Dla wszystkich elektronów zastosowano bazę STO zawierającą jeden zbiór funkcji polaryzacyjnych (TZP). Całkowite entalpie wiązania ( $\Delta E = \Delta E_{\text{int}}$ ) nie obejmowały dodatku energii punktu zerowego (ZPE) ani korekcji błędu superpozycji bazy (BSSE).

### **Dynamika molekularna *ab initio***

Dla analizowanych układów molekularnych przeprowadzono 20 ps (z krokiem 0,5 fs) symulacje AIMD przy użyciu oprogramowania CP2K [112] (metoda QUIKSTEP [113,114], funkcjonal DFT-D3 [115] oraz funkcja Pade [116]). W pierwszym etapie dokonano relaksacji układu w 298 K. Następnie na podstawie centrów Wanniera uzyskano widma teoretyczne w podczerwieni za pomocą programu Travis [117].

Każdy badany układ składał się z 16 cząsteczek i był zamknięty w pudle o wymiarach  $15 \times 15 \times 15 \text{ \AA}^3$ . Wstępne geometrie przygotowano za pomocą oprogramowania Packmol [118].

Analizę otrzymanych trajektorii, określenie liczby i rodzajów wiązań wodorowych tworzących się w trakcie symulacji wykonano przy użyciu autorskiego skrypt w języku Python. Na podstawie uzyskanych wyników wygenerowano mapy gęstości dystrybucji parametrów geometrycznych dla wiązań wodorowych obecnych w trajektorii.

### **Analiza rentgenostrukturalna**

Dane dyfrakcyjne dla odpowiedniej jakości monokryształów zebrano przy użyciu czterokołowego dyfraktometru XtalLAB Synergy-S (Rigaku – Oxford Diffraction) z monochromatorem lustrzanym i mikroogniskowym podwójnym źródłem promieniowania ( $\text{MoK}\alpha \lambda = 0,7107 \text{ \AA}$  lub  $\text{CuK}\alpha \lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). Dodatkowo dyfraktometr został wyposażony w system kriostatujący CryoStream, umożliwiający prowadzenie eksperymentów niskotemperaturowych (w temperaturze 100(2) K).

Uzyskane zbiory danych dyfrakcyjnych zostały przetworzone za pomocą oprogramowania CrysAlisPro [119]. Problem fazowy został rozwiązany metodami bezpośrednimi

zaimplementowanymi w programie SIR2014 [120]. Parametry otrzymanych modeli udokładniano z użyciem pełnomacierzowej metody najmniejszych kwadratów na  $F^2$  przy użyciu SHELXL 2014/6 [121]. Obliczenia wykonano przy użyciu zintegrowanego systemu WinGX (wersja 2014.1) [122].

Wszystkie atomy niewodorowe zostały udokładnione anizotropowo. Pozycje atomów wodoru przyłączonych do atomów węgla zostały wyznaczone teoretycznie i udoskonalone przy użyciu modelu *riding*, z izotropowym parametrem przemieszczenia atomowego  $U_{\text{iso}}[\text{H}] = 1,2U_{\text{eq}}[\text{C}]$ . Zbadano mapę różnicy Fouriera w celu zlokalizowania atomów wodoru grupy aminowej (silny donor HB).

Powierzchnie Hirshfelda i dwuwymiarowe wykresy typu *fingerprint* zostały wygenerowane przy użyciu programu CrystalExplorer [123] wersja 17.5 przy domyślnych ustawieniach programu. Jako dane wejściowe wykorzystano udokładnione informacje strukturalne w formacie CIF (z ang. *Crystallographic Information File*) dla wszystkich badanych krystalicznych pochodnych halogenoaniliny (4-chloro-, 4-bromo- i 4-jodoaniliny).

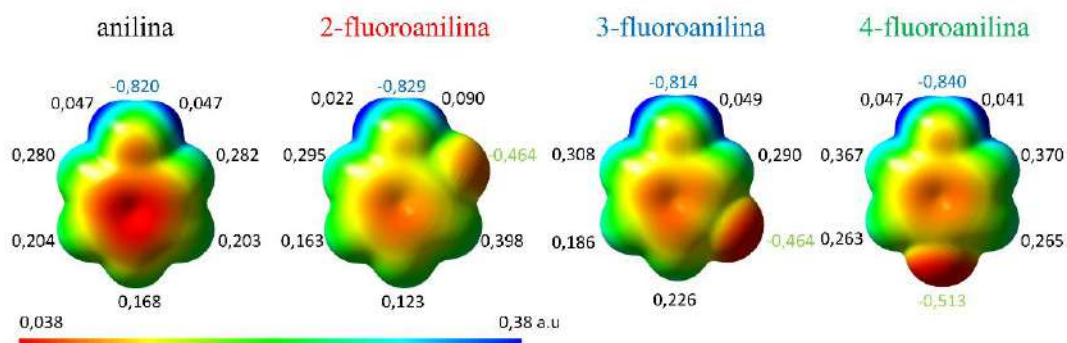
## 5. Wyniki

### 5.1. Wpływ fluoru na siłę oraz tendencję tworzenia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych i halogenowych w układach modelowych

#### 5.1.1. Wpływ fluoru na wiązania wodorowe w układzie modelowym aniliny

Zrozumienie natury międzycząsteczkowych oddziaływań niekowalencyjnych (silnych (HB) i słabych (WHB) wiązań wodorowych czy wiązań halogenowych (XB)) leży u podstaw wielu dyscyplin naukowych, takich jak chemia, fizyka czy projektowanie nowych leków. Wprowadzenie określonych grup funkcyjnych do cząsteczki może znacząco zmienić jej reaktywność, jak również tendencję do tworzenia różnych rodzajów oddziaływań międzycząsteczkowych. Ze względu na wysoką elektroujemność, fluor istotnie wpływa na właściwości sąsiadujących grup funkcyjnych, a w konsekwencji doprowadza do zmiany właściwości donorowo-akceptorowych HB lub XB. Z tego powodu istotne jest określenie wpływu fluoru na siłę (parametry geometryczne) oraz tendencję do tworzenia oddziaływań międzycząsteczkowych w badanym układzie. W tym celu określono wpływ miejsca podstawienia fluorem w modelowym układzie (anilina) na właściwości donorowo-akceptorowe grupy aminowej.

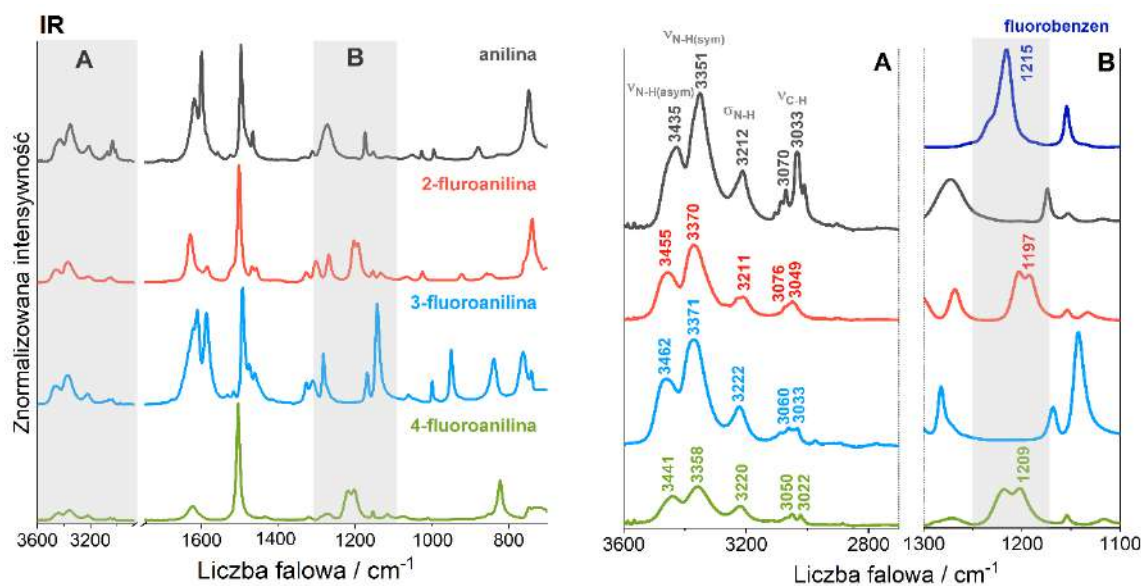
Aby zrozumieć zmiany w tendencji do tworzenia oddziaływań powstających w badanych układach, obliczono i przeanalizowano mapy powierzchni potencjału elektrostatycznego (EPS) dla cząsteczki aniliny i serii jej monofluorowych pochodnych. Efekt wywołany przez atom fluoru silnie zależy od miejsca jego podstawienia w układzie aromatycznym, co uwidacznia się poprzez zwiększenie kwasowości atomów wodoru w grupie aminowej (w szeregu malejącym 4-fluoroanilina > 2-fluoroanilina > 3-fluoroanilina), przy jednoczesnym odwrotnie proporcjonalnym zmniejszeniu dostępności wolnej pary elektronowej atomu azotu wywołanej efektem indukcyjnym (Rys. 9). W konsekwencji 3-fluoroanilina jest najbardziej stabilnym izomerem, o najwyższej entalpii dysocjacji wiązania N–H [124], co czyni grupę aminową w 3-fluoroanilinie najmniej atrakcyjnym donorem HB.



**Rysunek 9.** Mapy powierzchni potencjału elektrostatycznego wraz z ładunkami Mullikena dla aniliny oraz jej trzech monofluoropochodnych.

Na podstawie analizy wibracyjnej cząsteczek aniliny i jej fluorowych pochodnych, przyporządkowano pasma widoczne w widmach eksperymentalnych Ramana i IR do odpowiadających im oscylacji – wyróżniono kilka interesujących zakresów. Zakres rozciągających drgań asymetrycznych ( $3435\text{ cm}^{-1}$ ) i symetrycznych ( $3351\text{ cm}^{-1}$ )  $\text{NH}_2$  ( $\nu\text{NH}$ ), nadton ( $3212\text{ cm}^{-1}$ ) drgania zginającego  $\text{N-H}$  ( $1618\text{ cm}^{-1}$ ) ( $\delta\text{NH}$ ), zakres drgań rozciągających  $\text{C-H}$  ( $3100\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ ) ( $\nu\text{CH}$ ) oraz zakres drgania rozciągającego  $\text{C-F}$  ( $1100\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$ ) ( $\nu\text{CF}$ ). Substytucja fluoru do cząsteczki aniliny powoduje przesunięcie pasm  $\nu\text{NH}$  w kierunku wyższych liczb falowych, co świadczy o osłabieniu wiązań wodorowych z udziałem grupy aminowej, a wartość przesunięcia ( $20\text{ cm}^{-1}$  w IR) jest największa dla 3-fluoroaniliny (Rys. 10). Jednocześnie pasma  $\nu\text{NH}$  mają najniższą intensywność na widmie ramanowskim, co może wynikać z najmniejszej dostępności wolnej pary elektronowej w porównaniu do pozostałych pochodnych. Dodatkowo, podstawienie fluorem powoduje zmiany w symetrii poszczególnych drgań  $\nu\text{CH}$ , co prowadzi do degenracji odpowiadającego im pasma (Rys. 10). Udział grup  $\text{C-H}$  w tworzeniu wiązań wodorowych z fluorem powoduje przesunięcie ich pasm w kierunku wyższych liczb falowych, co jest cechą charakterystyczną dla wiązań wodorowych  $\text{C-H}\cdots\text{F}$  i wyróżnia je w porównaniu do zachowania tradycyjnych HB (Rys. 10). Pasma drgań  $\nu\text{CF}$  w 2-fluoroanilinie jest rozszczepione i przesunięte w kierunku niższych liczb falowych w stosunku do 4-fluoroaniliny, co związane jest z obecnością wewnątrzcząsteczkowego wiązania  $\text{N-H}\cdots\text{F}$  (Rys. 10).



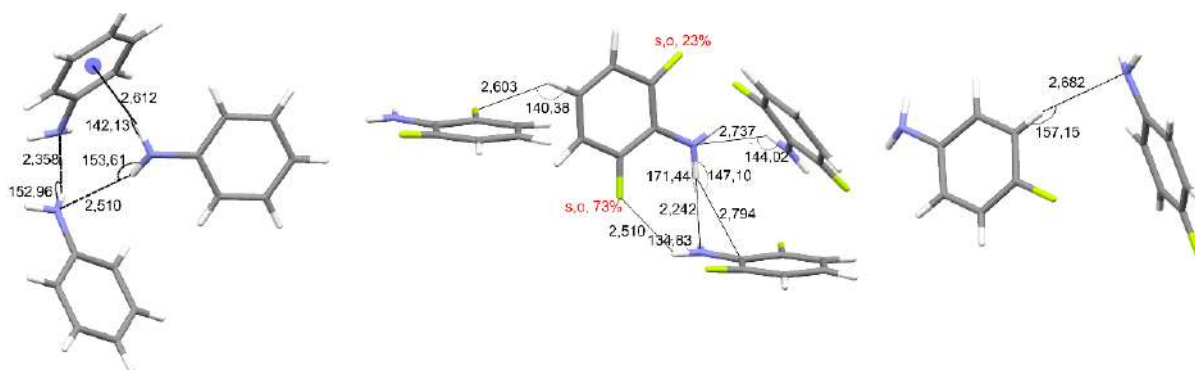


**Rysunek 10.** Eksperymentalne widma FT-IR aniliny i jej trzech fluoropodstawionych pochodnych w zakresie  $700\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ . Zaznaczono drgania oscylacyjne HB w wybranych rejonach (A – drgania grup  $\nu\text{NH}_2$  i  $\nu\text{CH}$ , B – drgania rozciągające  $\nu\text{CF}$ ) ( $\nu$  – rozciąganie,  $\sigma$  – nadton drgań zginających). Dodatkowo porównano zakres pasm  $\nu\text{CF}$  z widmem fluorobenzenu.

Dla badanych układów wykonano symulację dynamiki molekularnej *ab initio* (AIMD) metodą DFTD3 używając oprogramowania CP2K. Na podstawie obliczonych centrów Wanniera uzyskano widma teoretyczne przy pomocy oprogramowania Travis. Widma teoretyczne niemal doskonale pokrywają się z widmami eksperymentalnymi, co pozwoliło na przeprowadzenie analizy jakościowej i ilościowej dla układów modelowych. Otrzymane wyniki wskazują, że liczba wiązań wodorowych  $\text{N}\text{--}\text{H}\cdots\text{N}$  w trakcie symulacji MD jest mniejsza dla 3- i 4-fluoroaniliny w porównaniu do aniliny. Dodatkowo wzrost kwasowości protonów aromatycznych wpływa na zwiększenie ich atrakcyjności dla pozostałych donorów w cząsteczce (Rys. 9). Najwięcej oddziaływań  $\text{N}\text{--}\text{H}\cdots\text{F}$  zaobserwowano dla 4-fluoroaniliny, natomiast w 2-fluoroanilinie fluor jest stale zaangażowany w wewnątrzcząsteczkowe wiązanie  $\text{N}\text{--}\text{H}\cdots\text{F}$ .

Analiza struktur krystalicznych aniliny, 2- i 4-fluoroaniliny (pomimo prób krystalizacji w wysokim ciśnieniu pochodnej 3-fluoroaniliny, nie uzyskano dobrej jakości kryształu) wykazała dominującą rolę wiązania wodorowego  $\text{N}\text{--}\text{H}\cdots\text{N}$  w kryształach aniliny (Rys. 11). W strukturze krystalicznej 2-fluoroaniliny również zaobserwowano wiązania  $\text{N}\text{--}\text{H}\cdots\text{N}$ , jednak o zwiększonej odległości donor-akceptor, natomiast dla 4-fluoroaniliny nie zaobserwowano tych HB, a jedynym stabilizującym oddziaływaniem było  $\text{C}\text{--}\text{H}\cdots\text{F}$  (Rys. 11). Na podstawie

topologicznej analizy rozkładu gęstości elektronowej (opartej na teorii Badera, QTAIM) oszacowano energię obserwowanych wiązań wodorowych. Otrzymane wyniki sugerują, że fluor w 2-fluoroanilinie wspiera oddziaływania N–H···N, jednak pomimo lepszych parametrów geometrycznych, oddziaływanie to wykazuje niewielką różnicę energii w porównaniu do tych obserwowanych w anilinie ( $\Delta E = -0,3$  kcal/mol).



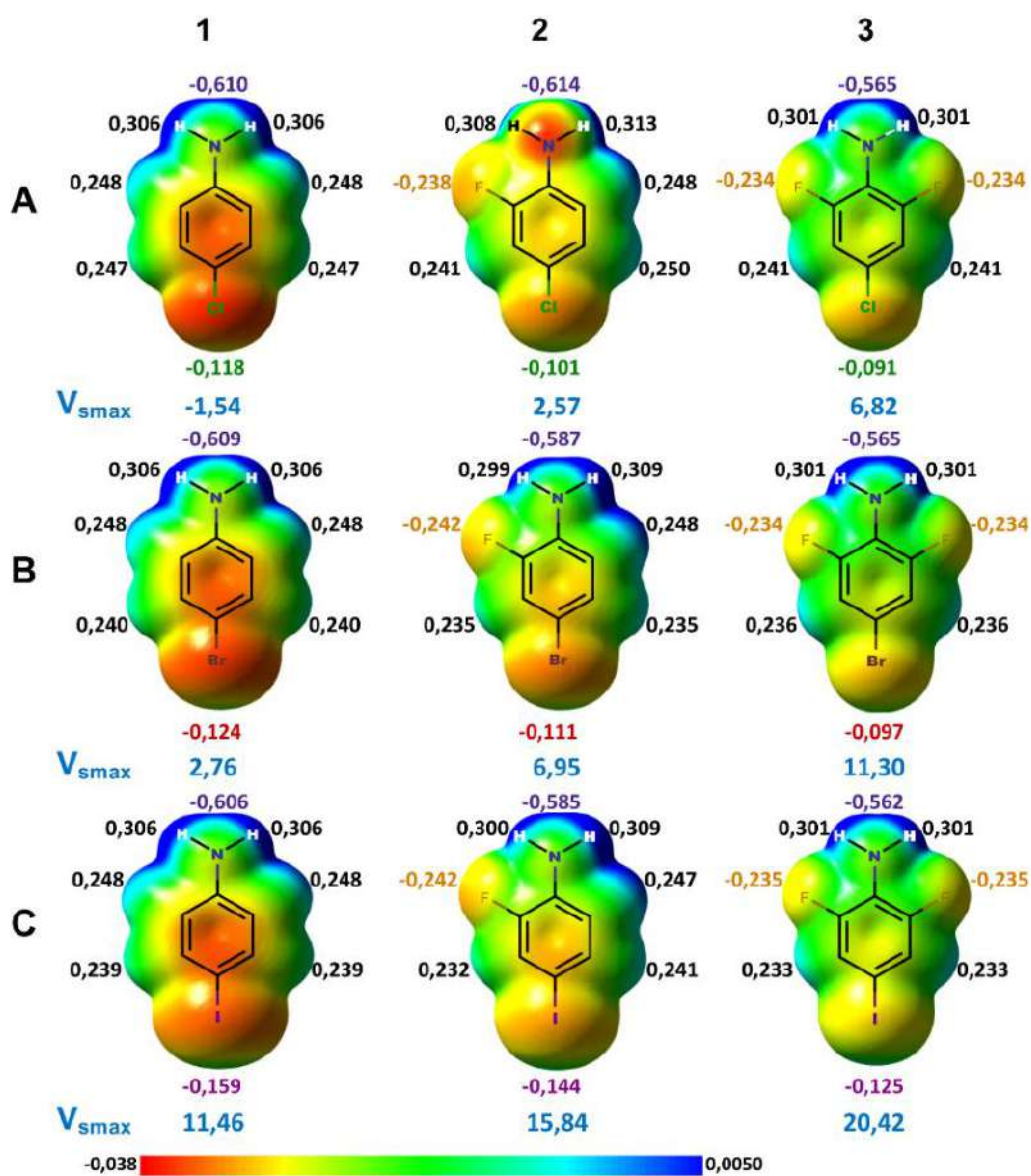
**Rysunek 11.** Wiązania wodorowe obserwowane w strukturach krystalicznych aniliny, 2- i 4-fluoroaniliny; w przypadku 2-F-aniliny obserwuje się nieporządek, co skutkuje dwiema alternatywnymi pozycjami fluoru, których udokładnione wartości obsadzeń (s.o.) zaznaczono na czerwono.

Wyniki tych badań zostały opisane szczegółowo w publikacji: **W. Pietruś**, R. Kurczab, R. Kafel, E. Machalska, J. Kalinowska-Tłuścik, A. Hogendorf, M. Żylewski, M. Baranska, A. J. Bojarski, *How can fluorine directly and indirectly affect the hydrogen bonding in molecular systems? – A case study for monofluoroanilines*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2021**, 252, 119536.

### 5.1.2. Wpływ fluoru na międzycząsteczkowe wiązania niekowalencyjne w modelowym układzie *para*-halogenoanilin

W celu zbadania w jaki sposób obecność fluoru w pozycji *orto* w stosunku do grupy aminowej moduluje właściwości wiązań wodorowych i halogenowych w modelowych układach, wybrano mono- i difluorowane 4-halogenopochodne aniliny (gdzie halogenem były: chlor, brom i jod). Warto podkreślić, że fluorowane aniliny w temperaturze pokojowej są w stanie ciekłym, natomiast *para*-podstawione aniliny są ciałami stałymi (z wyjątkiem 4-chloro-2-fluoroaniliny). Wyznaczone mapy EPS pokazały dobrze znaną tendencję – zwiększenie wielkości  $\sigma$ -dziury ze wzrostem masy halogenu (co spowodowane jest zmniejszeniem elektroujemności i zwiększeniem polaryzowalności podstawnika halogenowego) (Rys. 12). Jednocześnie cięższe halogeny wykazują mniejszą zdolność do

tworzenia wiązań wodorowych, co jest związane ze zmniejszeniem elektroujemności oraz osłabieniem ujemnie naładowanego pasa wokół atomu halogenu (Rys. 12).

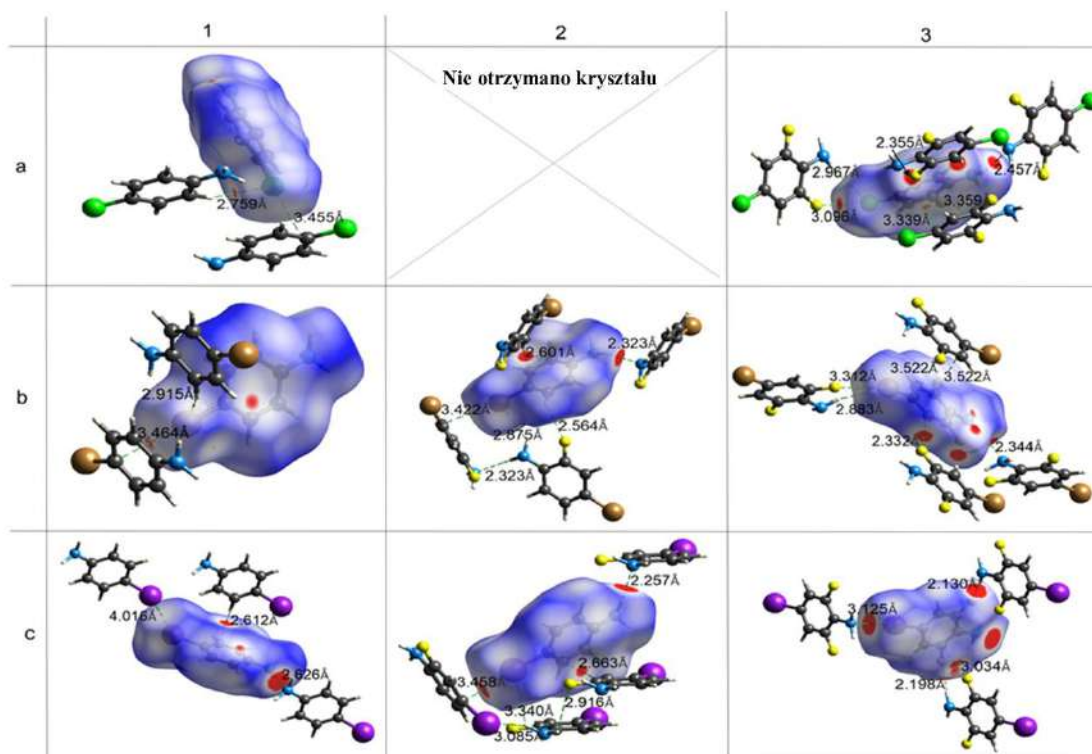


**Rysunek 12.** Mapy powierzchni potencjału elektrostatycznego wraz z ładunkami Mullikena (j.a) oraz wielkością  $\sigma$ -dziury ( $V_{smax}$  [kcal/mol]) obliczonych dla pochodnych 4-halogenoanilin. Kolumna 1, wiersze A, B i C przedstawiają odpowiednio pochodne para Cl, Br i J), a kolumny 2 i 3 przedstawiają ich odpowiednie pochodne 2-F i 2,6-di-F.

Podstawienie fluoru w analizowanych cząsteczkach zwiększyło rozmiar  $\sigma$ -dziury poprzez zwiększenie anizotropii gęstości elektronowej na atomie halogenu, a jednocześnie zmniejszyło właściwości akceptorowe HB halogenu w pozycji 4 poprzez częściowy efekt wyciągania elektronów ujemnego pasa i ich przesunięcie w kierunku pierścienia aromatycznego (Rys. 12).

W przeciwieństwie do wcześniej analizowanych układów (monofluoro podstawionych cząsteczek aniliny) fluor miał odmienny wpływ na własności sąsiadującej grupy aminowej, ponieważ z racji znacznej elektroujemności przyciąga on wolną parę elektronową azotu i przesuwają w kierunku pierścienia aromatycznego, co skutkuje zmniejszeniem ładunku Mullikena na atomie azotu (Rys. 12).

W celu dokładniejszego opisu zaobserwowanych efektów uzyskano i scharakteryzowano pięć nowych struktur krystalicznych mono- i difluorowych pochodnych 4-halogenoaniliny. Wykonano również krystalizację niepodstawionych pochodnych, jednak otrzymane struktury cechowały się takimi samymi parametrami sieciowymi jak te zdeponowane w bazie Cambridge Structural Database (CSD). Z tego powodu do późniejszej analizy porównawczej wykorzystano dane zaczerpnięte z przytoczonej bazy strukturalnej.



**Rysunek 13.** Powierzchnie Hirshfelda wygenerowane dla badanych struktur krystalicznych 4-halogenoanilin, wskazujące na najważniejsze oddziaływania niekowalencyjne, obserwowane dla analizowanych układów w fazie krystalicznej. Kolumna 1, wiersze a, b i c przedstawiają odpowiednio pochodne para Cl, Br i J, a kolumny 2 i 3 przedstawiają ich odpowiednie pochodne 2-F i 2,6-di-F.

W przeciwieństwie do wyników otrzymanych dla monofluoroanilin, bezpośrednie sąsiedztwo fluoru z grupą aminową nie wykazuje efektu indukcyjnego w *para*-

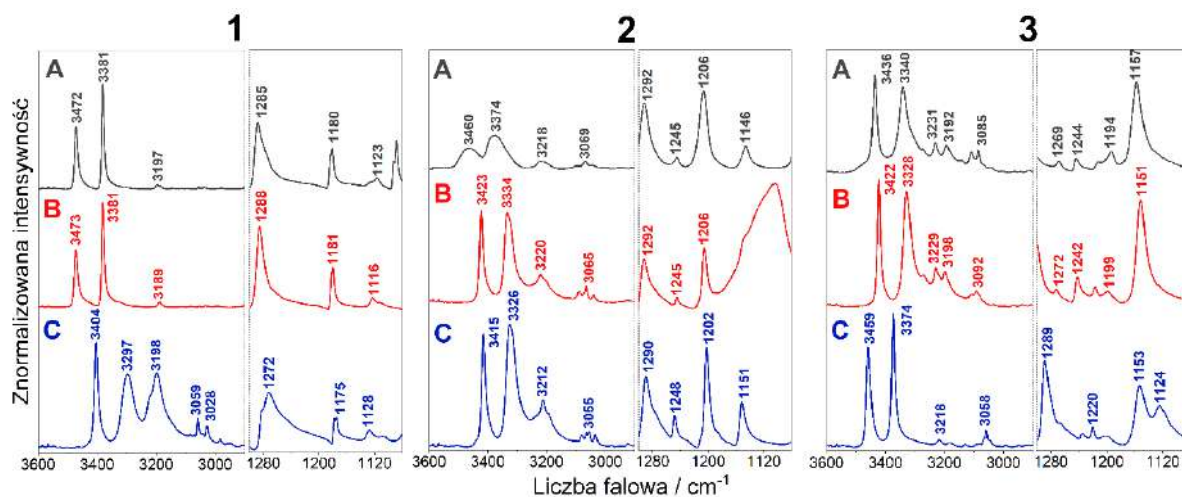
halogenoanilinach, co widoczne jest poprzez zwiększenie piramidalności atomu azotu i silną ekspozycję wolnej pary elektronowej grupy  $\text{NH}_2$  (Rys. 12). Z tego względu wiązania wodorowe  $\text{N-H}\cdots\text{N}$  charakteryzowały się najwyższą energią (Tab. 1) i miały największy wpływ na uporządkowanie struktury kryształu monofluoropochodnych (Rys. 13 – wiersz b1–3). Warto podkreślić, że HB typu  $\text{C-H}\cdots\text{F}$  nie zależą od ładunku zaangażowanych fragmentów i były obecne dla bromo- i jodopochodnej (Rys. 13; wiersz b1–3). Największy wpływ fluoru na architekturę oddziaływań międzycząsteczkowych, a także na zmianę charakteru samego fluoru, można zaobserwować w 2,6-difluoro pochodnych. Wysoka elektroujemność fluoru i duża polaryzowalność wiązania  $\text{C-F}$  wpływają na osłabienie właściwości akceptorowych fluoru w przypadku tworzenia HB i XB. Jak wynika z analizy struktur, fluor jest zaangażowany w wiązania halogenowe (jako akceptor), oddziałując z odsłoniętą  $\sigma$ -dziurą atomu chloru i bromu (efekt ten jest bardziej widoczny dla 4-bromopochodnej) (Rys. 13; wiersz c1–2). Tego typu oddziaływania o zazwyczaj destabilizującym charakterze należą to rzadkich kontaktów halogen-halogen, jednak analiza QTAIM wykazała ich stabilizujący charakter w przypadku analizowanych strukturach. Co ciekawe, im bardziej symetryczna jest cząsteczka, tym wyraźniejsze są obserwowane motywy oddziaływań w strukturach krystalicznych 4-jodoaniliny. Silnie eksponowana  $\sigma$ -dziura jodu tworzy liniowe XB  $\text{J}\cdots\text{N}$ , natomiast fluor zaangażowany jest w silne, prawie liniowe HB z grupą aminową (Rys. 13; wiersz 3c). Pozycja *orto* obu podstawników fluorowych w stosunku do grupy aminowej oraz obecność oddziaływania  $\text{N-H}\cdots\text{F}$  prowokują powstanie rzadkich interakcji  $\text{F}\cdots\text{F}$  (Rys. 13; wiersz 3c). Zidentyfikowany krótki kontakt  $\text{F}\cdots\text{F}$  okazał się oddziaływaniem halogen-halogen typu II, a analiza QTAIM wykazała jego silnie stabilizujący charakter (Rys. 13, Tab. 1). Dodatkowo przeprowadzono statystyczną analizę w/w kontaktów w bazie CSD i stwierdzono, że większość oddziaływań  $\text{F}\cdots\text{F}$  wykazuje geometrię typu I (Rys. 2).

**Tabela 1.** Parametry geometryczne oddziaływań/kontaktów obserwowanych w analizowanych strukturach krystalicznych (odległość sparametryzowana jako D...A) i odpowiadające im energie obliczone metodą QTAIM. Oddziaływania są kolorystycznie oznaczone zgodnie z rodzajem oddziałujących atomów w kryształach (N...N – niebieski, N...X – czerwony, X...Ct – zielony, X...X – magenta, C...X – szary). 1) 4-halogenoaniliny (a – Cl, b – Br, c – I); 2) pochodne 2-fluoro-4-halogenoaniliny; oraz 3) 2,6-difluoro-4-halogenoaniliny.

h	1			2			3		
	Typ oddziaływania	Parametry geometryczne	Energia kcal/mol	Typ oddziaływania	Parametry geometryczne	Energia kcal/mol	Typ oddziaływania	Parametry geometryczne	Energia kcal/mol
a	N-H...Cl	3,719 Å, 142,4°	-1,1	Nie wykryto			N-H...N	3,409 Å, 158,3°	-1,7
	Cl...Cl C-Cl...Cl	3,332 Å, 162,2°	-1,1				N-H...Cl	3,077 Å, 146,7°	-0,6
	C-H...Cl	3,750 Å, 152,8°	-1,7				C-Cl...F Cl...F-C	3,096 Å, 167,2° 142,1°	-1,9
b	N-H...Br	3,908 Å, 147,8°	-0,9	N-H...N	3,245 Å, 152,8°	-2,6	N-H...N	3,305 Å, 160,1°	-2,3
	Br...Ct C-Br...Ct	3,390 Å, 144,7°	-1,1	N-H...Br	3,652 Å, 136,6°	-1,3	N-H...Br	3,859 Å, 163,8°	-1,1
	C-H...Br	3,910 Å, 153,1°	-1,3	Br...Ct C-Br...Ct	3,580 Å, 166,6°	-1,1	C-Br...F Br...F-C	3,312 Å, 158,9° 139,2°	-1,2
c	N-H...N	3,126 Å, 170,8°	-2,6	N-H...N	3,231 Å, 162,8°	-3,0	N-H...F	3,130 Å, 170,9°	-2,4
	N-H...I	3,983 Å, 144,8°	-0,9	N-H...I	3,815 Å, 129,8°	-1,3	F...F	2,858 Å, 130,4° 83,9°	-2,9
	I...I	4,016 Å, 158,4° 121,8°	-0,8	N-H...F	3,512 Å, 120,5°	-0,5	N-H...F	3,200 Å, 172,4°	-3,4
				I...Cl C-I...Ct	3,693 Å, 165,1°	-1,2	F...F	3,138 Å, 124,6° 98,7°	-2,9
						I...N	3,125 Å, 173,8°	-2,9	

Użycie spektroskopii oscylacyjnej (FT-IR i Raman) pozwoliło na dalszą eksplorację obserwowanych kontaktów międzycząsteczkowych w analizowanych strukturach krystalicznych. Pomimo wielu oddziaływań angażujących grupę NH (N-H...N, N-H...X, N-H...F, N-H... $\pi$ ), największe przesunięcie pasma  $\nu_{\text{NH}}$  ( $50 \text{ cm}^{-1}$ ) wiązało się z pojawieniem silnego HB N-H...N w 4-bromo-2-fluoroanilinie w stosunku do niefluorowanej pochodnej i to ono determinowało położenie pasm  $\nu_{\text{NH}}$  (Rys. 14). Dodatkowo, w przypadku 2-fluoro-4-jodopochodnej zaobserwowano przesunięcie pasm  $\nu_{\text{NH}}$  w kierunku wyższych liczb falowych, co może być związane z pojawieniem się HB N-H...F i rozszerzałoby nieklasyczny wpływ wiązań wodorowych z fluorem na inne donory niż CH. W difluoropochodnej chloroaniliny również zaobserwowano duże przesunięcie pasm  $\nu_{\text{NH}}$  spowodowane tworzeniem się wiązania N-H...N (Rys. 14). Dla 2,6-difluoro-4-jodo pochodnej zaobserwowano znaczny wzrost tych pasm w kierunku wyższych liczb falowych ( $\Delta\nu \sim 60 \text{ cm}^{-1}$  w stosunku do niefluorowanej pochodnej), co świadczy o nieintuicyjnym efekcie wiązań wodorowych z fluorem, gdyż

obserwując wiązania wodorowe przesunięcie powinno nastąpić w kierunku wyższych energii (Rys. 14). Jednocześnie warto podkreślić, że wraz ze zwiększającą się liczbą podstawników fluorowych i zwiększającą się masą halogenu, w układzie następował wzrost fluorescencji w widmach ramanowskich, przez co niemożliwe okazało się otrzymanie widma 2,6-difluoro-4-jodoaniliny.



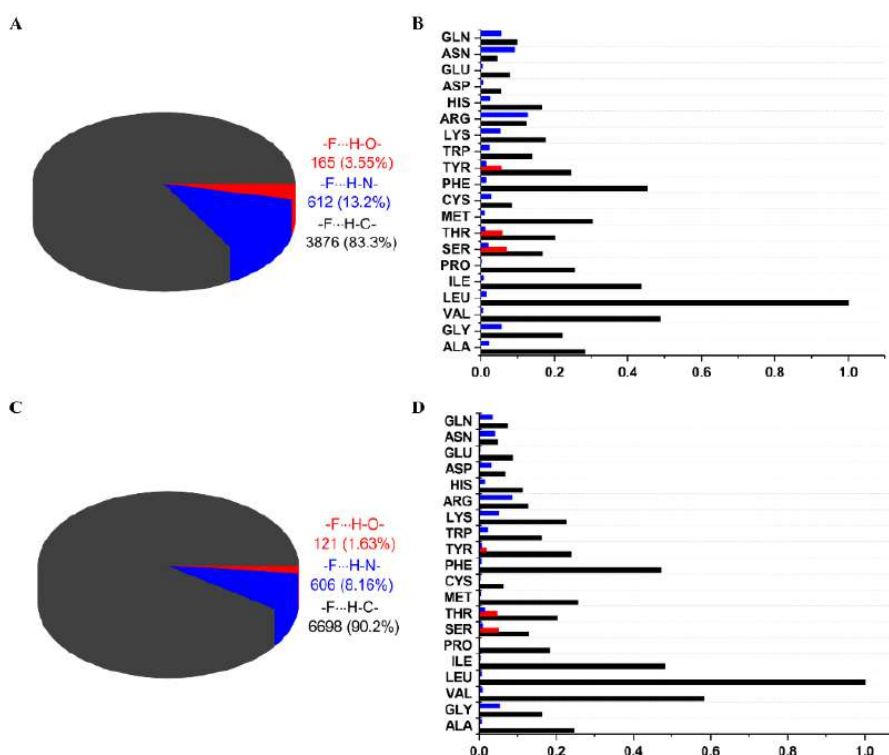
**Rysunek 14.** Porównanie widm FT-IR w zakresie 2800–3650  $\text{cm}^{-1}$  (zakres pasm  $\nu\text{NH}$ ) i 1350–1100  $\text{cm}^{-1}$  (zakres pasm  $\nu\text{CF}$ ) dla 1) 4-halogenoanilin (a – Cl, b – Br, c – I); 2) pochodnych 2-fluoro-4-halogenoanilin; oraz 3) 2,6-difluoro-4-halogenoanilin.

Wyniki tych badań zostały opisane szczegółowo w publikacji: **W. Pietruś**, R. Kurczab, J. Kalinowska-Tłuścik, E. Machalska, D. Golonka, M. Barańska, A. J. Bojarski, *Influence of Fluorine Substitution on Nonbonding Interactions in Selected Para-Halogeno Anilines*, *ChemPhysChem*, **2021**, 22, 2115.

## 5.2. Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe z fluorem w układach biologicznych

Aktywność biologiczna leków determinowana jest między innymi przez oddziaływanie międzycząsteczkowe, które odgrywają istotną rolę w stabilizowaniu układu lek-biomolekuła. Uważa się, że wiązania wodorowe odgrywają kluczową rolę w interakcji leku z celem biologicznym [125–127]. Mimo wysokiej elektroujemności fluoru, pierwiastek ten uważany jest za słaby akceptor wiązań wodorowych, co więcej, wykazuje on tendencję do tworzenia oddziaływań w geometrii kątovej. Z tego powodu przeprowadzono statystyczną analizę struktur z bazy PDB pod kątem natury, preferencji geometrycznych, częstości występowania (z uwzględnieniem typu donora: grupa hydroksylowa, aminowa oraz metylowa) i energii

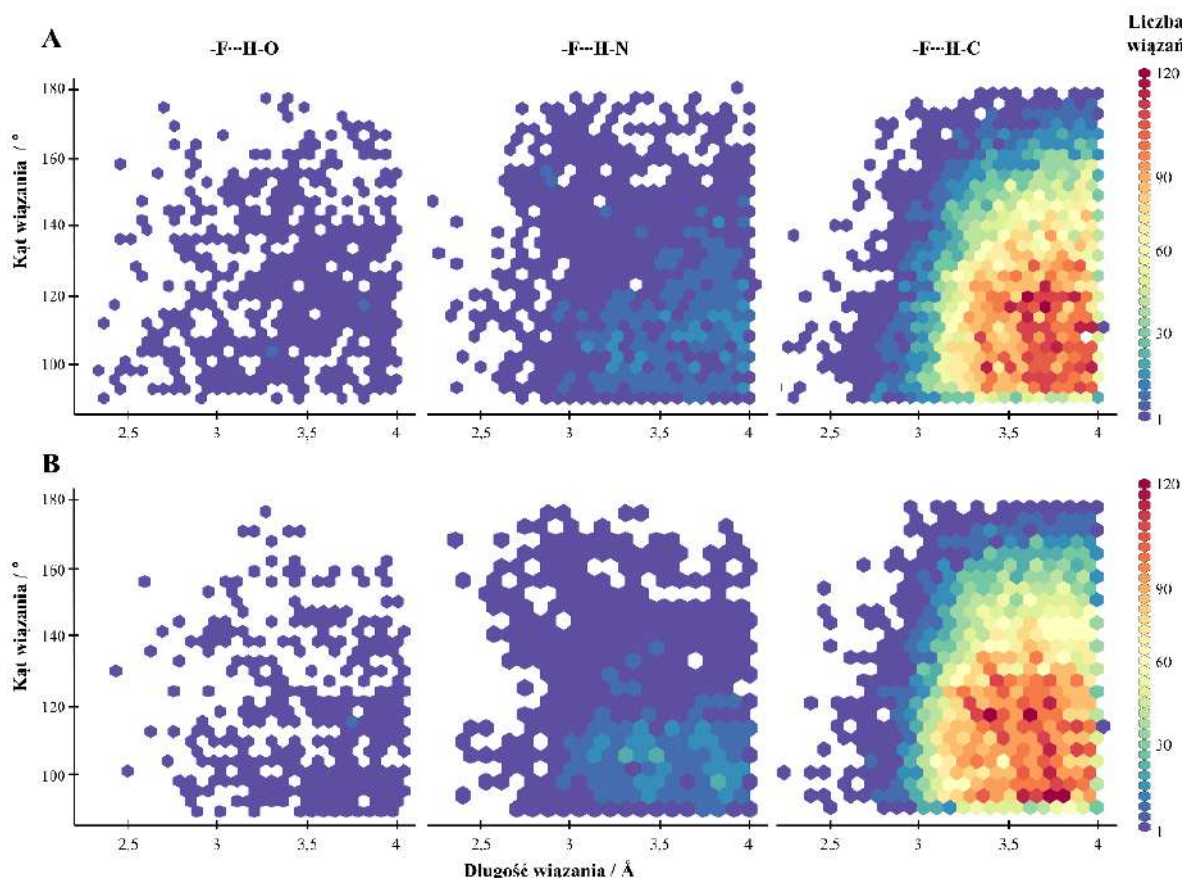
wiązań wodorowych z udziałem fluoru. W analizie rozszerzono zakres standardowych parametrów geometrycznych wiązania wodorowego (kąt:  $90^{\circ}$ – $180^{\circ}$  i odległość donor-akceptor  $< 4 \text{ \AA}$ ), ponieważ celem było określenie wszystkich obserwowanych kontaktów z atomem fluoru. W tym celu wyekstrahowano i zbadano struktury krystaliczne zdeponowane w bazie PDB zawierające fluorowane ligandy. Ze względu na fakt, iż fluor wykazuje odmienne właściwości w zależności od rodzaju atomu węgla z którym jest bezpośrednio związany (aromatyczny, alifatyczny), dlatego w dalszej analizie podzielono wyselekcjonowane cząsteczki ligandów na te zawierające „aromatyczny fluor” ( $F_{ar}$ ) oraz „alifatyczny fluor” ( $F_{al}$ ). W bazie PDB zidentyfikowano 1787 unikalnych struktur zawierających  $F_{al}$  oraz 2324  $F_{ar}$ . W obu przypadkach ilość obserwowanych wiązań wodorowych  $C-H\cdots F$  była zdecydowanie większa niż  $O-H\cdots F$  oraz  $N-H\cdots F$ , co w głównej mierze związane jest z zwiększoną dostępnością donorów CH w układach biologicznych, a dodatkowo ilość tych oddziaływań była dwukrotnie wyższa dla  $F_{ar}$  niż  $F_{al}$  (Rys. 15A i 15C). Wiązania wodorowe  $F_{ar}\cdots H-O$  powstają częściej z resztami SER i THR, podczas gdy te z akceptorem  $F_{al}$  są tworzone przez wszystkie aminokwasy z polarną grupą hydroksylową. Wiązania  $F\cdots H-N$  są tworzone z aminokwasami, które posiadają donorową grupę aminową w łańcuchu bocznym (ARG, LYS, ASN, GLU). Aminokwasy hydrofobowe znacznie częściej tworzą oddziaływania  $F\cdots H-C$ , co sugeruje, że fluor preferuje hydrofobowe otoczenie w układach biologicznych (Rys. 15B i 15D).





**Rysunek 15.** Liczba wiązań wodorowych z udziałem fluoru w wybranych strukturach zdeponowanych w bazie PDB, spełniających założone kryteria geometryczne: (A) między  $F_{al}$  i donorami OH, NH i CH; (C) między  $F_{ar}$  i donorami OH, NH i CH; (B), (D) znormalizowany podział z uwzględnieniem typu oddziaływających aminokwasów.

Na podstawie zaproponowanej klasyfikacji wiązań wodorowych z udziałem F, wygenerowano mapy rozkładu gęstości, przedstawiające parametry geometryczne (zależność długość – kąt HB) wiązań wodorowych obserwowanych w analizowanych strukturach krystalicznych (Rys. 16). Ze względu na niewielką ilość HB tworzonych z grupą hydroksylową i słabą statystykę, nie było możliwe wyciągnięcie pełnych wniosków dla tego typu oddziaływania, natomiast analiza geometrii HB z grupą aminową i metylową wykazały, że fluor częściej tworzy kątowe wiązania wodorowe. Nieliniowość w/w wiązań wodorowych może być spowodowana obecnością silniejszych akceptorów, bądź donorów w cząsteczce, które w istotny sposób determinują sposób jej oddziaływania z biomolekułą.

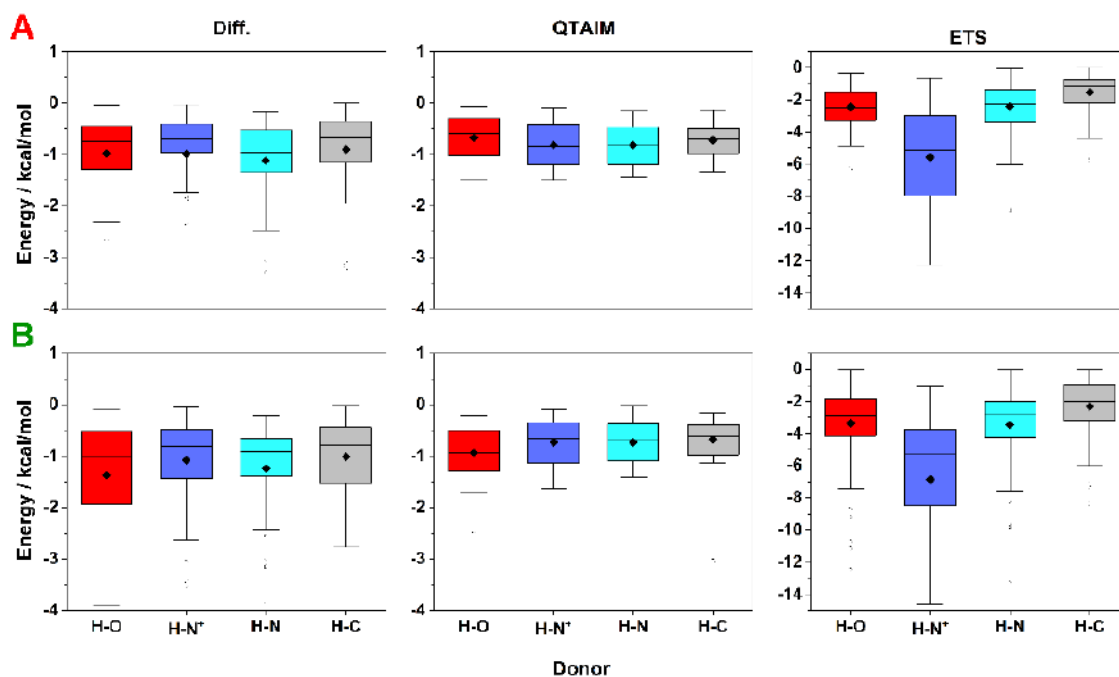


**Rysunek 16.** Mapy rozkładu gęstości parametrów geometrycznych obserwowanych wiązań wodorowych zidentyfikowanych w strukturach z bazy PDB z: (A)  $F_{al}$  and (B)  $F_{ar}$  w roli akceptora.

W celu określenia energii i preferencji geometrycznych wiązań wodorowych z fluorem w układach biologicznych, wykonano obliczenia kwantowo-chemiczne z wykorzystaniem układów ligand–białko wyekstrahowanych z bazy PDB (z donorami OH, NH,  $^+NH$ ). Dla tak przygotowanych układów wykonano obliczenia energii oddziaływania, wykorzystując trzy metody: (1) metodę „różnicową” (Diff.) – energię obliczono jako różnicę między energią oddziałujących fragmentów a sumą energii izolowanych cząsteczek wyznaczoną w programie Gaussian G16 (z użyciem funkcjonu Minnesota M06-2X oraz bazy def2-TZVP), (2) QTAIM – energia obliczona w BCP w programie AIMAll, wykorzystując wcześniej otrzymaną funkcję falową w metodzie różnicowej, (3) ETS – obliczono energię między dwiema oddziałującymi cząsteczkami przy użyciu podejścia ETS-NOCV zaimplementowanego w oprogramowaniu ADF.

W pierwszej kolejności wykonano analizę statystyczną otrzymanych wyników wykorzystując test Pearsona i współczynnika korelacji R wyznaczonego w oprogramowaniu. Otrzymane wyniki wskazały na najwyższą korelację między metodami Diff. i ETS ( $p < 0,05$ ; współczynnik korelacji  $\sim 1$ ), ponieważ uwzględniają one energię całego systemu, a ponad 70% obliczonych energii oddziaływań wykazywało ten sam charakter (stabilizujący lub destabilizujący).

Szczegółowa analiza poszczególnych oddziaływań potwierdziła, że fluor jest słabym akceptorem HB dla wszystkich typów donorów, gdyż nie odnotowano istotnych różnic w wyznaczonych wartościach energii wiązań wodorowych (Rys. 17). Dodatkowo, wyniki otrzymane metodą ETS-NOCV pokazały, że największy wpływ na energię wiązań wodorowych z fluorem ma przyczynek kulombowski dla nienaładowanych donorów (OH, NH, CH) i przyczynek wymiennie-korelacyjny dla donora  $^+NH$ . Zaobserwowano, że optymalne zakresy parametrów geometrycznych dla HB z fluorem w środowisku białka wynoszą  $150\text{--}120^\circ$  i  $2,9\text{--}3,6 \text{ \AA}$ . Dla oddziaływań  $F \cdots N^+$  odległość donor-akceptor w HB, krótsza niż  $2,8 \text{ \AA}$ , wykazywała charakter destabilizujący w prawie 70% przypadków. Według wyników uzyskanych z analizy ETS-NOCV przyczyną destabilizującego charakteru krótszych HB z fluorem może być wysoka wartość przyczynku energii kinetycznej. Dodatkowo znaleziono, że dzięki trzem wolnym parom elektronowym fluoru, energia HB z udziałem F zależy tylko od długości HB, a nie zależy od kąta HB.



**Rysunek 17.** Wykresy pudełkowe przedstawiające rozkład energii wiązań wodorowych z fluorem związanym z węglem: (A) alifatycznym, (B) aromatycznym. Porównano wyniki otrzymane dla poszczególnych donorów (OH,  $^+NH$ , NH i CH), a także stosowanych metod obliczeniowych (Diff, QTAIM i ETS).

Zaproponowane zakresy optymalnych parametrów geometrycznych o najwyższych wartościach energii nie pokrywały się z najczęściej występującymi wartościami odległości i kątów w/w oddziaływań w strukturach krystalicznych bazy PDB. Sugerować to może, że HB z fluorem nie odgrywają istotnej roli w stabilizacji układu L–R i często powstają przy niekorzystnych parametrach geometrycznych. Wyciągnięte wnioski są zgodne z teorią Margareth Etter, która mówi, że silniejsze wiązania wodorowe tworzą się w pierwszej kolejności, natomiast w dalszej kolejności oddziałują słabsze akceptory i donory HB.

Wyniki tych badań zostały opisane szczegółowo w publikacji: **W. Pietruś**, R. Kafel, A. J. Bojarski, R. Kurczab, *Hydrogen Bonds with Fluorine in Ligand–Protein Complexes-the PDB Analysis and Energy Calculations*, *Molecules*, **2022**, 27(3), 1005.

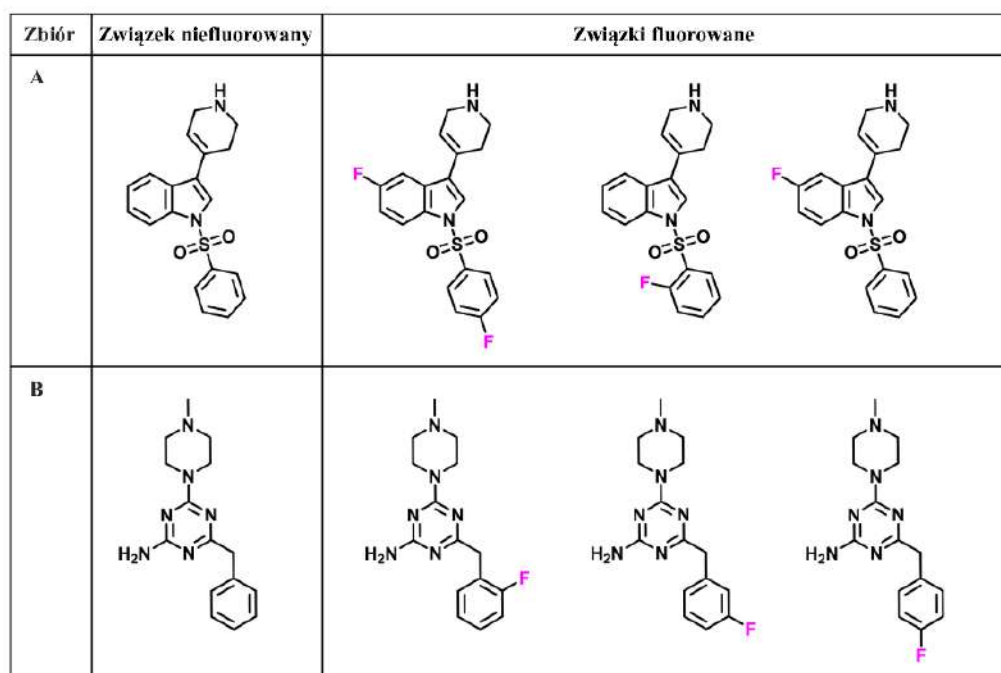
### 5.3. Klify aktywności na przykładzie fluorowanych ligandów aminergicznych receptorów klasy A GPCR

Obecnie niemal 700 unikalnych białek to scharakteryzowane cele terapeutyczne dla stosowanych leków. Wśród nich można wyróżnić pięć najczęściej wykorzystywanych w terapii: receptory sprzężone z białkiem G (GPCR), kanały jonowe, kinazy, receptory jądrowe i proteazy. Farmaceutyki, których mechanizm działania opiera się na wiązaniu do receptorów GPCR stanowią 34% wszystkich sprzedawanych leków, osiągając w latach 2011–2015 dochód prawie 900 mld USD [128]. Wspomniane białka w zdecydowanej większości to receptory błonowe i są często wykorzystywane w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak: choroba Parkinsona, choroba Alzheimerera, schizofrenia czy depresja, jak również chorób immunologicznych, czy układu krążenia. Wiele ostatnich badań i doniesień naukowych pokazuje efektywne leczenie chorób nowotworowych kojarzonych z pośrednim działaniem ligandów GPCR na komórki nowotworowe [128].

Biorąc pod uwagę potencjał terapeutyczny GPCR i substytucji fluoru jako standardowej strategii projektowania nowych leków o wysokiej aktywności biologicznej, wykorzystano podejście klifów aktywności (AC) do badania fluorowanych ligandów zdeponowanych w bazie ChEMBL [129]. Praca ta została częściowo wykonana w trakcie stażu naukowego w *Department of Life Science, Informatics and Data Science at the b-it Institute* Uniwersytetu w Bonn, we współpracy z grupą profesora Jürgena Bajoratha.

Wśród wszystkich cząsteczek znajdujących się w/w bazie, zidentyfikowano prawie 1200 niefluorowanych związków, które miały co najmniej jeden analog strukturalny zawierający w swej strukturze atom(y) fluoru i posiadały wyznaczoną aktywność biologiczną przynajmniej do jednego z 35 aminergicznych receptorów klasy A GPCR. Jeśli co najmniej dwa związki były aktywne względem tego samego celu biologicznego i różniły się tylko liczbą podstawionych atomów fluoru (co wymagało obecności niefluorowanego związku i co najmniej jednego fluorowanego analogu), łączono je we fluorowy zestaw SAR (FSAR) (Rys. 18).

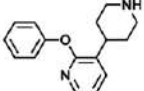
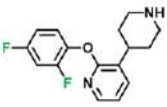
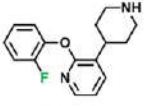
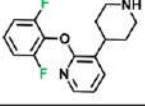
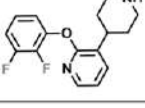
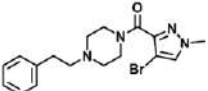
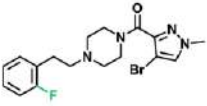
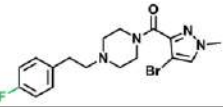
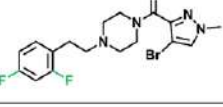
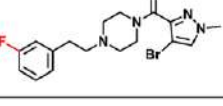
Dla zbudowanych zestawów ligandów zaprojektowano nową strukturę reprezentacji sieci, która pokazuje strukturalne zależności pomiędzy zestawami związków, a nie pomiędzy poszczególnymi związkami.



**Rysunek 18.** Dwa przykładowe zestawy FSAR (A) i (B) z ligandami receptora serotoninowego 6 (5-HT<sub>6</sub>). Po lewej stronie pokazano niefluorowany związek aktywny z każdego zestawu, a po prawej stronie odpowiednie fluorowane analogi.

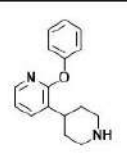
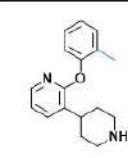
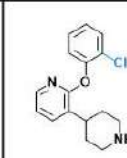
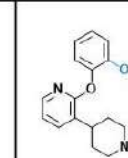
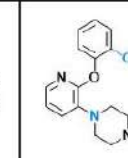

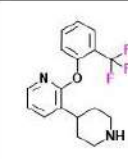

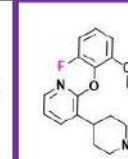
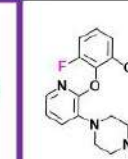


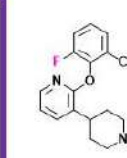
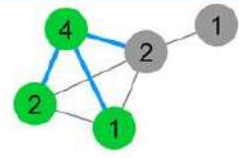


Formalizm klifów aktywności został zmodyfikowany tak, aby para niefluorowanych/fluorowanych analogów z tego samego zestawu FSAR została sklasyfikowana jako AC, jeśli  $\Delta pPot$  (różnica pomiędzy wartością aktywności niefluorowego związku i fluorowanego) wynosiło przynajmniej  $|1,7|$  (odpowiada to 50-krotnej różnicy w aktywności biologicznej w funkcji logarytmicznej). W standardowym podejściu AC zakładają 100-krotną zmianę aktywności biologicznej (tj.  $\Delta pPot > 2$ ). Dodatkowo, po raz pierwszy scharakteryzowano pozytywne oraz negatywne klify aktywności, w celu określenia pożądaných i niekorzystnych miejsc substytucji fluoru. Na podstawie różnicy wartości aktywności biologicznych po podstawieniu fluorem, wyznaczonej dla zbioru FSAR (względem niefluorowanego związku) wyróżniono pięć efektów fluorowania (i)–(v) (Rys. 19):

- (i) Brak efektu:  $\Delta pPot > -0,3$  i  $\Delta pPot < 0,3$
- (ii) Efekt pozytywny:  $\Delta pPot \geq -0,3$  i  $\Delta pPot > 0,3$
- (iii) Efekt negatywny:  $\Delta pPot \leq -0,3$  i  $\Delta pPot < 0,3$
- (iv) Efekt mieszany:  $\Delta pPot < -0,3$  i  $\Delta pPot > 0,3$
- (v) Efekt niejednoznaczny:  $\Delta pPot \leq -1,7$  i  $\Delta pPot \geq 1,7$

A	Związek niefluorowany	Związki niefluorowane	pK <sub>i</sub>	Efekt fluorowania		Zbiór FSAR: pozytywny efekt
 <p>pK<sub>i</sub> 7.0</p>		7.5	0.5	pozytywny efekt		
		7.9	0.9	pozytywny efekt		
		8.1	1.1	pozytywny efekt		
		6.8	-0.2	brak efektu		
B	Związek niefluorowany	Związki niefluorowane	pK <sub>i</sub>	Efekt fluorowania		Zbiór FSAR: efekt mieszany
 <p>pK<sub>i</sub> 7.2</p>		7.8	0.6	pozytywny efekt		
		8.5	1.3	pozytywny efekt		
		9.0	1.8	pozytywny efekt klif aktywności		
		6.3	-0.9	negatywny efekt		

**Rysunek 19.** Dwa przykładowe zbiory FSAR – dla ligandów (A) receptora serotoninowego 1A (5-HT<sub>1A</sub>), (B) receptora serotoninowego 2A (5-HT<sub>2A</sub>). Po prawej stronie przyporządkowano efekt dla poszczególnych fluorowanych analogów na podstawie różnicy  $\Delta pK_i$  oraz podano sumaryczny efekt dla zbioru FSAR.

W celu porównania podobieństwa różnych zestawów FSAR, zastosowano algorytm „dopasowanych par molekularnych” (*matched molecular pair* – MMP), który pozwala na rozszerzenie SAR poprzez fragmentację egzocyklicznych pojedynczych wiązań kowalencyjnych (Rys. 20).

	$pK_i$ 7,0		$pK_i$ 7,22		$pK_i$ 7,8		$pK_i$ 7,04		$pK_i$ 8,35
	-0,23		-0,07		-0,03		0,78		0,09
	1,15		0,78		0,16	 <p><b>Cel biologiczny:</b> Receptor serotoninowy 1a (5-HT<sub>1a</sub>)</p> <p><b>Liczba fluorowanych związków:</b> 4, 2, 2, 1, 1</p> <p><b>Efekt fluorowania:</b> Pozytywny oraz brak efektu</p> <p><b>Klif aktywności</b> Nie</p>			
	0,54								
	0,89								

**Rysunek 20.** Zestawy FSAR pogrupowane z zastosowaniem algorytmu MMP na przykładzie ligandów receptora serotoninowego 1A (5-HT<sub>1A</sub>).

Analiza wykazała, że nie ma wyraźnej zależności między miejscem podstawienia fluoru w pierścieniu aromatycznym, a aktywnością biologiczną cząsteczek (odpowiednio 556/619 pozytywnych/negatywnych fluorowanych pochodnych). Szczegółowa analiza pozycji substytucji (*orto*, *meta*, *para*) wykazała, że pochodna z fluorem w pozycji *orto* wykazywała dwukrotnie większe prawdopodobieństwo wywołania pozytywnego (wzrostu aktywności) efektu, niż negatywnego; dla pochodnych *meta* i *para* nie zaobserwowano żadnego trendu. Warto podkreślić, że fluor przyłączony do węgla alifatycznego pięciokrotnie częściej wpływał negatywnie na aktywność biologiczną (spośród 16 alifatycznych AC zależnych od fluoru, 15 było negatywnych, a tylko jeden pozytywny). Pomimo, iż fluor jest powszechnie uważany za bioizoster atomu wodoru, pojedyncze podstawienie fluorem może prowadzić do znacznych zmian w selektywności związków bioaktywnych, a także zmiany ich funkcji biologicznej (np. z odwrotnego agonisty na antagonistę).

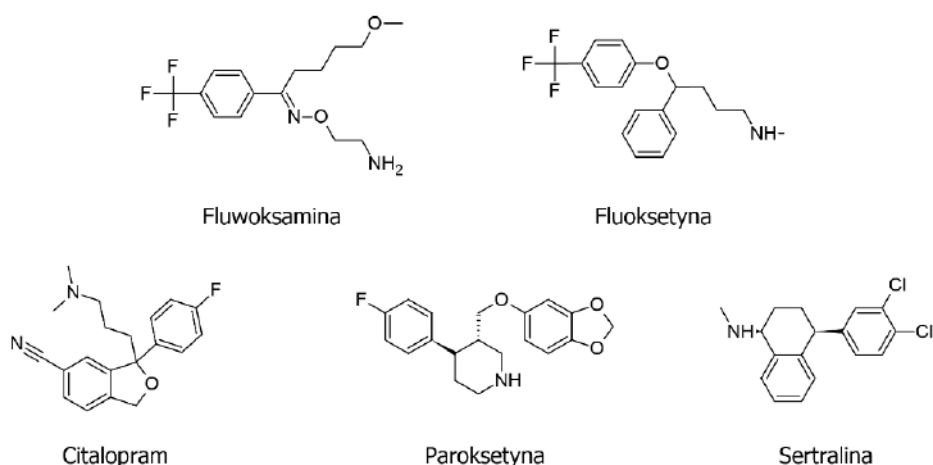
Wyniki tych badań zostały opisane szczegółowo w publikacji: **W. Pietruś**, R. Kurczab, D. Stumpfe, A. J. Bojarski, J. Bajorath, *Data-Driven Analysis of Fluorination of Ligands of Aminergic G Protein Coupled Receptors*, *Biomolecules* **2021**, 11, 1647.

#### **5.4. Modulowanie aktywności biologicznej znanych leków poprzez wprowadzanie atomu halogenu**

Transporter serotoniny (SERT) jest białkiem, które zbudowane jest z 630 aminokwasów, tworzących 12 domen transbłonowych (TM) 1,2. Selekttywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI), wiążącymi się z SERT, są jednymi z najczęściej przepisywanych leków stosowanych w leczeniu depresji. Wszystkie zatwierdzone SSRI zawierają atom(y) fluoru lub chloru (Rys. 21). W przypadku fluoksetyny ( $K_i = 17$  nM), zastąpienie grupy trifluorometylowej fluorem ( $K_i = 142$  nM) i chlorem ( $K_i = 638$  nM) spowodowało spadek powinowactwa do SERT 14, natomiast pochodna jodowa wykazywała niewielki wzrost powinowactwa do SERT ( $K_i = 14,4$  nM) 15. W literaturze patentowej można znaleźć pochodne fluwoksaminy z fluorem, chlorem i bromem, ale brak jest w niej uzupełniających danych biologicznych, pozwalających na porównanie ich aktywności względem SERT 16.

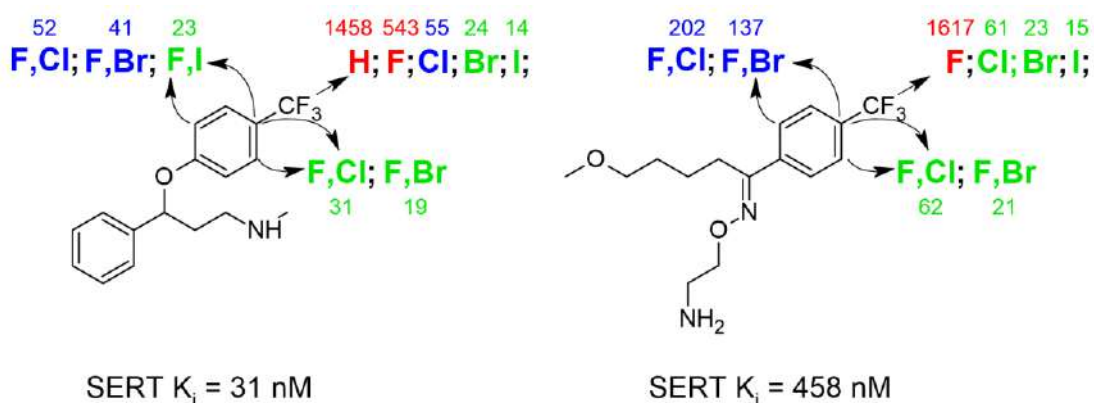
W celu wyjaśnienia roli halogenowców w wiązaniu się SSRI do SERT, zaprojektowano oraz zsyntezowano 22 analogi strukturalne fluoksetyny i fluwoksaminy (podstawione atomami fluoru, chloru, bromu i jodu w miejsce grupy trifluorometylowej). Ponadto, w przypadku chloro, bromo oraz jodopochodnych, wprowadzono w tym samym pierścieniu aromatycznym dodatkowy atom fluoru, aby wywołać zmianę rozkład gęstości elektronowej na podstawniku halogenowym (zwiększenie rozmiaru  $\sigma$ -dziury).





**Rysunek 21.** Struktury zatwierdzonych przez FDA selektywnych inhibitorów zwrotnego wychwyty serotoniny, zawierające atomy halogenu (dane dostępne na <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/InformationbyDrugClass/ucm283587.htm>).

Wśród zsyntetyzowanych analogów wymiana grupy trifluorometylowej na cięższe halogeny (chlor, brom i jod) na ogół powodowała wzrost powinowactwa do SERT (Rys. 22). Dodatkowo wprowadzenie atomu fluoru skutkowało jeszcze bardziej aktywnymi pochodnymi. Dotyczy to wszystkich związków z wyjątkiem podstawienia 2-fluoro-4-chloro/bromo-fluoksetyny, gdzie wprowadzenie atomu fluoru zmniejszyło powinowactwo do SERT odpowiednio 1,6-/1,3-krotnie.



**Rysunek 22.** Zależność SAR dla zsyntetyzowanych analogów fluoksetyny i fluoksaminy. Powinowactwo do SERT ( $K_i$  [nM]) podano przy symbolach podstawników. Kolorami oznaczono zmianę aktywności biologicznej w stosunku do trifluorometylowych związków: czerwony – duży spadek, niebieski – umiarkowany spadek i zielony – brak zmiany lub wzrost aktywności.

Dla otrzymanych danych biologicznych wykonano szeroko zakrojone modelowanie molekularne oraz obliczenia kwantowo-mechaniczne celem wyjaśnienia wpływu fluoru na zmianę powinowactwa do SERT. Wszystkie otrzymane związki, wraz z ligandami referencyjnymi, zadokowano do struktury krystalicznej SERT (PDB ID: 5I6X) z wykorzystaniem algorytmu dokowania z indukowanym dopasowaniem, które pozwala na swobodną relaksację aminokwasów znajdujących się w kieszeni wiążącej. Dokowane związki wykazywały dwa różne sposoby wiązania (*binding mode*). W pierwszym, grupa -CF<sub>3</sub>/halogen znajdowała się w lipofilowej kieszeni pomiędzy helisami TM3 i TM8, złożonej z łańcuchów bocznych I172, A173, Y176 i L443, a zasadowy atom azotu liganda tworzył mostek solny z kwasem asparaginowym D98. W drugiej orientacji związek był odwrócony, a grupa -CF<sub>3</sub>/halogen były skierowane w stronę helisy TM10, wskazując na reszty E493 lub T497. Stwierdzono, że w tej pozycji atom halogenu (chlor, brom) jest zaangażowany w wiązanie halogenowe. W większości przypadków parametry geometryczne utworzonych wiązań halogenowych mieściły się w optymalnych granicach. Zasadowy atom azotu nadal tworzył wiązanie wodorowe z D98. W celu dalszej analizy SAR wykonano symulację dynamiki molekularnej dla najbardziej aktywnych pochodnych. W przypadku każdego badanego analogu, oddziaływanie halogenowe tworzyło się szybko i utrzymywało liniowość XB. W celu ustalenia dokładniejszej korelacji między rodzajem atomu halogenu a siłą oddziaływań ligand-receptor, obliczono rozmiar  $\sigma$ -dziury (Tab. 2).

**Tabela 2.** Obliczone wartości wielkości  $\sigma$ -dziury [kcal/mol] dla otrzymanych pochodnych fluwoksaminy i fluoksetyny.

<b>Pochodne fluoksetyny</b>								
<b>Pochodna</b>	4Cl	4Cl2F	4Cl3F	4Br	4Br2F	4Br3F	4I	4I2F
<b>Rozmiar <math>\sigma</math>-dziury [kcal/mol]</b>	29,7	33,4	32,3	33,5	37,3	36,7	41,8	45,7
<b>Pochodne fluwoksaminy</b>								
<b>Pochodna</b>	4Cl	4Cl2F	4Cl3F	4Br	4Br2F	4Br3F	4I	
<b>Rozmiar <math>\sigma</math>-dziury [kcal/mol]</b>	33,5	39,5	33,4	37,1	42,8	27,6	45,3	

Zwiększone powinowactwo do SERT obserwowane w przypadku związków z cięższymi halogenami prowadzi do wniosku, że rozmiar  $\sigma$ -dziury może być czynnikiem odpowiedzialnym za tę zmianę. Rzeczywiście, obliczone wartości rozmiaru  $\sigma$ -dziury dobrze korelują

z aktywnością monopodstawionych pochodnych. Wprowadzenie atomu fluoru w większości przypadków zwiększa tę wartość, co jednak nie przekłada się na wyższe powinowactwo do SERT. Dodatkowy atom fluoru, pomimo zwiększenia rozmiaru  $\sigma$ -dziury halogenu, brały udział w innych oddziaływaniach (najprawdopodobniej destabilizujących), które osłabiały wiązanie liganda z receptorem. W związku z tym przeprowadzono analizę QTAIM oraz ETS-NOCV celem wyjaśnienia odstępstwa od założonego SAR. W tym celu przeprowadzono dwukrotną optymalizację QM/MM (połączony model optymalizacji z wykorzystaniem obliczeń kwantowo-mechanicznych oraz pól siłowych), a otrzymane pozycje wybranych związków w kieszeni wiążącej SERT były przedmiotem dalszej analizy. Analiza QTAIM pozwoliła stwierdzić, że obok wiązań halogenowych, istotny udział w stabilizacji układu L-R miały wiązania wodorowe. Dodatkowo, dla najbardziej aktywnej 3,4-dichloropochodnej zaobserwowano obecność hybrydowego wiązania X-HBD (hybrydowe oddziaływanie wodorowo-halogenowe), powstające pomiędzy atomami chloru i grupą hydroksylową T497 lub Y175. Jednocześnie analiza ETS-NOCV wykazała duży udział energii dyspersyjnej w stabilizacji układu L-R. Podstawienie fluoru zwiększało rozmiar  $\sigma$ -dziury, zmniejszając właściwości akceptorowe HB halogenów. Hybrydowy rodzaj oddziaływania X-HBD dla chloru, bromu oraz jodu, wymaga zbalansowanych właściwości donorowo (XB) – akceptorowych (HB), dlatego fluorowanie okazało się niekorzystnym zabiegiem dla tej serii związków.

Wyniki tych badań zostały opisane szczegółowo w publikacji: J. Staroń, **W. Pietruś**, R. Bugno, R. Kureczab, G. Satała, D. Warszycki, T. Lenda, A. Wantuch, A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, *Tuning the activity of known drugs via the introduction of halogen atoms, a case study of SERT ligands – Fluoxetine and fluvoxamine*, European Journal of Medicinal Chemistry, **2021**, 220, 113533.

## 6. Wnioski

Do realizacji założonych celów badawczych, będących podstawą przedstawionej rozprawy doktorskiej, wykorzystano metody eksperymentalne (spektroskopię w podczerwieni, ramanowską oraz rentgenowską analizę strukturalną) jak również metody obliczeniowe (obliczenia kwantowo-mechaniczne i metody modelowania molekularnego). Przeprowadzono również analizę danych dostępnych w bazach krystalograficznych CSD i PDB, repozytorium zatwierdzonych leków DrugCentral2021 oraz bazę ChEMBL.

Opis efektu fluorowania na właściwości związków organicznych, głównie w aspekcie bioaktywności, rozpoczęto od analizy bezpośredniego i pośredniego wpływu fluoru na międzycząsteczkowe wiązania wodorowe w układzie modelowym aniliny (**P1**). Wykazano, że pozycja tego podstawnika w układzie aromatycznym istotnie zmienia zasadowość grupy aminowej oraz protonów w pierścieniu, jednocześnie zmniejszając dostępność wolnej pary elektronowej atomu azotu (szczególnie w *meta*-fluoro pochodnej). Za pomocą dynamiki molekularnej *ab initio*, w niemal idealny sposób odtworzono eksperymentalne widma IR, co stało się podstawą do przeprowadzenia analizy otrzymanej trajektorii pod kątem ilości i rodzajów powstających wiązań wodorowych. Wszystkie wyniki wskazują na osłabienie i zmniejszenie częstotliwości powstania HB, w których uczestniczy grupa aminowa przy jednoczesnym wzroście znaczenia słabych wiązań wodorowych z donorem typu CH.

Kolejnym etapem prowadzonych badań było określenie wpływu fluoru na tworzenie wiązań halogenowych i wodorowych. W tym celu przeprowadzono analizę struktur krystalicznych mono- i difluorowanych (w pozycji *orto*) pochodnych *para*-halogenoanilin (Cl, Br, J) (**P2**) oraz niefluorowanych pochodnych. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych dla monofluoroanilin (**P1**), bezpośrednie sąsiedztwo fluoru w stosunku do grupy aminowej w 4-halogenoanilinach nie wywołuje znaczącego efektu indukcyjnego, a dostępność wolnej pary elektronowej azotu zwiększa się. W difluorowanych pochodnych fluor staje się konkurencyjnym i atrakcyjnym akceptorem HB i XB oraz zwiększa prawdopodobieństwo powstania oddziaływań halogen-halogen (Cl $\cdots$ F, Br $\cdots$ F, F $\cdots$ F), częściowo poprzez zwiększenie rozmiaru  $\sigma$ -dziury na atomach halogenu. Uzyskane wyniki spektroskopowe sugerują, że wiązania wodorowe z fluorem w roli akceptora powodują przesunięcie pasm rozciągających grup donorowych w kierunku wyższych liczb falowych. Efekt ten był nieoczekiwany, gdyż odbiega od efektu uzyskanego dla standardowych wiązań wodorowych (np. N–H $\cdots$ N, O–H $\cdots$ N).

Następnie przeniesiono analizę oddziaływań z fluorem z układów modelowych do układów biologicznych, w celu określenia roli fluoru w tworzeniu stabilizujących oddziaływań z donorami HB (**P3**). Wyniki pokazują istotne różnice w częstości tworzenia HB z różnymi aminokwasami w zależności od miejsca podstawienia fluoru (węgiel aromatyczny, węgiel alifatyczny). Dodatkowo wyniki sugerują, że fluor preferuje hydrofobowe otoczenie w układach biologicznych. Warto zauważyć, że energia HB z fluorem nie jest silnie zależna od parametru kąтового tych oddziaływań, a jedynie odległości donor-akceptor. Nie odnotowano istotnych różnic w energiach HB z akceptorem fluorowym w zależności od typu donora, co wskazuje na to, że fluor jest słabym akceptorem dla wszystkich typów grup donorowych. W analizowanych układach, optymalne zakresy parametrów geometrycznych dla HB z fluorem wynoszą  $150\text{--}120^\circ$  i  $2,9\text{--}3,6\text{\AA}$ . Wszystkie te wyniki sugerują, że fluor nie tworzy silnych, stabilizujących oddziaływań międzycząsteczkowych, a zatem wydaje się, że jego pośredni wpływ na związki biologicznie aktywne (efekty elektrostatyczne, indukcyjne i rezonansowe) ma większe znaczenie przy projektowaniu leków niż tworzenie dodatkowych oddziaływań z fluorem.

Kolejny etap badań dotyczył próby znalezienia racjonalnych zasad projektowania nowych, fluorowanych związków biologicznie aktywnych, działających na aminergiczne receptory klasy A GPCR (**P4**). W tym celu przeszukano bazę bioinformatyczną ChEMBL w celu zidentyfikowania par związków niefluorowany-fluorowany analog (FSAR), a następnie zmodyfikowano algorytm klifów aktywności (AC) i analizę dopasowanych par molekularnych (MMP). Zidentyfikowano prawie 1200 niefluorowanych ligandów dla 35 aminergicznych GPCR, które miały co najmniej jeden fluorowany analog. Szczegółowa analiza otrzymanych zestawów wskazuje, że fluorowanie związków w pierścieniu aromatycznym w pozycji *orto* ma korzystny wpływ na bioaktywność, natomiast fluorowanie fragmentów alifatycznych najczęściej prowadziło do spadku aktywności biologicznej. Pomimo, że fluor uznawany jest za bioizoster wodoru, jego pojedyncza substytucja może doprowadzić do istotnych zmian w selektywności związków, a także zmiany ich funkcji biologicznej.

Ostatnia z prac dotyczyła wyjaśnienia wpływu i roli fluoru obecnego w cząsteczkach inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny (SRRI) na aktywność i powinowactwo do transportera serotoniny (SERT). Przeprowadzone badania wykazały, że fluor istotnie zwiększa rozmiar  $\sigma$ -dziury dla pozostałych halogenowców znajdujących się w strukturze i jego wpływ jest zależny od pozycji podstawienia w pierścieniu aromatycznym. Dodatkowo, fluor zmniejsza właściwości akceptorowe HB halogenów, poprzez wyciągnięcie elektronów w kierunku

pierścienia aromatycznego. Warto również wspomnieć, że przeprowadzona teoretyczna analiza modelu wiązania otrzymanych pochodnych SSRI do SERT wykazała możliwość powstania korzystnych oddziaływań X-HBD (hybrydowe oddziaływanie XB i HB, przy czym HB ma większy udział w energii interakcji), które tworzyły się z treoniną T497 bądź kwasem glutaminowym E493. Ze względu na dualny charakter oddziaływań X-HBD, sumaryczny efekt zamiany fluoru na atom halogenu był niekorzystny i jego wpływ na aktywność biologiczną był zanedbywalny.

Oprócz przytoczonych powyżej wyników, podczas realizacji pracy doktorskiej wykonano również analizę wpływu fluoru na międzycząsteczkowe wiązania wodorowe w układzie modelowym aniliny, z wykorzystaniem różnych rozpuszczalników (m.in. metanolu i DMSO). Badania te stanowią rozszerzenie poprzedniej pracy (**P1**). Potwierdzono, że fluor w istotny sposób zmniejsza dostępność wolnej pary elektronowej azotu (szczególnie w *meta* fluoropochodnej), jednocześnie zwiększając właściwości donorowe grupy aminowej poprzez zwiększenie kwasowości protonów.

Wykonano, również dokładniejszą analizę klifów aktywności ( $F_i$ SAR) (rozszerzenie badań przedstawionych w **P4**), która bierze pod uwagę tylko izomeryczne pochodne fluorowe, aby w dokładny sposób określić wpływ miejsca podstawienia fluoru na aktywność biologiczną w aminergicznym receptorach klasy A GPCR. Oba manuskrypty są w zaawansowanym stopniu przygotowania i zostaną wkrótce wysłane do recenzji.

## 7. Bibliografia

1. Langley, R.H.; Welch, L. Fluorine. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 759, doi:10.1021/ed060p759.
2. Ostercamp, D.L.; Brunsvold, R. Chemical Aspects of General Anesthesia: Part I. From Ether to Halothane. *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 1821, doi:10.1021/ed083p1821.
3. Fried, J.; Sabo, E.F. 9 $\alpha$ -Fluoro derivatives of cortisone and hydrocortisone. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 1455–1456, doi:10.1021/ja01634a101.
4. Swallow, S. Fluorine in Medicinal Chemistry. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Lawton, G., Witty, D.R., Eds.; Elsevier B.V.: United Kingdom, 2015; Vol. 54, pp. 65–133 ISBN 0306-0012.
5. Bober, Z.; Aebisher, D.; Ożóg, Ł.; Tabarkiewicz, J.; Tutka, P.; Bartusik-Aebisher, D. 19F MRI As a tool for imaging drug delivery to tissue and individual cells. *Eur. J. Clin. Exp. Med.* **2017**, *15*, 109–119, doi:10.15584/ejcem.2017.2.3.
6. Alauddin, M.M. Positron emission tomography (PET) imaging with (18)F-based radiotracers. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *2*, 55–76.
7. Olah, G.A.; Surya Prakash, G.K.; Molnr, R.; Sommer, J. *Superacid Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2009; ISBN 9780470421604.
8. O’Hagan, D. Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C–F bond. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 308–319, doi:10.1039/B711844A.
9. Chambers, R.D. *Fluorine in Organic Chemistry*; Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, UK, 2004; ISBN 9781444305371.
10. Clark, T.; Hennemann, M.; Murray, J.S.; Politzer, P. Halogen bonding: The  $\sigma$ -hole: Proceedings of “Modeling interactions in biomolecules II”, Prague, September 5th–9th, 2005. *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 291–296, doi:10.1007/s00894-006-0130-2.
11. Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. A Medicinal Chemist’s Guide to Molecular Interactions. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5061–5084, doi:10.1021/jm100112j.
12. Murray, J.S.; Lane, P.; Politzer, P. Expansion of the  $\sigma$ -hole concept. *J. Mol. Model.* **2009**, *15*, 723–729, doi:10.1007/s00894-008-0386-9.
13. Pitzer, K.S. The Nature of the Chemical Bond and the Structure of Molecules and Crystals: An Introduction to Modern Structural Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4121–4121, doi:10.1021/ja01500a088.
14. Atkins, P.; Jones, L. *Chemical Principles: The Quest for Insight*; 5th ed.; W.H. Freeman & Company: New York, NY, 2010; ISBN 1429219556.
15. Zhou, P.; Zou, J.; Tian, F.; Shang, Z. Fluorine Bonding — How Does It Work In Protein–Ligand Interactions? *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 2344–2355, doi:10.1021/ci9002393.
16. Berger, R.; Resnati, G.; Metrangolo, P.; Weber, E.; Hulliger, J. Organic fluorine compounds: a great opportunity for enhanced materials properties. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3496, doi:10.1039/c0cs00221f.
17. Metrangolo, P.; Resnati, G. Type II halogen···halogen contacts are halogen bonds.

*IUCrJ* **2014**, *1*, 5–7, doi:10.1107/S205225251303491X.

18. Howard, J.A.K.; Hoy, V.J.; O'Hagan, D.; Smith, G.T. How good is fluorine as a hydrogen bond acceptor? *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12613–12622, doi:10.1016/0040-4020(96)00749-1.
19. Sibley, M.M.; Ruohoniemi, I.R.; North, A.M.; Wasilewski, M.S.; Mcmillen, C.D.; Wetzler, M. Statistical Prevalence versus Energetic Contributions of F $\cdots$ F, F $\cdots$ H, and F $\cdots$ C Intermolecular Interactions in 4-Trifluorotoluenesulfonamide Crystals. *Cryst. Growth Des.* **2019**, doi:10.1021/acs.cgd.9b00792.
20. Dalvit, C.; Vulpetti, A. Intermolecular and Intramolecular Hydrogen Bonds Involving Fluorine Atoms: Implications for Recognition, Selectivity, and Chemical Properties. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 262–272, doi:10.1002/cmdc.201100483.
21. Taylor, R. The hydrogen bond between N-H or O-H and organic fluorine: Favourable yes, competitive no. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **2017**, *73*, 474–488, doi:10.1107/S2052520617005923.
22. Reichenbacher, K.; Süß, H.I.; Hulliger, J. Fluorine in crystal engineering - “The little atom that could.” *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 22–30, doi:10.1039/b406892k.
23. DiMugno, S.; Sun, H. The Strength of Weak Interactions: Aromatic Fluorine in Drug Design. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1473–1482, doi:10.2174/156802606777951127.
24. Nayak, S.K.; Reddy, M.K.; Guru Row, T.N.; Chopra, D. Role of Hetero-Halogen (F $\cdots$ X, X = Cl, Br, and I) or Homo-Halogen (X $\cdots$ X, X = F, Cl, Br, and I) Interactions in Substituted Benzanilides. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11*, 1578–1596, doi:10.1021/cg101544z.
25. Roşca, S.C.; Roueindeji, H.; Dorcet, V.; Roisnel, T.; Carpentier, J.F.; Sarazin, Y. K $\cdots$ Cl and K $\cdots$ F Non-Covalent Interactions in  $\pi$ -Functionalized Potassium Fluoroalkoxides. *Inorganics* **2017**, *5*, doi:10.3390/inorganics5010013.
26. Jeffrey, G.A. *Hydrogen Bonding in Biological Structures*; Springer-Verlag: Berlin, 1991; ISBN 9780387508399.
27. Borho, N.; Suhm, M. a; Le Barbu-Debus, K.; Zehnacker, A. Intra- vs. intermolecular hydrogen bonding: dimers of alpha-hydroxyesters with methanol. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 4449, doi:10.1039/b609725a.
28. Hubbard, R.E.; Kamran Haider, M. Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength. *eLS* **2010**, doi:10.1002/9780470015902.a0003011.pub2.
29. Maréchal, Y. Geometrical Properties of H-Bonds and H-Bonded Organized Supramolecular Structures. In *The Hydrogen Bond and the Water Molecule*; Elsevier, 2007; pp. 25–47 ISBN 9780444519573.
30. Dunitz, J.D.; Taylor, R. Organic Fluorine Hardly Ever Accepts Hydrogen Bonds. *Chem. - A Eur. J.* **1997**, *3*, 89–98, doi:10.1002/chem.19970030115.
31. Desiraju, G.R. Hydrogen Bridges in Crystal Engineering: Interactions without Borders. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 565–573, doi:10.1021/ar010054t.
32. Schneider, H.-J. Hydrogen bonds with fluorine. Studies in solution, in gas phase and by computations, conflicting conclusions from crystallographic analyses. *Chem. Sci.* **2012**,



- 3, 1381, doi:10.1039/c2sc00764a.
33. Rosenberg, R.E. The Strength of Hydrogen Bonds between Fluoro-Organics and Alcohols, a Theoretical Study. *J. Phys. Chem. A* **2018**, *122*, 4521–4529, doi:10.1021/acs.jpca.8b01148.
  34. Dunitz, J.D. Organic fluorine: Odd man out. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 614–621, doi:10.1002/cbic.200300801.
  35. Champagne, P.A.; Desroches, J.; Paquin, J.F. Organic fluorine as a hydrogen-bond acceptor: Recent examples and applications. *Synth.* **2015**, *47*, 306–322, doi:10.1055/s-0034-1379537.
  36. Dalvit, C.; Invernizzi, C.; Vulpetti, A. Fluorine as a hydrogen-bond acceptor: Experimental evidence and computational calculations. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20*, 11058–11068, doi:10.1002/chem.201402858.
  37. Kenny, P.W. Hydrogen bonding, electrostatic potential, and molecular design. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 1234–1244, doi:10.1021/ci9000234.
  38. Brown, A.; Beer, P.D. Halogen bonding anion recognition. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 8645–8658, doi:10.1039/C6CC03638D.
  39. Auffinger, P.; Hays, F.A.; Westhof, E.; Ho, P.S. Halogen bonds in biological molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 16789–16794, doi:10.1073/pnas.0407607101.
  40. Metrangolo, P.; Neukirch, H.; Pilati, T.; Resnati, G. Halogen bonding based recognition processes: A world parallel to hydrogen bonding. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 386–395, doi:10.1021/ar0400995.
  41. Eskandari, K.; Zariny, H. Halogen bonding: A lump-hole interaction. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *492*, 9–13, doi:10.1016/j.cplett.2010.04.021.
  42. Riley, K.E.; Murray, J.S.; Fanfrlík, J.; Řezáč, J.; Solá, R.J.; Concha, M.C.; Ramos, F.M.; Politzer, P. Halogen bond tunability I: the effects of aromatic fluorine substitution on the strengths of halogen-bonding interactions involving chlorine, bromine, and iodine. *J. Mol. Model.* **2011**, *17*, 3309–3318, doi:10.1007/s00894-011-1015-6.
  43. Cavallo, G.; Metrangolo, P.; Milani, R.; Pilati, T.; Priimagi, A.; Resnati, G.; Terraneo, G. The Halogen Bond. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2478–2601, doi:10.1021/acs.chemrev.5b00484.
  44. Eskandari, K.; Lesani, M. Does fluorine participate in halogen bonding? *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21*, 4739–4746, doi:10.1002/chem.201405054.
  45. Riley, K.E.; Murray, J.S.; Fanfrlík, J.; Řezáč, J.; Solá, R.J.; Concha, M.C.; Ramos, F.M.; Politzer, P. Halogen bond tunability II: the varying roles of electrostatic and dispersion contributions to attraction in halogen bonds. *J. Mol. Model.* **2013**, *19*, 4651–4659, doi:10.1007/s00894-012-1428-x.
  46. Matta, C.F.; Castillo, N.; Boyd, R.J. Characterization of a closed-shell fluorine-fluorine bonding interaction in aromatic compounds on the basis of the electron density. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 3669–3681, doi:10.1021/jp045044z.
  47. Metrangolo, P.; Murray, J.S.; Pilati, T.; Politzer, P.; Resnati, G.; Terraneo, G. The fluorine atom as a halogen bond donor, viz. a positive site. *CrystEngComm* **2011**, *13*, 6593–6596, doi:10.1039/c1ce05554b.

48. Karnoukhova, V.A.; Fedyanin, I. V.; Lyssenko, K.A. Directionality of intermolecular C-F $\cdots$ F-C interactions in crystals: Experimental and theoretical charge density study. *Struct. Chem.* **2016**, *27*, 17–24, doi:10.1007/s11224-015-0622-8.
49. Pavan, M.S.; Durga Prasad, K.; Guru Row, T.N. Halogen bonding in fluorine: experimental charge density study on intermolecular F $\cdots$ F and F $\cdots$ S donor–acceptor contacts. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7558, doi:10.1039/c3cc43513j.
50. Olsen, J.A.; Banner, D.W.; Seiler, P.; Sander, U.O.; D’Arcy, A.; Stihle, M.; Müller, K.; Diederich, F. A fluorine scan of thrombin inhibitors to map the fluorophilicity/fluorophobicity of an enzyme active site: Evidence for C-F $\cdots$ C=O interactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42*, 2507–2511, doi:10.1002/anie.200351268.
51. Pollock, J.; Borkin, D.; Lund, G.; Purohit, T.; Dyguda-Kazimierowicz, E.; Grembecka, J.; Cierpicki, T. Rational Design of Orthogonal Multipolar Interactions with Fluorine in Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7465–7474, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00975.
52. Paulini, R.; Müller, K.; Diederich, F. Orthogonal multipolar interactions in structural chemistry and biology. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44*, 1788–1805, doi:10.1002/anie.200462213.
53. Pietruś, W.; Kafel, R.; Bojarski, A.J.; Kurczab, R. Hydrogen Bonds with Fluorine in Ligand–Protein Complexes—the PDB Analysis and Energy Calculations. *Molecules* **2022**, *27*, doi:10.3390/molecules27031005.
54. Tressaud, A. Fluorine, a key element for the 21st century. In *Fluorine*; Tressaud, A., Ed.; Elsevier, 2019; pp. 77–150 ISBN 9780128129906.
55. Zhou, Y.; Wang, J.; Gu, Z.; Wang, S.; Zhu, W.; Aceña, J.L.; Soloshonok, V.A.; Izawa, K.; Liu, H. Next Generation of Fluorine-Containing Pharmaceuticals, Compounds Currently in Phase II–III Clinical Trials of Major Pharmaceutical Companies: New Structural Trends and Therapeutic Areas. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 422–518, doi:10.1021/acs.chemrev.5b00392.
56. Brown, D.G.; Wobst, H.J. A Decade of FDA-Approved Drugs (2010–2019): Trends and Future Directions. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 2312–2338, doi:10.1021/ACS.JMEDCHEM.0C01516.
57. Ursu, O.; Holmes, J.; Bologna, C.G.; Yang, J.J.; Mathias, S.L.; Stathias, V.; Nguyen, D.T.; Schürer, S.; Oprea, T. DrugCentral 2018: An update. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D963–D970, doi:10.1093/nar/gky963.
58. Hagmann, W.K. The Many Roles for Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4359–4369, doi:10.1021/jm800219f.
59. Hongmao, S. *A Practical Guide to Rational Drug Design*; 2016; ISBN 9780081000984.
60. Józwiak, K.; Szumiło, H.; Soczewiński, E. Lipofilowość, metody wyznaczania i rola w działaniu biologicznym substancji chemicznych. *Wiadomości Chem.* **2001**, *55*, 1047–1074.
61. Böhm, H.J.; Banner, D.; Bendels, S.; Kansy, M.; Kuhn, B.; Müller, K.; Obst-Sander, U.; Stahl, M. Fluorine in Medicinal Chemistry. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 637–643, doi:10.1002/cbic.200301023.

62. Goldin, B.R. Intestinal Microflora: Metabolism of Drugs and Carcinogens. *Ann. Med.* **1990**, *22*, 43–48, doi:10.3109/07853899009147240.
63. Manallack, D. The pKa Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. In *Dyes and Drugs*; Apple Academic Press, 2011; Vol. 1, pp. 80–102 ISBN 1177-391X (Electronic).
64. Wikipedia Electromagnetic radiation Available online: [https://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic\\_radiation](https://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_radiation) (accessed on May 29, 2017).
65. Sadlej, J. *Spektroskopia molekularna*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, 2002; Vol. 1, pp. 337–415;.
66. Wojtkowiak, B.; Chabanel, M. *Spektroskopia molekularna*; 1984;
67. Burke, J.T. IR Spectroscopy or Hooke's Law at the Molecular Level - A Joint Freshman Physics-Chemistry Experience. *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1213, doi:10.1021/ed074p1213.
68. Desiraju, G.; Steiner, T. *The Weak Hydrogen Bond*; Oxford University Press, 2001; ISBN 9780198509707.
69. Fornaro, T.; Burini, D.; Biczysko, M.; Barone, V. Hydrogen-Bonding Effects on Infrared Spectra from Anharmonic Computations: Uracil-Water Complexes and Uracil Dimers. *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 4224–4236, doi:10.1021/acs.jpca.5b01561.
70. Coates, J. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyers, R.A., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2006; ISBN 9780470027318.
71. Smith, E.; Dent, G. Introduction, Basic Theory and Principles. In *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2005; pp. 1–21 ISBN 0-471-49668-5.
72. Atkins, P. *Physical Chemistry*; 8th ed.; Oxford University Press, 2006;
73. L'Annunziata, M.F. Radiation Physics and Radionuclide Decay. In *Handbook of Radioactivity Analysis*; Elsevier, 2012; Vol. 81, pp. 1–162 ISBN 978-0-12-384873-4.
74. Bojarski, Z.; Gigla, M.; Stróż, K.; Surowiec, M. *Krystalografia*; Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008;
75. Wikipedia Bragg's law Available online: [https://en.wikipedia.org/wiki/Bragg%27s\\_law](https://en.wikipedia.org/wiki/Bragg%27s_law) (accessed on Apr 26, 2017).
76. Grabowski, S.J. *Hydrogen Bonding -New Insights*; Grabowski, S.J., Ed.; Springer Netherlands, 2006; Vol. 1; ISBN 978-1-4020-4852-4.
77. Wońska, M.; Grabowsky, S.; Dominiak, P.M.; Woźniak, K.; Jayatilaka, D. Hydrogen atoms can be located accurately and precisely by x-ray crystallography. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, doi:10.1126/sciadv.1600192.
78. Alavi, S. Ab Initio Molecular Dynamics. Basic Theory and Advanced Methods. Von Dominik Marx und Jürg Hutter. *Angew. Chemie* **2009**, *121*, 9568–9569, doi:10.1002/ange.200904748.
79. Piela, L. *Idee chemii kwantowej*; 2nd ed.; Wydawnictwo Naukowe PWN, 2021; ISBN 9788301203726.

80. Wang, J.; Wolf, R.M.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–1174, doi:10.1002/jcc.20035.
81. Steffen, C.; Thomas, K.; Huniar, U.; Hellweg, A.; Rubner, O.; Schroer, A. Charmm: The Biomolecular Simulation Program. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 2967–2970, doi:10.1002/jcc.
82. Scott, W.R.P.; Hünenberger, P.H.; Tironi, I.G.; Mark, A.E.; Billeter, S.R.; Fennen, J.; Torda, A.E.; Huber, T.; Krüger, P.; van Gunsteren, W.F. The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 3596–3607, doi:10.1021/jp984217f.
83. Jorgensen, W.L.; Maxwell, D.S.; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225–11236, doi:10.1021/ja9621760.
84. Hutter, J. Car-Parrinello molecular dynamics. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 604–612, doi:10.1002/wcms.90.
85. Kühne, T.D. Second generation Car-Parrinello molecular dynamics. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2014**, *4*, 391–406, doi:10.1002/wcms.1176.
86. Bader, R.F.W.; Bader, R.F. *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*; Clarendon Press, 1994; Vol. 1; ISBN 9780198558651.
87. Espinosa, E.; Molins, E.; Lecomte, C. Hydrogen bond strengths revealed by topological analyses of experimentally observed electron densities. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *285*, 170–173, doi:10.1016/S0009-2614(98)00036-0.
88. Turek, M.; Różycka-Sokołowska, E.; Koprowski, M.; Marciniak, B.; Bałczewski, P. Role of Hydrogen Bonds in Formation of Co-amorphous Valsartan/Nicotinamide Compositions of High Solubility and Durability with Anti-hypertension and Anti-COVID-19 Potential. *Mol. Pharm.* **2021**, *18*, 1970–1984, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.0c01096.
89. Ziegler, T.; Rauk, A. On the calculation of bonding energies by the Hartree Fock Slater method - I. The transition state method. *Theor. Chim. Acta* **1977**, *46*, 1–10, doi:10.1007/BF02401406.
90. Mitoraj, M.P.; Michalak, A.; Ziegler, T. A combined charge and energy decomposition scheme for bond analysis. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 962–975, doi:10.1021/ct800503d.
91. Lajiness, M. Evaluation of the Performance of Dissimilarity Selection Methodology. In *QSAR: Rational Approaches to the Design of Bioactive Compounds*; Filipo, C., Victoria, A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 1991; pp. 201–204.
92. Gerald M. Maggiora On Outliers and Activity Cliffs s Why QSAR Often Disappoints. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 1535.
93. Pietruś, W.; Kurczab, R.; Stumpfe, D.; Bojarski, A.J.; Bajorath, J. Data-driven analysis of fluorination of ligands of aminergic G protein coupled receptors. *Biomolecules* **2021**, *11*, doi:10.3390/biom11111647.
94. Stumpfe, D.; Bajorath, J. Exploring activity cliffs in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.*

- 2012**, 55, 2932–2942, doi:10.1021/jm201706b.
95. Bajorath, J. Duality of activity cliffs in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2019**, *14*, 517–520.
  96. Leung, C.S.; Leung, S.S.F.; Tirado-rives, J.; Jorgensen, W.L. Methyl Effects on Protein – Ligand Binding. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4489–4500.
  97. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. Gaussian 16, Revision A.03. *Gaussian 16, Revis. A.03* **2016**.
  98. Lin, Y.-S.; Li, G.-D.; Mao, S.-P.; Chai, J.-D. Long-Range Corrected Hybrid Density Functionals with Improved Dispersion Corrections. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 263–272, doi:10.1021/ct300715s.
  99. Zhao, Y.; Truhlar, D.G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241, doi:10.1007/s00214-007-0310-x.
  100. Dunning, T.H. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 1007–1023, doi:10.1063/1.456153.
  101. Woon, D.E.; Dunning, T.H. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. IV. Calculation of static electrical response properties. *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 2975–2988, doi:10.1063/1.466439.
  102. Bauzá, A.; Frontera, A. On the Importance of Halogen–Halogen Interactions in the Solid State of Fullerene Halides: A Combined Theoretical and Crystallographic Study. *Crystals* **2017**, *7*, 191, doi:10.3390/cryst7070191.
  103. Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3094, doi:10.1021/cr9904009.
  104. Miertuš, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117–129, doi:10.1016/0301-0104(81)85090-2.
  105. Dennington, R.; Keith, T.; Milliam, J. GaussView, Version 5.0, Semichem Inc. Shawnee Mission KS.
  106. Sinha, P.; Boesch, S.E.; Gu, C.; Wheeler, R.A.; Wilson, A.K. Harmonic vibrational frequencies: Scaling factors for HF, B3LYP, and MP2 methods in combination with correlation consistent basis sets. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 9213–9217, doi:10.1021/jp048233q.
  107. Kesharwani, M.K.; Brauer, B.; Martin, J.M.L. Frequency and Zero-Point Vibrational Energy Scale Factors for Double-Hybrid Density Functionals (and Other Selected Methods): Can Anharmonic Force Fields Be Avoided? *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 1701–1714, doi:10.1021/jp508422u.
  108. Todd A. Keith, T.G.S. AIMAll 2019.
  109. Espinosa, E.; Souhassou, M.; Lachekar, H.; Lecomte, C. Topological analysis of the

- electron density in hydrogen bonds. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* **1999**, *55*, 563–572, doi:10.1107/S0108768199002128.
110. Lu, T.; Chen, F. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 580–592, doi:10.1002/jcc.22885.
111. Weigend, F.; Ahlrichs, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3297, doi:10.1039/b508541a.
112. Hutter, J.; Iannuzzi, M.; Schiffmann, F.; VandeVondele, J. cp2k: Atomistic simulations of condensed matter systems. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2014**, *4*, 15–25, doi:10.1002/wcms.1159.
113. Krack, M.; Parrinello, M. QUICKSTEP: Make the Atoms Dance. *High Perform. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 29–50.
114. VandeVondele, J.; Krack, M.; Mohamed, F.; Parrinello, M.; Chassaing, T.; Hutter, J. Quickstep: Fast and accurate density functional calculations using a mixed Gaussian and plane waves approach. *Comput. Phys. Commun.* **2005**, *167*, 103–128, doi:10.1016/j.cpc.2004.12.014.
115. Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104, doi:10.1063/1.3382344.
116. DePristo, A.E.; Kress, J.D. Kinetic-energy functionals via Padé approximations. *Phys. Rev. A* **1987**, *35*, 438–441, doi:10.1103/PhysRevA.35.438.
117. Brehm, M.; Kirchner, B. TRAVIS - A Free Analyzer and Visualizer for Monte Carlo and Molecular Dynamics Trajectories. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 2007–2023, doi:10.1021/ci200217w.
118. Martinez, L.; Andrade, R.; Birgin, E.G.; Martinez, J.M. Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2157–2164, doi:10.1002/jcc.
119. Oxford Diffraction /Agilent Technologies UK Ltd CrysAlisPRO.
120. Burla, M.C.; Caliendo, R.; Carrozzini, B.; Cascarano, G.L.; Cuocci, C.; Giacovazzo, C.; Mallamo, M.; Mazzone, A.; Polidori, G. Crystal structure determination and refinement via SIR2014. *J. Appl. Crystallogr.* **2015**, *48*, 306–309, doi:10.1107/S1600576715001132.
121. Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **2008**, *64*, 112–122, doi:10.1107/S0108767307043930.
122. Farrugia, L.J. WinGX and ORTEP for Windows : an update. *J. Appl. Crystallogr.* **2012**, *45*, 849–854, doi:10.1107/S0021889812029111.
123. Spackman, M.A.; Jayatilaka, D. Hirshfeld surface analysis. *CrystEngComm* **2009**, *11*, 19–32, doi:10.1039/B818330A.
124. Da Silva, M.A.V.R.; Ferreira, A.I.M.C.L.; Gomes, J.R.B. Experimental and computational study of the thermochemistry of the fluoromethylaniline isomers. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 6444–6451, doi:10.1021/jp071232o.

125. Chen, D.; Oezguen, N.; Urvil, P.; Ferguson, C.; Dann, S.M.; Savidge, T.C. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1501240, doi:10.1126/SCIADV.1501240.
126. Bitencourt-Ferreira, G.; Veit-Acosta, M.; de Azevedo, W.F. Hydrogen bonds in protein-ligand complexes. In *Methods in Molecular Biology*; Methods Mol Biol, 2019; Vol. 2053, pp. 93–107.
127. Sarkhel, S.; Desiraju, G.R. N-H...O, O-H...O, and C-H...O Hydrogen Bonds in Protein-Ligand Complexes: Strong and Weak Interactions in Molecular Recognition. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2004**, *54*, 247–259, doi:10.1002/prot.10567.
128. Hauser, A.S.; Attwood, M.M.; Rask-Andersen, M.; Schiöth, H.B.; Gloriam, D.E. Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 829–842, doi:10.1038/nrd.2017.178.
129. Gaulton, A.; Hersey, A.; Nowotka, M.; Bento, A.P.; Chambers, J.; Mendez, D.; Mutowo, P.; Atkinson, F.; Bellis, L.J.; Cibrián-Uhalte, E.; et al. The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D945–D954, doi:10.1093/nar/gkw1074.

## 8. Wszystkie publikacje w dorobku naukowym

K. Grychowska, S. Chaumont-Dubel, R. Kurczab, P. Koczurkiewicz, C. Deville, M. Krawczyk, **W. Pietruś**, G. Satała, S. Buda, K. Piska, M. Drop, X. Bantreil, F. Lamaty, E. Pękała, A. J. Bojarski, P. Popik, P. Marin, P. Zajdel, *Dual 5-HT<sub>6</sub> and D<sub>3</sub> Receptor Antagonists in a Group of 1H-Pyrrolo[3,2-c]quinolines with Neuroprotective and Procognitive Activity*, ACS chemical neuroscience, **2019**, 10, 3183-3196, doi: 10.1021/acchemneuro.8b00618

IF<sub>2020</sub> = 4,418, MNiSW = 100

A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, R. Kurczab, J. Kalinowska-Tłuścik, P. Popik, A. Nikiforuk, M. Krawczyk, G. Satała, T. Lenda, J. Knutelska, R. Bugno, J. Staroń, **W. Pietruś**, M. Matłoka, K. Dubiel, R. Moszczyński-Pętkowski, J. Pieczykolan, M. Wieczorek, B. Pilarski, P. Zajdel, A. J. Bojarski, *2-Aminoimidazole-based antagonists of the 5-HT<sub>6</sub> receptor – A new concept in aminergic GPCR ligand design*, European Journal of Medicinal Chemistry, **2019**, 179, 1-15, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.06.001

IF<sub>2020</sub> = 6,514, MNiSW = 140

A. Owczarzak, Z. Dutkiewicz, R. Kurczab, **W. Pietruś**, M. Kubicki, A. M Grześkiewicz, *Role of staple molecules in the formation of S...S contact in thioamides: Experimental charge density and theoretical studies*, Crystal Growth & Design, **2019**, 12, 7324-7335, doi: 10.1021/acs.cgd.9b01204

IF<sub>2020</sub> = 4,076, MNiSW = 100

J. Kurek, P. Kwaśniewska-Sip, K. Myszkowski, T. Pospieszny, **W. Pietruś**, G. Cofta, P. Barczyński, M. Murias, *Alkaloid from Colchicum species in complexes with lithium, sodium, potassium and magnesium cations– spectroscopic characterization, semiempirical and theoretical calculation, fungicidal and cytotoxic activity*, Journal of Molecular Structure, **2020**, 1204, 127520, doi: 10.1016/j.molstruc.2019.127520

IF<sub>2020</sub> = 3,196, MNiSW = 70

J. Staroń, R. Bugno, **W. Pietruś**, G. Satała, S. Mordalski, D. Warszycki, A. Hogendorf, A. S. Hogendorf, J. Kalinowska-Tłuścik, T. Lenda, B. Pilarski, A. J. Bojarski, *Rationally designed N-phenylsulfonylindoles as a tool for the analysis of the non-basic 5-HT<sub>6</sub>R ligands binding mode*, European Journal of Medicinal Chemistry, **2021**, 209, 112916, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112916

IF<sub>2020</sub> = 6,514, MNiSW = 140

D. Vanda, V. Canale, S. Chaumont-Dubel, R. Kurczab, G. Satała, P. Koczurkiewicz-Adamczyk, M. Krawczyk, **W. Pietruś**, K. Blicharz, E. Pekała, A. J. Bojarski, P. Popik, P. Marin, M. Soural, P. Zajdel, *Imidazopyridine-Based 5-HT<sub>6</sub> Receptor Neutral Antagonists: Impact of N1-Benzyl and N1-Phenylsulfonyl Fragments on Different Receptor Conformational States*, Journal of Medicinal Chemistry, **2021**, 64, 1180-1196, doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c02009

IF<sub>2020</sub> = 7,446, MNiSW = 200

**W. Pietruś**, R. Kurczab, R. Kafel, E. Machalska, J. Kalinowska-Tłuścik, A. Hogendorf, M. Żylewski, M. Baranska, A. J. Bojarski, *How can fluorine directly and indirectly affect the*



*hydrogen bonding in molecular systems? – A case study for monofluoroanilines*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **2021**, 252, 119536; doi: 10.1016/j.saa.2021.119536

IF<sub>2020</sub> = 4,098, MNI<sub>SW</sub> = 140

**W. Pietruś**, R. Kurczab, J. Kalinowska-Tłuścik, E. Machalska, D. Golonka, M. Barańska, A. J. Bojarski, *Influence of Fluorine Substitution on Nonbonding Interactions in Selected Para-Halogeno Anilines*, ChemPhysChem **2021**, 22, 2115, doi: 10.1002/cphc.202100383

IF<sub>2020</sub> = 3,102, MNI<sub>SW</sub> = 100

**W. Pietruś**, R. Kurczab, D. Stumpfe, A. J. Bojarski, J. Bajorath, *Data-Driven Analysis of Fluorination of Ligands of Aminergic G Protein Coupled Receptors*, Biomolecules **2021**, 11, 1647, doi: 10.3390/biom11111647

IF<sub>2020</sub> = 4,879, MNI<sub>SW</sub> = 100

J. Staroń, **W. Pietruś**, R. Bugno, R. Kurczab, G. Satała, D. Warszycki, T. Lenda, A. Wantuch, A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, *Tuning the activity of known drugs via the introduction of halogen atoms, a case study of SERT ligands – Fluoxetine and fluvoxamine*, European Journal of Medicinal Chemistry, **2021**, 220, 113533, doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113533

IF<sub>2020</sub> = 6,514, MNI<sub>SW</sub> = 140

**W. Pietruś**, R. Kafel, A. J. Bojarski, R. Kurczab, *Hydrogen Bonds with Fluorine in Ligand–Protein Complexes—the PDB Analysis and Energy Calculations*, Molecules, **2022**, 27(3), 1005, doi: 10.3390/molecules27031005

IF<sub>2020</sub> = 4,411, MNI<sub>SW</sub> = 140

K. Grychowska, A. Olejarz-Maciej, K. Blicharz, **W. Pietruś**, T. Karcz, R. Kurczab, P. Koczurkiewicz, A. Doroz-Płonka, G. Latacz, A. R. Keeri, K. Piska, G. Satała, J. Pęgiel, W. Trybała, M. Jastrzębska-Więsek, A. J. Bojarski, F. Lamaty, A. Partyka, M. Walczak, M. Krawczyk, N. Malikowska-Racia, P. Popik, P. Zajdel, *Overcoming undesirable hERG affinity by incorporating fluorine atoms: A case of MAO-B inhibitors derived from 1 H-pyrrolo-[3, 2-c] quinolines*, **2022**, 236, 114329, doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114329

IF<sub>2020</sub> = 6,514, MNI<sub>SW</sub> = 140

**Sumaryczny IF<sub>2020</sub> – 63,764; punkty MNI<sub>SW</sub><sub>2020</sub> = 1410**

## 9. Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej

**P1:** W. Pietruś, R. Kurczab, R. Kafel, E. Machalska, J. Kalinowska-Tłuścik, A. Hogendorf, M. Żylewski, M. Baranska, A. J. Bojarski, *How can fluorine directly and indirectly affect the hydrogen bonding in molecular systems? – A case study for monofluoroanilines*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **2021**, 252, 119536; doi: 10.1016/j.saa.2021.119536

IF<sub>2020</sub> = 4,098, MNiSW<sub>2021</sub> = 140

**P2:** W. Pietruś, R. Kurczab, J. Kalinowska-Tłuścik, E. Machalska, D. Golonka, M. Barańska, A. J. Bojarski, *Influence of Fluorine Substitution on Nonbonding Interactions in Selected Para-Halogeno Anilines*, ChemPhysChem **2021**, 22, 2115, doi: 10.1002/cphc.202100383

IF<sub>2020</sub> = 3,102, MNiSW<sub>2021</sub> = 100

**P3:** W. Pietruś, R. Kafel, A. J. Bojarski, R. Kurczab, *Hydrogen Bonds with Fluorine in Ligand-Protein Complexes-the PDB Analysis and Energy Calculations*, Molecules, **2022**, 27(3), 1005, doi: 10.3390/molecules27031005

IF<sub>2020</sub> = 4,411, MNiSW<sub>2021</sub> = 140

**P4:** W. Pietruś, R. Kurczab, D. Stumpfe, A. J. Bojarski, J. Bajorath, *Data-Driven Analysis of Fluorination of Ligands of Aminergic G Protein Coupled Receptors*, Biomolecules **2021**, 11, 1647, doi: 10.3390/biom11111647

IF<sub>2020</sub> = 4,879, MNiSW<sub>2021</sub> = 100

**P5:** J. Staroń, W. Pietruś, R. Bugno, R. Kurczab, G. Satała, D. Warszycki, T. Lenda, A. Wantuch, A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, *Tuning the activity of known drugs via the introduction of halogen atoms, a case study of SERT ligands – Fluoxetine and fluvoxamine*, European Journal of Medicinal Chemistry, **2021**, 220, 113533, doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113533

IF<sub>2020</sub> = 6,514, MNiSW<sub>2021</sub> = 140



Contents lists available at ScienceDirect

## Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/saa](http://www.elsevier.com/locate/saa)

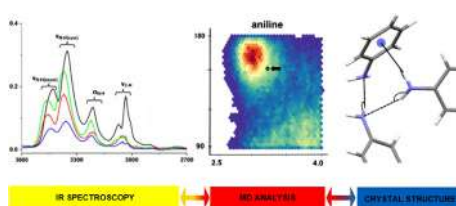
## How can fluorine directly and indirectly affect the hydrogen bonding in molecular systems? – A case study for monofluoroanilines

Wojciech Pietruś<sup>a,b</sup>, Rafał Kurczab<sup>a,c,\*</sup>, Rafał Kafel<sup>a</sup>, Ewa Machalska<sup>b,d</sup>, Justyna Kalinowska-Tłuścik<sup>b</sup>, Adam Hogendorf<sup>a</sup>, Marek Żylewski<sup>e</sup>, Malgorzata Baranska<sup>b,d</sup>, Andrzej J. Bojarski<sup>a</sup><sup>a</sup>Department of Medicinal Chemistry, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Smetna 12, 31-343 Kraków, Poland<sup>b</sup>Faculty of Chemistry Jagiellonian University, Gronostajowa 2, 30-387 Kraków, Poland<sup>c</sup>Faculty of Mathematical and Natural Sciences, University of Applied Sciences in Tarnów, Mickiewicza 8, 33-100 Tarnów, Poland<sup>d</sup>Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutic (JCET), Jagiellonian University, Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków, Poland<sup>e</sup>Jagiellonian Center of Innovation, Life Science Park, Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków, Poland

## HIGHLIGHTS

- The fluorine substituent decreases the strength and frequency of N–H···N HBs.
- The methodology to identify and separate individual HBs from the *ab initio* molecular dynamics trajectories.
- The position of fluorine in the aromatic ring strongly affects the C–F bond length.
- The number of N–H···F HBs is mainly dependent on the acidity of the proton of the NH<sub>2</sub> group.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 October 2020

Received in revised form 6 January 2021

Accepted 24 January 2021

Available online 03 February 2021

## Keywords:

Hydrogen bond  
FTIR  
Raman spectroscopy  
Ab initio MD  
Fluorine

## ABSTRACT

Hydrogen bonds (HBs) directly engaging fluorine has been extensively studied, but the indirect effect of fluorine on adjacent donors and acceptors is poorly understood and still difficult to predict. The indirect and direct effect of the fluorination of aniline on HB patterns observed in monofluoroanilines was studied *via* experimental (vibrational spectroscopy and crystal structure analysis) and theoretical (*ab initio* molecular dynamics and electrostatic surface potential) methods. It was found that a fluorine substituent decreases the strength and frequency of N–H···N HBs and, at the same time, increases the acidity of CH protons, enhancing the competitiveness of weaker interactions. Additionally, the position of fluorine in the aromatic ring strongly affects the C–F bond length, and a direct intramolecular N–H···F HB causes an increase in the N–H bond stability. We also provide a methodology to identify and separate individual HBs concerning the type of donor or acceptor from the *ab initio* molecular dynamics trajectories.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The unique properties and the modern repertoire of organic transformations in synthetic chemistry have enabled the use of flu-

orine as a standard strategy to develop new drugs, in particular, pharmaceuticals that target the central nervous system (CNS) [1,2]. A single substitution with fluorine can induce a drastic change in the ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity) parameters but does not interfere with or may even enhance the intrinsic efficacy [3]. Fluorine has been successfully exploited to alter bioavailability, lipophilicity, metabolic stability,

\* Corresponding author.

E-mail address: [kurczab@if-pan.krakow.pl](mailto:kurczab@if-pan.krakow.pl) (R. Kurczab).

acidity/basicity and toxicity [3]. Since the 1950s, over 150 fluorine-containing drugs have been released to the market, which now makes up approximately 20% of all pharmaceuticals (and approximately 30% of all fluorinated agrochemicals) [4]. Approximately 50% of fluorinated drugs contain fluorine in an aromatic system and 20% in an aliphatic chain, and the rest contain fluorine in various functional groups (e.g.,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{SCH}_2\text{F}$ , and  $\text{OCF}_3$ ) [3]. The embedded fluorine atom in drug-like molecules allows for convenient radiolabelling with  $^{18}\text{F}$  for positron emission tomography [5–7]. In addition to its impact on medicinal chemistry, the effects of fluorine on intermolecular interactions have enabled the development of advanced materials, such as Teflon<sup>®</sup>, Gore-Tex<sup>®</sup>, and fluorosurfactants. Hence, a thorough understanding of the effects of fluorine is required for its rational use in drug design and will also lead to an improvement in studies using computational methods [7,8].

The intermolecular interactions in ligand-protein complexes can be finely tuned by fluorine or fluorine-containing substituents [3,9]. Although substantial attention has been paid to the molecular basis of observable macroscopic parameters, such as logP, logD or pKa changes and conformational preference [3], many effects at the atomic resolution level, such as the influence of fluorination on the hydrogen and halogen bonding (HB and XB, respectively), are hardly represented in the literature [10–12]. HBs are one of the most important interactions responsible for ligand-target complex stabilization [13]. The formation of HBs can be studied by various experimental methods, such as thermochemical, spectroscopic, and crystallographic analyses. In vibrational spectroscopy (FT-IR and Raman), the presence and strength of hydrogen bonds, among others, can be measured by analysing the band shifts related to the vibrations of the groups involved in HB formation: a shift towards lower wavenumbers (down-shift) indicates an increase in the HB strength, while a shift towards higher wavenumbers (up-shift) indicates the weakening/disappearance of HBs [14,15]. Additionally, a change in the intensity of these bands can be observed.

Aniline, due to its fairly simple infrared spectrum and occurrence of overtones, was often used in spectroscopic and structural studies of the formation of hydrogen bonds [16–22]. It also should be noted, that numerous studies on the direct effect of fluorine substitution on the strength of HBs and also the ability of fluorine to act as HB acceptor were performed [23]. For instance, Bogdan et al. [24] provided a methodology to either increase or decrease the HB-donating capacity of benzylic alcohols by judicious fluorination. Additionally, it was shown that intramolecular O–H...F interactions and secondary C–H...F and/or C–H...O interactions contributed to the stabilization of the various conformations of the analysed structures [24]. An attempt to understand the role of organic fluorine in hydrogen bond network, by comparing fluoro-ethanol vs. ethanol, has recently been published by Biswas et al. [25]. Based on classical molecular dynamics and quantum chemical calculations they showed that apart from intermolecular O–H...O HBs, a number of O–H...F and C–H...F interactions form the HB network. However, focusing only on the direct participation of fluorine in HB formation, its indirect influence on the hydroxyl group has not been analysed. The fluorine effect in supramolecular chemistry was investigated by Li et al. [26] and Zhao et al. [27]. They demonstrated that intramolecular N–H...F HBs (iHB) can be easily used to stabilize the binding conformation of monomers for self-assembly. Also, in larger molecular system (various bases and template–primer complexes) the hydrogen bonds with fluorine and its effect on the affinity and forming pairs of DNA polymerase were examined. The fluorine substitution caused deterioration of the affinity of polymerase and decreasing of the calculated HB strength [28]. However, all of the abovementioned studies deal with hydrogen bonds formed directly by fluorine and suggest that fluorine in organic compounds is a very weak

acceptor of HBs (despite the highest electronegativity), and often, fluorine can be described as a donor's last resort [8,13,23,29,30].

Wojciechowski et al. [16,31,32], who had extensively theoretically studied monofluoro derivatives of aniline, attributed all the observed effects and shifts of respective bands to electrostatic changes caused by fluorine substitution, regardless of the rearrangement of intermolecular interactions in the analysed systems.

This paper can be considered an extension of the studies by Wojciechowski's group on aniline and its fluoro-derivatives, but unlike previous work based on crystal structure analysis and extended quantum-mechanical calculations, we present broad, theoretical, structural, and spectroscopic studies on the indirect and direct influence of the fluorine substituent position on the geometrical preferences and incidence rate of hydrogen bond formation.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents

Aniline and its 2-, 3-, and 4-F derivatives, with purities of approximately 98%, were purchased from Combi-Blocks (USA). All compounds were in liquid form where the aniline was colorless and the fluoroanilines had a slight yellow color. The boiling point was: 184 °C, 171–173 °C, 186 °C, 187 °C for aniline, 2F-, 3F-, 4F-aniline, respectively.

### 2.2. Spectroscopic measurements

The Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) spectra were measured using an FT-IR Nicolet™ iS™5 Thermo Scientific system, and a single reflection zinc selenide prism (ZnSe) was used to acquire the spectra of the samples with the attenuated total reflection (ATR) method at room temperature. The FT-IR spectra of the samples were collected in the range of 4000–650  $\text{cm}^{-1}$ ; 32 scans were taken with a resolution of 2  $\text{cm}^{-1}$ .

The Raman spectra were measured by employing a Bruker MultiRAM FTRaman spectrometer. The Raman spectra of the samples were collected using a macro TLC xyz stage in the range of 4000–50  $\text{cm}^{-1}$ , and data were collected with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ , an excitation wavelength of 1064 nm, a laser power of 350 mW and an accumulation of 100 scans. The baseline of all the recorded spectra was subtracted by the asymmetric least squares smoothing method from the Origin software [33].

### 2.3. Electrostatic potential surface calculations

The electrostatic surface potential (ESP) was calculated using Gaussian G16 [34] with Minnesota functional M06-2X-D3 [35,36] and Dunning basis set aug-cc-pVTZ. The results were visualized in GaussView 6.0.16 [37].

### 2.4. Vibrational analysis

Vibration analysis was performed for one frame selected from the AIMD trajectory. Next, the system was optimized using the B3LYP-D3 functional and cc-pVDZ basis set. The IR and Raman (excitation wavelength of 1064 nm) theoretical spectra were calculated using B3LYP-D3/cc-pVDZ. The theoretical spectra were multiplied by a scale factor of 0.97 [38] and were then compared with the experimental IR and Raman spectra to support the assignment of the bands.

## 2.5. QTAIM

For aniline and its crystallized derivatives, the electron density topological analysis was carried out with the AIMAll programme [39], which was based on the electron density calculated with Gaussian G16 at the B3LYP [40] /cc-pVDZ [41,42] level of theory. The energy of the non-covalent bonds detected in the crystal structures was calculated with the Espinosa equation:

$$E_{int} = \frac{1}{2} \nu(r)$$

where  $E_{int}$  is the energy of the interatomic interaction (a.u.), and  $\nu(r)$  is the kinetic energy at the bond critical point (BCP). The Espinosa equation is valid for all types of HBs, van der Waals interactions and weak interactions such as  $H \cdots H$  and  $C-H \cdots O$  interactions [43].

## 2.6. Ab initio molecular dynamics

The 20 ps-long (with a step size of 0.5 fs) ab initio molecular dynamics (AIMD) simulations were performed for aniline, 2F-aniline, 3F-aniline, and 4F-aniline. Each system contained 16 molecules and was closed in a box with  $15 \times 15 \times 15 \text{ \AA}^3$  dimensions. The initial geometries were prepared using Packmol [44] software. The production simulations were performed using the CP2K [45] software package with the Quickstep [46,47] method. The dynamics of the systems were calculated using DFTD3 [48], which uses the empirical Grimme dispersion additive [36]. To reliably describe the kinetic and electrostatic properties of the molecules, the Padé function was used [49]. The first relaxation step was followed by performing molecular dynamics calculations at 298 K. Then, based on the calculated Wannier centres, theoretical infrared spectra were obtained using the Travis software [50].

## 2.7. AIMD trajectory analysis and visualization

The in-house Python script was used to analyse the obtained trajectories and determine the number and types of HBs (various donors and acceptors of HBs) that formed during the simulations. Based on the obtained data, the density maps showing the distribution of the HB (or contact) geometric parameters (the range of distance was from 2.5 Å to 4 Å, and the range of angles was from 90° to 180°) were generated using the R [51] environment and the following libraries: RColorBrew [52], Hexbin [53], Rbokeh [54], ggplot2 [55].

## 3. Results and discussion

The amine group of aniline can act both as a donor and an acceptor of the HB. Notably, one aniline molecule can be simultaneously bound with three other aniline molecules through HBs,

which are subject to continuous geometric reconfiguration in the liquid phase. The introduction of the fluorine substituent into the aniline structure was used in this work as a perturbation of the initial system to determine the possible changes in the profile of intermolecular interactions (of  $NH_2$ ,  $CH$  groups and F). Therefore, we have chosen complementary experimental and computational methods to investigate various aspects of this phenomenon.

### 3.1. EPS

To understand the differences and changes in the non-covalent interactions occurring in the studied systems, electrostatic potential surface maps (EPS) were calculated and analysed (Fig. 1). The substitution of fluorine slightly affects the charge on nitrogen, and according to the withdrawing (induction) [56] effect, the charge on nitrogen is the largest in 4F-aniline ( $q_N = -0.82, -0.83, -0.81, -0.84$  a.u. for aniline, 2F-, 3F-, and 4F-, respectively). Fluorine substitution influences the acidity of the hydrogen atoms in the aromatic system ( $\bar{q} = 0.22, 0.24, 0.25$ , and  $0.32$  a.u. for aniline, 2F-, 3F-, and 4F-aniline, respectively), increasing the ability of C-H to form weak HBs. In addition, the charge localised on the fluorine atoms is the highest in 4F-aniline compared to the other derivatives. The higher symmetry of this molecule compared to other fluoroanilines leads to the symmetric distribution of the atomic charges of hydrogens (Fig. 1). The distinct distributions of the electron density in the aromatic ring may be responsible for the changes in the intensity of the individual bands observed in the IR and Raman spectra, because the changing intensity of the individual bands is associated with a change in the dipole moment and polarization tensor of individual oscillations (Figs. 2 and 3) [32]. The obtained charges calculated for individual atoms show much larger differences depending on the position of fluorine substitution than those published by Wojciechowski et al. [32]. The charge on the nitrogen atom strongly depends on the location of fluorine in the aromatic ring, which is consistent with the inductive effect [56].

### 3.2. Analysis of the experimental vibrational spectra

Based on the vibrational analysis of the IR spectra obtained for the all studied systems (one frame selected from the AIMD trajectory, which contained 16 molecules; Table 1) and based on the studies by Wojciechowski et al. [16,32], the two key spectral regions were selected for further analysis, namely, i) the range of 3600–2800  $\text{cm}^{-1}$ , which includes the stretching vibrations of the groups involved in the formation of HBs ( $\nu_{NH}$ ,  $\nu_{CH}$ ), and ii) the range of 1300–1100  $\text{cm}^{-1}$ , which includes CF stretching vibrations ( $\nu_{CF}$ ) (Fig. 2). In the IR spectrum of aniline, asymmetric and symmetric  $NH_2$  stretching vibration bands (3435  $\text{cm}^{-1}$  and 3351  $\text{cm}^{-1}$ , respectively), the overtone  $NH_2$  bending vibrations (3212  $\text{cm}^{-1}$ , which was mistakenly interpreted as a shift in the  $\nu_s$ -

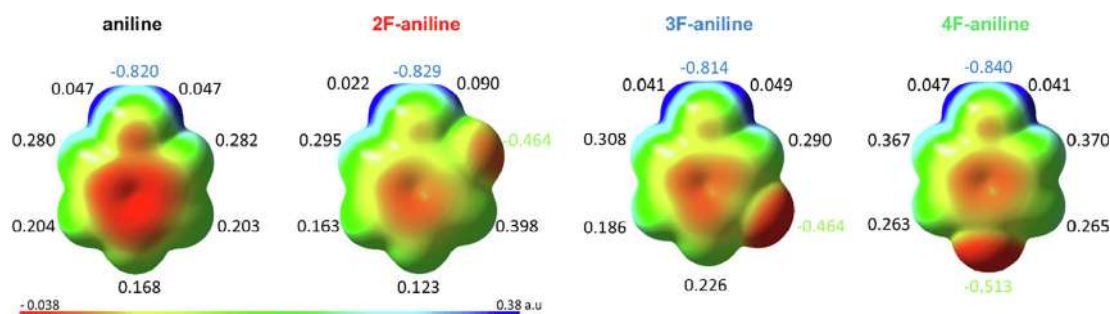
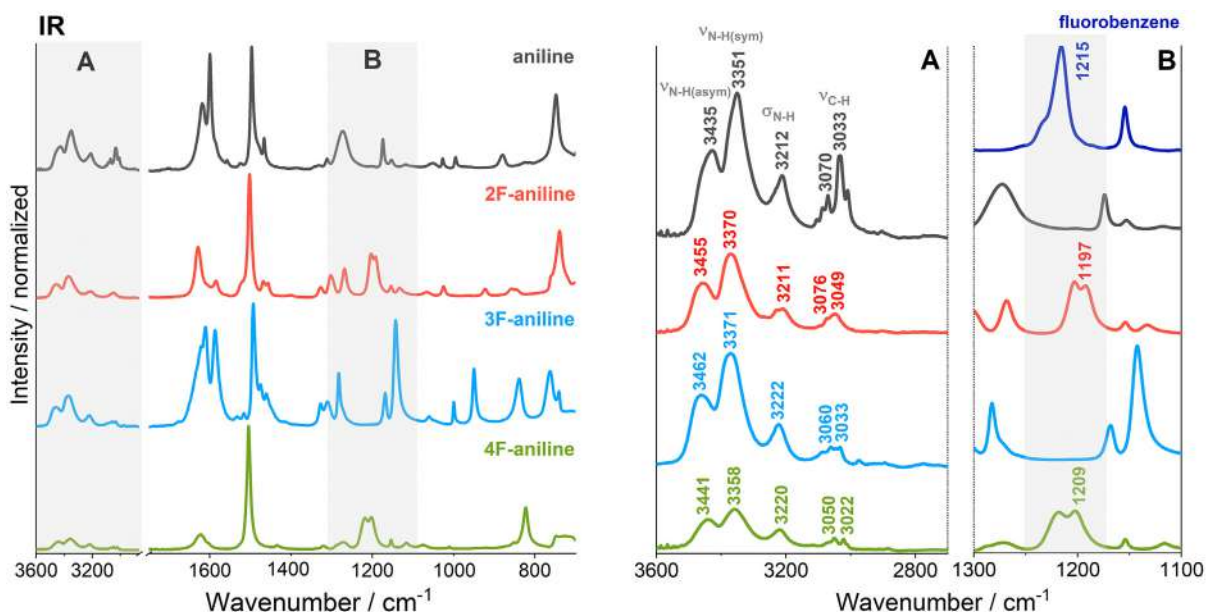
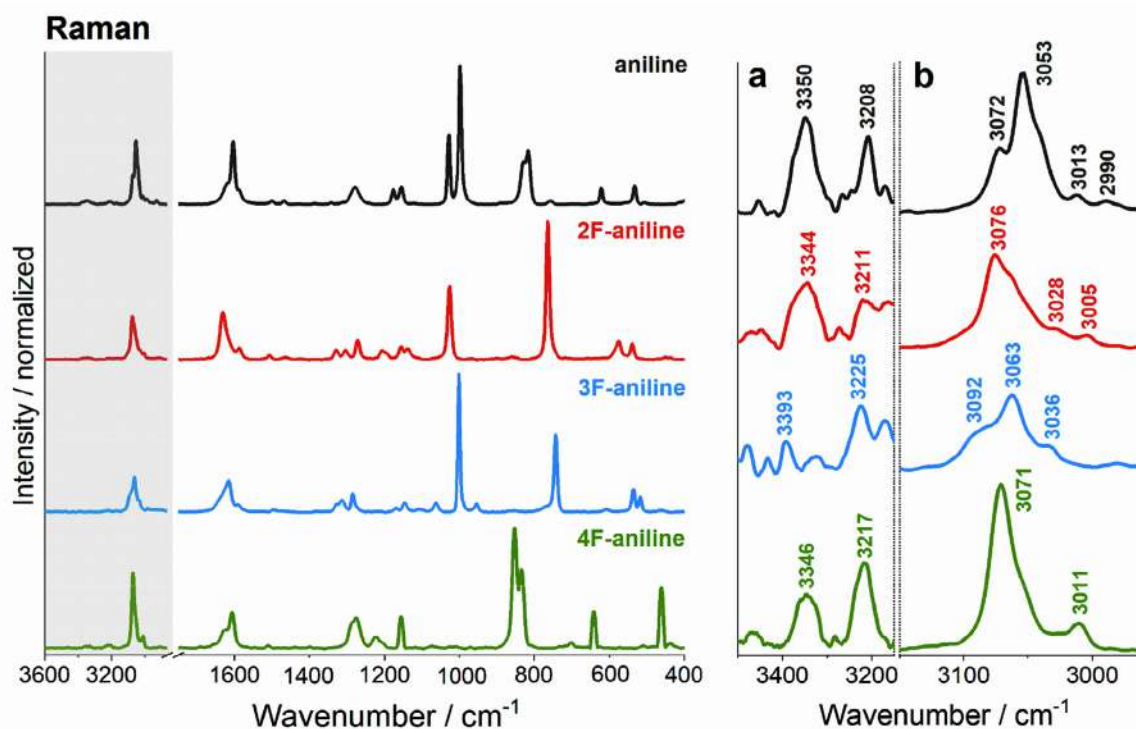


Fig. 1. Electrostatic surface potential obtained with Mulliken atomic charges (a.u.).



**Fig. 2.** The experimental FT-IR spectra of aniline and its three substituted derivatives in the range of 700–3600  $\text{cm}^{-1}$ . The vibrational modes of the HBs in the selected regions (A – vibrations of  $\text{NH}_2$  and  $\text{CH}_2$  groups, B – CF stretching vibration) were marked ( $\nu$  – stretching,  $\delta$  – overtone of bending vibration). Additionally, the  $\nu\text{CF}$  band range was compared with the spectrum of fluorobenzene.



**Fig. 3.** The experimental Raman spectra of aniline and its three substituted derivatives in the range of 700–3600  $\text{cm}^{-1}$ .

NH band caused by the appearance of strong HBs [19]), bands attributed to different modes of  $\nu\text{CH}$  stretching vibrations (3100–3000  $\text{cm}^{-1}$ ), and  $\text{NH}_2$  bending vibrations (1618  $\text{cm}^{-1}$ ) are observed (Fig. 2, Table 1). The vibrational analysis of the IR spectra obtained from one frame of the AIMD simulations agreed well with the spectra calculated by Wojciechowski et al. [32]. The small differences may be caused by using different functionals and basis sets. It should be emphasized that after adding fluorine to the aniline

structure, a up-shift of the  $\nu\text{NH}$  stretching vibration bands was observed. This effect may be caused by the deterioration of the donor or acceptor properties of the amino group following the band shift increasing according to the order 3F- > 2F- > 4F- > aniline, which means that 3F-aniline has the weakest N–H...N HB (Fig. 2A, Table 1). Interestingly, additional intramolecular N–H...F HB in 2F-aniline affects  $\nu\text{NH}$  band shape but it is difficult to distinguish between inter- and intramolecular HBs contributions. More-

**Table 1**  
IR and Raman assignments of the most important bands for studied systems based on vibrational analysis.

aniline		2F-aniline		3F-aniline		4F-aniline		Mode
IR	R	IR	R	IR	R	IR	R	
				1142				vCF
		1192				1202		
		1203				1218		
1618	1603	1629	1630	1611	1641	1622	1621	sciss NH <sub>2</sub>
3033	3053	3049		3033	3063	3022	3011	vCH
3070	3072	3076	3076	3060	3092	3050	3071	
3212		3211		3222		3220		σ sciss NH <sub>2</sub>
3351	3208	3370	3211	3371	3225	3358	3217	v <sub>s</sub> NH
3435	3350	3455	3344	3462	3393	3441	3346	v <sub>as</sub> NH

over, the bending vibrations of the NH<sub>2</sub> scissors display a spectral shift toward higher wavenumbers (except not in 3F-aniline), which may indicate a decrease in the strength of N–H···N HBs (Fig. 2A, Table 1); however, coupling with different C–H bending vibrations of the aromatic ring makes the frequency of the NH<sub>2</sub> scissors less specific, less sensitive, and thus less suitable for correlation studies [57].

Aniline substitution by fluorine causes changes in the symmetry of the individual C–H vibrations. The vCH stretching vibration bands are degenerated, and the involvement of C–H donors in the formation of an HB, with fluorine as an acceptor, causes a up-shift (Fig. 2A). Indeed, the shift of vCH towards higher wavenumbers is a characteristic feature of C–H···F HBs, which is unlike the behaviour of conventional HBs (e.g., O–H···O and N–H···N; Fig. 2A) [29].

Fluorine-substituted aromatic (ArF) compounds have a moderately strong IR band in a broad range frequency (1270–1100 cm<sup>-1</sup>), [58] which is attributed to C–F stretching, and thus, to identify and determine vCF, the obtained spectra of the fluorinated aniline derivatives were compared with fluorobenzene spectra (Fig. 2B). Fluorobenzene has a very intense single band at 1215 cm<sup>-1</sup>, which is not visible in aniline but is present in its fluorinated derivatives. In the case of 3F-aniline, the vCF band is strongly shifted towards lower wavenumbers ( $\Delta\nu = 73$  cm<sup>-1</sup>). The vibrational analysis indicated that this is not a result of strong HBs formed with fluorine but rather the indirect influence of the substitution position of fluorine in the aniline ring (Fig. 2B). In the case of 2F- and 4F-aniline, the vCF band is slightly shifted towards lower wavenumbers ( $\Delta\nu \sim 20$  cm<sup>-1</sup>) and showed splitting into two bands, which may be due to the presence of both bonded and unbonded CF groups (Fig. 2B, Table 1). Additionally, in 2F-aniline, this shift is larger than in the other derivatives due to the presence of intramolecular HBs.

To test how given functional groups are involved in the formation of intermolecular interactions (mainly HB), FTIR spectra were recorded for a series of dilutions of tested samples in an inert solvent (CCl<sub>4</sub>). For the mentioned dilution series of 2F-aniline, the influence of intra- and intermolecular N–H···F HB on the position of the vNH bands was not possible to distinguish, suggesting that the vNH band (coupled with fluorine) is a low intensity band with only little influence on the position bands (Supp. Fig. 5). Additionally, the band shift of vCF towards higher wavenumbers is greatest for 4F-aniline ( $\Delta\nu = 10$  cm<sup>-1</sup>), which leads to conclusion that fluorine most often participates in the formation of intermolecular N–H···F HB (Supp. Fig. 5). The smallest shift is observed for 3F-aniline, which means that fluorine has the weakest acceptor properties among all investigated fluoro-derivatives. This observation is consistent and correlates with AIMD simulations (Fig. 6).

In the Raman spectrum of aniline (Fig. 3A), the intensity of the vNH stretching vibration is relatively low (the v<sub>as</sub>NH and v<sub>s</sub>NH bands are at approx. 3350 cm<sup>-1</sup> and 3208 cm<sup>-1</sup>, respectively). After

fluorine substitution, the strength of the N–H···N HB decreases, as evidenced by a decrease in the vNH intensity (for 3F-aniline, it is indistinguishable from noise; Fig. 3A), which may be due to the availability of the free electron pair in 3F-aniline being lower than that in the other derivatives [57]. At the same time, the shift towards higher wavenumbers for v<sub>s</sub>NH correlates with the IR spectrum and is larger for 3F-aniline than for aniline. In the case of 2F-aniline, v<sub>as</sub>NH showed a down-shift, which may be due to the presence of intramolecular HBs, and for 4F-aniline, the v<sub>as</sub>NH intensity is smaller than the spectral resolution (4 cm<sup>-1</sup>).

Several modes of CH vibrations in Raman spectra, not coupled with other vibrations, can be indicated and used as specific markers of C–H···F HBs (Fig. 3). Compared to those involved in traditional HBs, the vCH bands involved in the C–H···F HB showed a high-frequency shift. It is observed that the strongest HB with fluorine occurs for 2F- and 4F-aniline, which is associated with the increased acidity of the protons of the aromatic ring (Fig. 1). For 3F-aniline, the vCH shift towards higher wavenumbers is the smallest among all the fluoro-derivatives. Therefore, the low energy of N–H···N HBs and slightly increased energy of C–H···F HBs may result in the inability of 3F-aniline to crystallise. Noteworthy, the vCF bands are hardly visible in the Raman spectrum, even though the C–F bond is one of the most stable and most polarized covalent bonds in organic chemistry [59].

Many changes in the FT-IR and Raman spectra, including the position of the individual bands attributed to the CH vibrations of fluorinated derivatives vs. aniline, might be caused by a change in the symmetry of the molecules as well as the extinction of various CH stretching and bending modes of the aromatic ring due to the substitution of the hydrogen atom with fluorine.

### 3.3. Calculation of vibrational spectra from *ab initio* molecular dynamics

*Ab initio* molecular dynamics simulations were performed using DFTD3 method in the CP2K package for all the studied systems. Since theoretical spectra were usually computed by ignoring the intrinsic anharmonic character of the oscillations and an empirical scaling factor was usually used to correct for this deficiency [60]. The anharmonic effect can be included in the model but this requires an additional effort involved in computing anharmonic frequencies. However, such approach is unjustified due to usually small improvement in accuracy and a significant increase of the computational cost [61]. In the AIMD, the vibrational spectra which are obtained inherently, contain anharmonic effects because the forces acting on the atoms moving along a trajectory are computed on-the-fly, using an electronic-structure method [62].

The theoretical IR spectra calculated based on the AIMD methodology almost perfectly reconstructed the experimental spectra (Fig. 4). In particular, the range of vibrations involved in the formation of HBs (3600–3000 cm<sup>-1</sup>), which is hard to fully

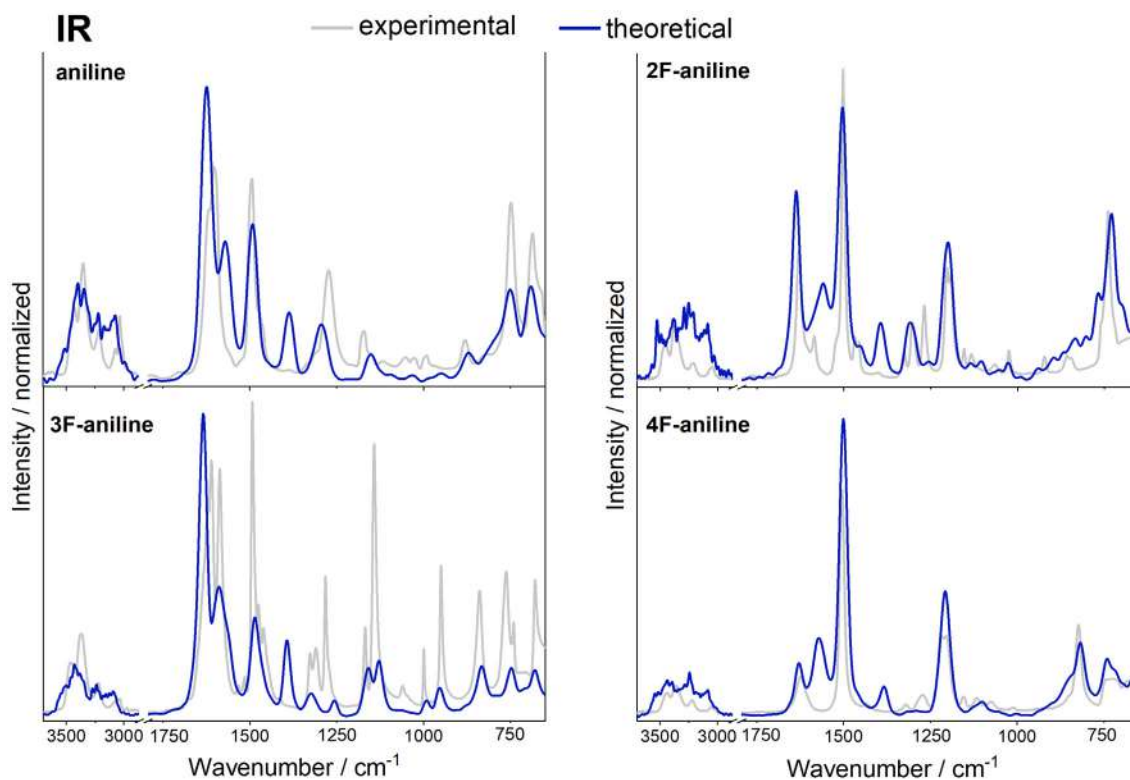


Fig. 4. The experimental (grey) and theoretical (blue) IR spectra of aniline.

reproduce (e.g., due to coupling between N–H stretching and N···N stretching modes), shows the almost perfect reproduction of the experimental line shape and fine structure. The only difference between the spectra is the intensity of the individual bands. However, it should be noted that the number of structures considered in the simulations was limited, and thus, individual bands may have a different intensity due to the reduced number of oscillators (as well as terminal oscillators).

### 3.4. Analysis of the type of hydrogen bonds formed in the AIMD simulations

An in-house Python tool was developed to identify and separate individual HBs and determine the type of donor or acceptor from the AIMD trajectories. Well reproduced experimental IR spectra based on the assumed model systems used in the AIMD simulations allow for further qualitative and quantitative analyses (Fig. 2) of the different HBs formed during the AIMD simulations. The results are illustrated as density maps, which show the distribution of individual types of HBs in the representation of their geometrical parameters (Fig. 5).

Different type of interactions (such as N–H···N, C–H···N, C–H···F, N–H···F, N–H··· $\pi$  HB and  $\pi$ – $\pi$ ) could be extracted from the AIMD trajectory, but only fluorine- and amino group-engaging interactions (Fig. 5) were considered. To understand and quantify the obtained angular/distance density maps, all the individual HBs were considered, and the average number of HBs per frame was calculated (Fig. 6). The N–H···N maps (Fig. 5A) show that the area of the most populated HB geometric parameters is depopulated for 3- and 4F-aniline, which suggests that the number of HBs is reduced. For 2F-aniline, this area is comparable with that of aniline because the proximity of fluorine to NH<sub>2</sub> fosters the formation of N–H···N HBs through the formation of intermolecular N–H···F interactions (Fig. 5). Additionally, the average number of N–H···N interactions per frame was decreased for 3F- and 4F-

anilines (vs. aniline) due to the appearance of competitive HBs with fluorine and due to the increased acidity of aromatic protons (Fig. 1) and was practically unchanged for 2F-aniline, which could be attributed to the formation of the adjacent intermolecular N–H···F interaction, as mentioned above (the red circle in Fig. 5B).

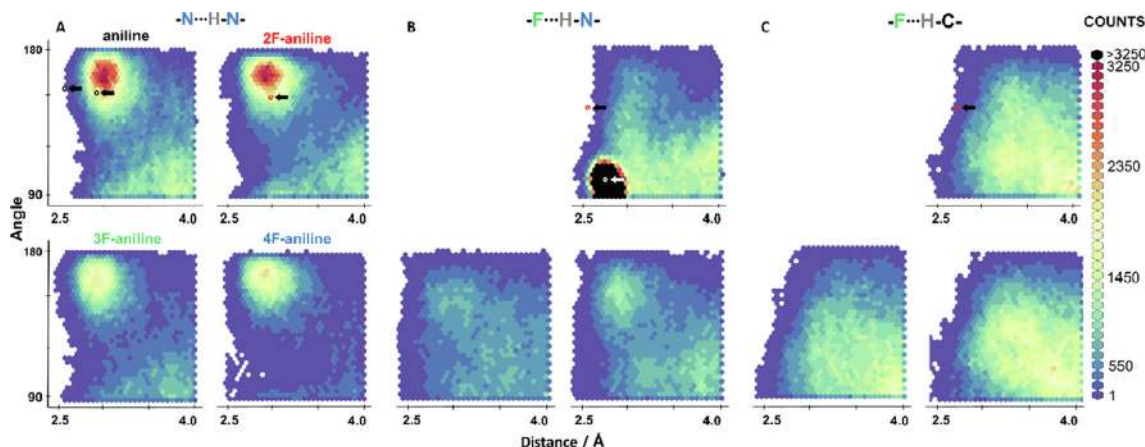
Intermolecular N–H···F HBs formed slightly less frequently than N–H···N HBs for 2F- and 3F-aniline and were formed more frequently for a 4F-derivative, suggesting that fluorine is also an efficacious acceptor of N–H donors. The number of N–H···F HBs is mainly dependent on the acidity of the proton of the NH<sub>2</sub> group, suggesting that the proton in 3F-aniline is less positively charged than the protons in the other derivatives, and the proton in 4F-aniline is more positively charged than the protons in the other derivatives. In addition, the intramolecular HB in 2F-aniline, which was observed in the crystal structure (Fig. 8C, Tab. S1; geometrical parameters projected on the density map as a white circle in Fig. 5B) and simulation (black area in Fig. 5B, quantified as colourless bars in Fig. 6), also caused a low-frequency shift of the C–F band when compared to the fluorobenzene spectrum (Fig. 2B), and fluorine is permanently engaged in the formation of N–H···F iHBs.

Fluorine substitution makes the hydrogens of the aromatic system more acidic (Fig. 1), thus increasing the ability of C–H donors to form weak HBs (WHBs) with fluorine or nitrogen (as in the crystal structure of 4F-aniline shown in Fig. 8C). Because C–H donors are 2-times more available than N–H donors, fluorine forms more C–H···F interactions; however, when normalized per donor, C–H···F interactions were slightly less abundant than N–H···F (Fig. 6).

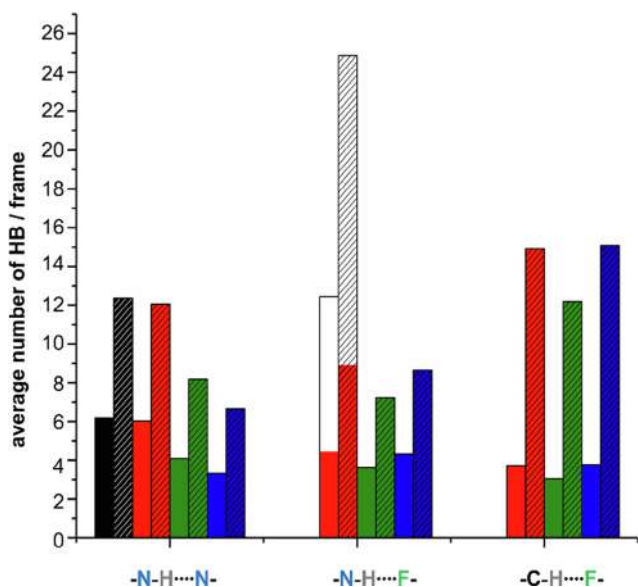
### 3.5. Crystal structure analysis

It's worth stressing that Wojciechowski et al. [31,32] have tried to explain the impact of fluorine substitution on the individual oscillations based on the theoretical calculations performed for a





**Fig. 5.** Angular/distance density maps of N-H...N (A), N-H...F (B), and C-H...F (C) HBs formed during 20 ps AIMD simulations; geometries observed in the crystal structures (Fig. 8) are marked with circles.



**Fig. 6.** The average number of different HB interactions per frame (dashed bars; black – aniline, red – 2F-, green – 3F, blue – 4F-) and per donor (solid bars); colourless bars – N-H...F iHBs in 2F-aniline.

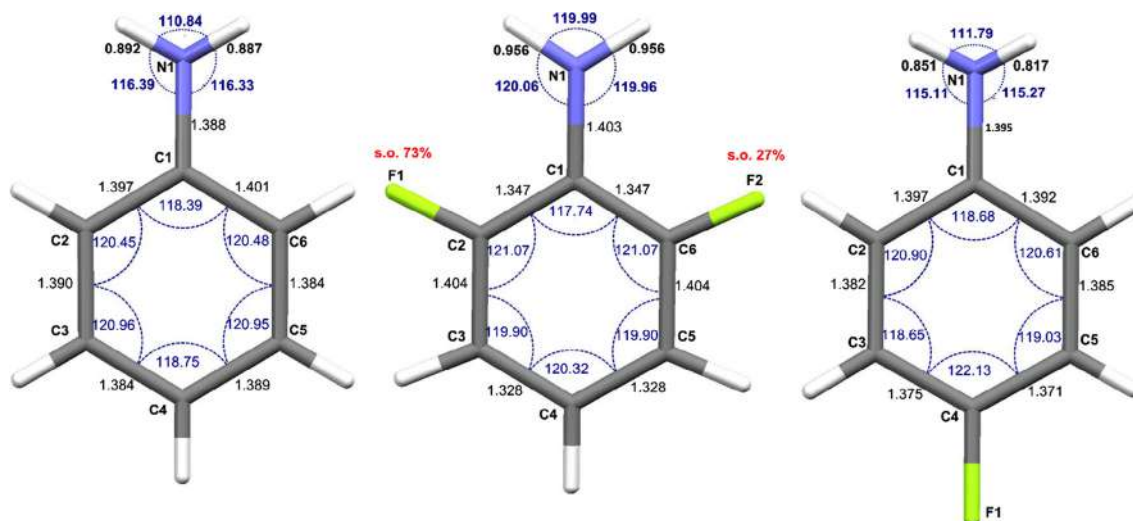
single molecule (gas-phase approach). To further investigate the fluorine engagement/influence on the interaction patterns, we studied additionally the solid, crystalline phase of the investigated compounds. The crystal structure of aniline was determined previously by Funell and co-workers [20], and that of its 2F- and 4F-derivatives was determined by Chopra et al. [63]; nevertheless, we have tried to obtain the crystal of pure 3F-aniline by *in situ* crystal growing from the liquid under high-pressure, but the obtained crystals were insufficient for the X-ray experiment and further analysis. 3F-Aniline is the most stable monofluoro isomer with the highest N-H bond dissociation enthalpies (N-H<sub>BDE</sub> = 397.3, 401.3, and 393.4 kJ/mol for 2F-aniline, 3F-aniline, and 4F-aniline, respectively), [64] which confirms that the acidity ( $\Delta H_{\text{acidity}} = 1519.3, 1513.8, 1530.3$  kJ/mol, for 2F-aniline, 3F-aniline, and 4F-aniline, respectively) of the proton in the 3F-derivative is lower than that in the other derivatives. Moreover, fluorine reduces the availability of the nitrogen atom's free electron pair [64] through the  $\pi$  electron-withdrawing (inductive) effect, which, in total, may lead to the N-H...N energy in 3F-

aniline being lower than that in the other fluorinated derivatives (Fig. 1).

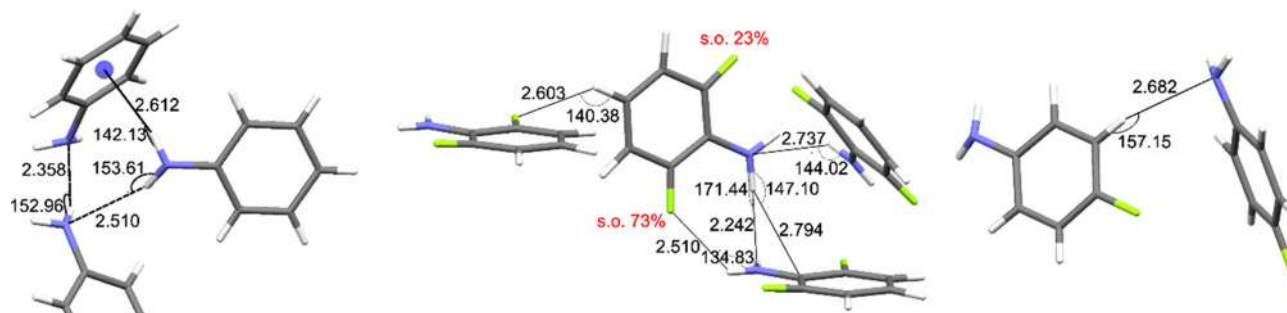
Based on the available crystal structures, the fluorine substitution affects the tetrahedral geometry of the NH<sub>2</sub> group (Fig. 7), especially for 2F-aniline, deduced by reduction of the deviations of the nitrogen atom from the mean plane of the aromatic ring (Fig. 7, Fig. S2–S4; measures are expressed as the sum of the valence angles of the amine group:  $\Sigma_{\text{NH}_2} = 343.6^\circ, 350.0^\circ,$  and  $342.2^\circ$  for aniline, 2F-aniline, and 4F-aniline, respectively). The nitrogen atom in 2F-aniline is not pyramidal ( $d = 0.000$  Å; pyramidal geometry defined as the distance  $d$  of a nitrogen atom to the mean plane defined by three atoms single-bonded to the studied N) comparing to aniline and 4F-aniline ( $d = 0.240$  Å and  $0.239$  Å, respectively). The observed effect of halogen substitution confirms the strong withdrawing character of fluorine in the proximity of the amine substituent. Interestingly, the C–F covalent bond length depends on the position of fluorine in the aromatic ring (i.e., 1.311(6), 1.368(2), and 1.364(2) Å for 2F-aniline (the more abundant molecule), 4F-aniline, and fluorobenzene [65], respectively; Fig. 7). The shortest C–F covalent bond distance for 2F-aniline indicates the formation of intramolecular HBs (Fig. S1,  $d_{\text{H}\cdots\text{F}} = 2.383$  Å) and is shorter than the sum of the van der Waals radii ( $\Sigma = 2.67$  Å) [66].

The analysis of the crystal packing of aniline showed the dominant role of the self-complementary pair of N-H...N HBs (H...N distances = 2.358 Å and 2.510 Å) for the structure stabilization. Moreover, the –NH<sub>2</sub> group is also involved in the formation of HBs, with the  $\pi$  electrons of the aromatic rings acting as the acceptor (the H...Ct distance is 2.612 Å, where Ct is a centroid of the aromatic ring; Fig. 8). The N-H...N HBs observed in the crystal structure of 2F-aniline are longer than those in aniline (Fig. 8, Tab. S1:  $N\cdots N_{\text{dist}} = 3.191(1)$  Å vs.  $3.173(1)$  Å and  $3.470(1)$  Å vs.  $3.322(1)$  Å, respectively), despite the formation of an additional N-H...F interaction, which caused the shorter HB to be almost linear (N-H...N<sub>angle</sub> = 171.4°). It is also observed that in 2F-aniline, a C-H...F HB is shorter than the sum of van der Waals radii (2.603 Å). It is worth emphasizing that no N-H...N HBs were observed in the crystal structure of 4F-aniline (Fig. 8), but a weak C-H...N interaction (the C-H...N distance/angle = 2.682 Å/157.15°) was detected instead. However, the weak C-H...N contact shows a slightly longer interatomic distance than the sum of the van der Waals radii (2.52 Å) [66] but it is the only contact that stabilizes the crystal structure.

The HBs observed in the crystal structure (the red circle in Fig. 5 and geometrically parameterised in Fig. 8) show differences, due to reduced degrees of freedom and kinetic energy comparing to



**Fig. 7.** Geometry analysis of a single molecule in the crystal environment for aniline, 2F-aniline, and 4F-aniline (angles marked in blue; bond lengths marked in black); in the structure of 2F-aniline, the positional disorder is observed with two alternative fluorine positions, whose site occupancies (s.o.) are given in red.



**Fig. 8.** HBs observed in the crystal structures of aniline, 2F-aniline, and 4F-aniline; for 2F-aniline, the positional disorder is observed, resulting in two alternative fluorine positions, whose site occupancies (s.o.) are marked in red. The observed interactions were marked on the angular/distance density maps (Fig. 5).

molecular dynamic simulations (liquid state) (Fig. 5). The N-H...N HBs found in aniline crystal (Fig. 8) are less linear and shorter than the most populated obtained in AIMD (Fig. 5A), whereas in 2F-aniline almost the same geometrical parameters (Fig. 5A and 8) were observed. In 2F-aniline two N-H...F, intra- and intermolecular HBs were also detected (the red and white circle in Fig. 5B and Fig. 8). The intramolecular N-H...F HB has a limited ability to change distance and angle (due to oscillations of C-F bond) which causes perfect match of geometrical parameters observed in the crystal structure and dynamic simulation. In turn, intermolecular N-H...F HB found in the crystal of 2F-aniline (Fig. 8) is out of range of geometrical parameters observed in AIMD (red circle in Fig. 5B). In 4F-aniline crystal structure (Fig. 8C) only a C-H...F HB was observed, with shorter interatomic distance and more linear geom-

etry than it was noticed during analysis of MD simulation results (Fig. 5C).

To reveal the impact of intermolecular forces on the packing of the studied crystals, the Bader's quantum theory of atoms (QTAIM) [67] was applied using the AIMAll package [39]. The topological analysis of the electron density  $\rho(r)$  of the unit cells revealed bond critical points (BCPs), indicating the weak intermolecular interactions. The calculated energy of the N-H...N HB in aniline varies from  $-2.1$  to  $-2.9$  kcal/mol, whereas for 2F-aniline, the energy varies in the range of  $-1.3$  to  $-3.3$  kcal/mol. Thus, the presence of fluorine supports N-H...N interactions and, despite much better geometrical parameters (Fig. 7, Tab. S1), the N-H...N HB shows a small energy difference ( $-0.3$  kcal/mol; Table 2).

**Table 2**

The HB geometrical parameters (H...A distances and D-H...A angles, where D-H and A are the donors and acceptors of HBs, respectively) observed in the analysed crystal structures, with energies proportional to the kinetic energy at the bond critical point (BCP), calculated according to the Espinosa equation (defined in the Materials and Methods).

Type of HB	Aniline		2F-aniline		4F-aniline	
	Geometrical parameters	Energy kcal/mol	Geometrical parameters	Energy kcal/mol	Geometrical parameters	Energy kcal/mol
N-H...N	2.510 Å; 153°	-2.9	2.242 Å; 171°	-3.3		
	2.612 Å; 142°	-2.1	2.737 Å; 144°	-1.3		
N-H...F			2.510 Å; 135°	-1.7		
C-H...F			2.603 Å; 140°	-1.3		
C-H...N					2.682 Å; 157°	-1.5

The calculated energies of the observed interactions involving fluorine seem to be close to those of conventional HBs (N–H...N) (–1.3 to –1.7 kcal/mol) but show different angular preferences [29]. Although it is claimed that WHBs are only slightly stronger than van der Waals interactions, WHBs are considered to be extremely important in chemistry and biology because of their potential for rapid rearrangements in different environments [68].

#### 4. Conclusions

Aromatic amines are important molecules in the pharmaceutical industry and can play a significant role in the optimization of the ligand-protein binding mode, since the amine group of aniline can act both as a donor and an acceptor of the HB. This study was intended to investigate the direct and indirect influence of the fluorine substituent position on the geometrical preferences and determine the possible changes in the profile of intermolecular interactions using fluorine as a perturbing factor.

To the best of our knowledge, this is the first complex, theoretical and experimental analysis of the different types of HB networks in a relatively simple model system, which was performed using advanced and complementary techniques. The developed in-house scripts used for the analysis of the AIMD trajectories enabled the separation of the individual HBs formed during the 20 ps-long simulations. All the obtained results indicated that the fluorine substituent in the aniline ring indirectly decreases the strength of the N–H...N HBs, especially those in 3-F-aniline. This effect is observed in the FT-IR spectra, as the νNH bands shift towards higher wavenumbers, and the signals from 3F-aniline were the most affected. Moreover, the N–H...N HBs in the crystal structure of 2F-aniline are longer than those in aniline, despite the formation of an additional intermolecular N–H...F HB. In addition, fluorine acted as an HB acceptor for several N–H and C–H donors, whose hydrogens were also more acidic due to the strong electron-withdrawing properties of fluorine. Fluorine makes the hydrogens of the amine group more acidic in the order 4F- > 2F- > 3F-aniline but, at the same time, reduces the availability of the free electron pair of nitrogen by the induction effect in the opposite order 3F- > 2F- > 4F-aniline. This may be the critical factor leading to difficulties with 3F-aniline crystallisation. Additionally, the substitution of fluorine to the aromatic ring induces the high acidity of selected C–H protons, which may result in the increased attractiveness of the WHBs in the crystal structure stabilization. Moreover, the position of fluorine in the aromatic ring strongly affects the C–F bond length, and it is worth emphasising that the intramolecular N–H...F HB observed for 2F-aniline causes an increase in the N–H bond stability.

Although it is not possible to assess the net effect of fluorine substitution on the intermolecular interactions in neat fluoroaniline derivatives, it should be pointed out that the boiling point of both 3F-aniline and 4F-aniline is higher (186 and 187 °C, respectively) than that of 2F-aniline, in which fluorine is permanently engaged in the intramolecular N–H...F interaction and whose boiling point is slightly lower than that of aniline (182–183 and 184 °C for 2F-aniline and aniline, respectively).

It is well known that a fluorine atom increases the acidity of the hydrogens of an amine group, so one would expect that the N–H...N HB in the fluorinated aniline should be stronger (a more linear geometry and shorter distance) than that in aniline. The HB acceptor properties of the nitrogen decrease due to the withdrawing effect of the fluorine substituent, and thus, the net effect of fluorination on the N–H...N HB in F-substituted aniline vs. aniline is difficult to predict.

In homogeneous substances, fluorine affects both donors and acceptors of HBs. Thus, the influence of fluorine-substituted

(drug-like) molecules on the interaction pattern should be investigated, starting from small-molecular systems (e.g., solvent molecules) to proteins (e.g., ligand binding pockets). We believe that the abovementioned results and future similar analyses of more complex systems may decipher the complex nature of the direct and indirect influence of fluorine on the properties of biologically active molecules and their interactions with the targets [6,8,13,68,69].

#### CRedit authorship contribution statement

**Wojciech Pietruś:** Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing - original draft, Visualization. **Rafał Kurczab:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing - original draft, Supervision, Project administration. **Rafał Kafel:** Software, Investigation. **Ewa Machalska:** Validation, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Justyna Kalinowska-Thućik:** Validation, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Adam Hogendorf:** Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Marek Żylewski:** Investigation, Writing - review & editing. **Malgorzata Baranska:** Methodology, Supervision, Writing - review & editing. **Andrzej J. Bojarski:** Conceptualization, Writing - original draft, Writing - review & editing, Funding acquisition.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

This study was partially supported by the statutory funds of the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Cracow, Poland; numerical simulations have been performed by PLGrid Infrastructure (Prometheus, ACC Cyfronet, AGH). Jagiellonian Center of Innovation is a partner of the Leading National Research Center (KNOW) supported by the Ministry of Science and Higher Education. WP acknowledges the support of InterDokMed project no. POWR.03.02.00-00-1013/16.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119536>.

#### References

- [1] W.K. Hagmann, The Many Roles for Fluorine in Medicinal Chemistry, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 4359–4369, <https://doi.org/10.1021/jm800219f>.
- [2] S. Hongmao, *A Practical Guide to Rational Drug Design*, 2016. doi: 10.1016/B978-0-08-100098-4.00007-7.
- [3] S. Swallow, Fluorine in Medicinal Chemistry, in: *Prog. Med. Chem.*, 1st ed., Elsevier B.V., United Kingdom, 2015: pp. 65–133. doi: 10.1016/b.spmch.2014.11.001.
- [4] Y. Zhou, J. Wang, Z. Gu, S. Wang, W. Zhu, J.L. Aceña, V.A. Soloshonok, K. Izawa, H. Liu, Next Generation of Fluorine-Containing Pharmaceuticals, Compounds Currently in Phase II–III Clinical Trials of Major Pharmaceutical Companies: New Structural Trends and Therapeutic Areas, *Chem. Rev.* 116 (2016) 422–518, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00392>.
- [5] E.P. Gillis, K.J. Eastman, M.D. Hill, D.J. Donnelly, N.A. Meanwell, Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 8315–8359, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00258>.
- [6] P. Zhou, J. Zou, F. Tian, Z. Shang, Fluorine bonding—how does it work in protein-ligand interactions?, *J. Chem. Inf. Model.* 49 (2009) 2344–2355, <https://doi.org/10.1021/ci9002393>.

- [7] N.A. Meanwell, Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Biososteres for Drug Design, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 5822–5880, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01788>.
- [8] J.D. Dunitz, R. Taylor, Organic Fluorine Hardly Ever Accepts Hydrogen Bonds, *Chem. - A Eur. J.* 3 (1997) 89–98, <https://doi.org/10.1002/chem.19970030115>.
- [9] A.S. Hogendorf, A. Hogendorf, K. Popiołek-Barczyk, A. Ciechanowska, J. Mika, G. Satala, M. Walczak, G. Latacz, J. Handzlik, K. Kieć-Kononowicz, E. Ponimaskin, S. Schade, A. Zeug, M. Bijata, M. Kubicki, R. Kurczab, T. Lenda, J. Staroń, R. Bugno, B. Duszyńska, B. Pilarski, A.J. Bojarski, Fluorinated indole-imidazole conjugates: Selective orally bioavailable 5-HT7 receptor low-basidity agonists, potential neuropathic painkillers, *Eur. J. Med. Chem.* 170 (2019) 261–275, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.017>.
- [10] K.E. Riley, J.S. Murray, J. Fanfrlík, J. Řezáč, R.J. Solá, M.C. Concha, F.M. Ramos, P. Politzer, Halogen bond tunability I: the effects of aromatic fluorine substitution on the strengths of halogen-bonding interactions involving chlorine, bromine, and iodine, *J. Mol. Model.* 17 (2011) 3309–3318, <https://doi.org/10.1007/s00894-011-1015-6>.
- [11] K.E. Riley, J.S. Murray, J. Fanfrlík, J. Řezáč, R.J. Solá, M.C. Concha, F.M. Ramos, P. Politzer, Halogen bond tunability II: the varying roles of electrostatic and dispersion contributions to attraction in halogen bonds, *J. Mol. Model.* 19 (2013) 4651–4659, <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1428-x>.
- [12] G. Cavallo, P. Metrangolo, R. Milani, T. Pilati, A. Priimagi, G. Resnati, G. Terraneo, The halogen bond, *Chem. Rev.* 116 (2016) 2478–2601, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00484>.
- [13] R. Taylor, The hydrogen bond between N-H or O-H and organic fluorine: Favourable yes, competitive no, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Cryst. Sci. Eng. Mater.* 73 (2017) 474–488, <https://doi.org/10.1107/S2052520617005923>.
- [14] I.S. Ryu, X. Liu, Y. Jin, J. Sun, Y.J. Lee, Stoichiometric analysis of competing intermolecular hydrogen bonds using infrared spectroscopy, *RSC Adv.* 8 (2018) 23481–23488, <https://doi.org/10.1039/c8ra02919a>.
- [15] T. Fornaro, D. Burini, M. Biczyński, V. Barone, Hydrogen-Bonding Effects on Infrared Spectra from Anharmonic Computations: Uracil-Water Complexes and Uracil Dimers, *J. Phys. Chem. A* 119 (2015) 4224–4236, <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.5b01561>.
- [16] P.M. Wojciechowski, D. Michalska, Theoretical Raman and infrared spectra, and vibrational assignment for para-halogenoanilines: DFT study, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 68 (2007) 948–955, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.01.008>.
- [17] X. Meng-Xia, L. Yuan, Studies on the hydrogen bonding of aniline's derivatives by FT-IR, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 58 (2002) 2817–2826, [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(02\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(02)00072-0).
- [18] H. Szatyłowicz, Structural aspects of the intermolecular hydrogen bond strength: H-bonded complexes of aniline, phenol and pyridine derivatives, *J. Phys. Org. Chem.* 21 (2008) 897–914, <https://doi.org/10.1002/poc.1394>.
- [19] H.M. Badawi, W. Förner, S.A. Ali, A comparative study of the infrared and Raman spectra of aniline and o-, m-, p-phenylenediamine isomers, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 112 (2013) 388–396, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.04.075>.
- [20] N.P. Funnell, A. Dawson, W.G. Marshall, S. Parsons, Destabilisation of hydrogen bonding and the phase stability of aniline at high pressure, *CrystEngComm.* 15 (2013) 1047–1060, <https://doi.org/10.1039/C2CE26403J>.
- [21] J.C. Evans, The vibrational assignments and configuration of aniline, aniline-NHD and aniline-ND<sub>2</sub>, *Spectrochim. Acta.* 16 (1960) 428–442, [https://doi.org/10.1016/0371-1951\(60\)80037-9](https://doi.org/10.1016/0371-1951(60)80037-9).
- [22] P.J. Krueger, The vibrational mechanism of the fundamental NH<sub>2</sub> stretching vibrations in anilines, *Can. J. Chem.* 40 (1962) 2300–2316, <https://doi.org/10.1139/v62-354>.
- [23] P.A. Champagne, J. Desroches, J.F. Paquin, Organic fluorine as a hydrogen-bond acceptor: Recent examples and applications, *Synth.* 47 (2015) 306–322, <https://doi.org/10.1055/s-0034-1379537>.
- [24] E. Bogdan, G. Compain, L. Mtashobya, J.Y. Le Questel, F. Besseau, N. Galland, B. Linclau, J. Graton, Influence of Fluorination on the Conformational Properties and Hydrogen-Bond Acidity of Benzyl Alcohol Derivatives, *Chem. - A Eur. J.* 21 (2015) 11462–11474, <https://doi.org/10.1002/chem.201501171>.
- [25] B. Biswas, S. Mondal, P.C. Singh, Combined Molecular Dynamics, Atoms in Molecules, and IR Studies of the Bulk Monofluoroethanol and Bulk Ethanol to Understand the Role of Organic Fluorine in the Hydrogen Bond Network, *J. Phys. Chem. A* 121 (2017) 1250–1260, <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b12770>.
- [26] C. Li, S.-F. Ren, J.-L. Hou, H.-P. Yi, S.-Z. Zhu, X.-K. Jiang, Z.-T. Li, F.-H. N-H Hydrogen Bonding Driven Foldamers: Efficient Receptors for Dialkylammonium Ions, *Angew. Chemie.* 117 (2005) 5871–5875, <https://doi.org/10.1002/ange.200500982>.
- [27] X. Zhao, X.Z. Wang, X.K. Jiang, Y.Q. Chen, Z.T. Li, G.J. Chen, Hydrazide-Based Quadruply Hydrogen-Bonded Heterodimers. Structure, Assembling Selectivity, and Supramolecular Substitution, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 15128–15139, <https://doi.org/10.1021/ja037312x>.
- [28] J. Poater, M. Swart, C.F. Guerra, F.M. Bickelhaupt, Selectivity in DNA replication. Interplay of steric shape, hydrogen bonds,  $\pi$ -stacking and solvent effects, *Chem. Commun.* 47 (2011) 7326–7328, <https://doi.org/10.1039/c0cc04707d>.
- [29] G. Zhang, W. He, D. Chen, On difference of properties between organic fluorine hydrogen bond C-H...F-C and conventional hydrogen bond, *Mol. Phys.* 112 (2014) 1736–1744, <https://doi.org/10.1080/00268976.2013.861085>.
- [30] J.D. Dunitz, Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions, *Chem. Biol.* 2 (1995) 709–712, [https://doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90097-7](https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90097-7).
- [31] P.M. Wojciechowski, W. Zierkiewicz, D. Michalska, P. Hobza, Electronic structures, vibrational spectra, and revised assignment of aniline and its radical cation: Theoretical study, *J. Chem. Phys.* 118 (2003) 10900–10911, <https://doi.org/10.1063/1.1574788>.
- [32] P. Wojciechowski, K. Helios, D. Michalska, Theoretical anharmonic Raman and infrared spectra with vibrational assignments for monofluoroaniline isomers, *Vib. Spectrosc.* 57 (2011) 126–134, <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2011.06.001>.
- [33] Origin (OriginLab, Northampton, MA), Orig. (OriginLab, Northampton, MA), (n.d.).
- [34] D.J. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratch, Gaussian 16, Revision A.03, Gaussian 16, Revis. A.03. (2016).
- [35] Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function, *Theor. Chem. Acc.* 120 (2008) 215–241, <https://doi.org/10.1007/s00214-007-0310-x>.
- [36] Y.-S. Lin, G.-D. Li, S.-P. Mao, J.-D. Chai, Long-Range Corrected Hybrid Density Functionals with Improved Dispersion Corrections, *J. Chem. Theory Comput.* 9 (2013) 263–272, <https://doi.org/10.1021/ct300715s>.
- [37] R. Dennington, T. Keith, J. Milliam, GaussView, Version 5.0, Semichem Inc. Shawnee Mission KS, (2009).
- [38] P. Sinha, S.E. Boesch, C. Gu, R.A. Wheeler, A.K. Wilson, Harmonic vibrational frequencies: Scaling factors for HF, B3LYP, and MP2 methods in combination with correlation consistent basis sets, *J. Phys. Chem. A* 108 (2004) 9213–9217, <https://doi.org/10.1021/jp048233q>.
- [39] T.G.S. Todd A. Keith, AIMAll, (2019). aim.tkgristmill.com.
- [40] L. Goerigk, S. Grimme, A thorough benchmark of density functional methods for general main group thermochemistry, kinetics, and noncovalent interactions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 6670, <https://doi.org/10.1039/c0cp02984j>.
- [41] T.H. Dunning, Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen, *J. Chem. Phys.* 90 (1989) 1007–1023, <https://doi.org/10.1063/1.456153>.
- [42] D.E. Woon, T.H. Dunning, Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. IV. Calculation of static electrical response properties, *J. Chem. Phys.* 100 (1994) 2975–2988, <https://doi.org/10.1063/1.466439>.
- [43] E. Espinosa, E. Molins, C. Lecomte, Hydrogen bond strengths revealed by topological analyses of experimentally observed electron densities, *Chem. Phys. Lett.* 285 (1998) 170–173, [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(98\)00036-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(98)00036-0).
- [44] L. Martinez, R. Andrade, E.G. Birgin, J.M. Martinez, Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2157–2164, <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- [45] J. Hutter, M. Iannuzzi, F. Schiffmann, J. VandeVondele, cp2k: Atomistic simulations of condensed matter systems, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 4 (2014) 15–25, <https://doi.org/10.1002/wcms.1159>.
- [46] M. Krack, M. Parrinello, QUICKSTEP: Make the Atoms Dance, *High Perform. Comput. Chem.* 25 (2004) 29–50.
- [47] J. VandeVondele, M. Krack, F. Mohamed, M. Parrinello, T. Chassaing, J. Hutter, Quickstep: Fast and accurate density functional calculations using a mixed Gaussian and plane waves approach, *Comput. Phys. Commun.* 167 (2005) 103–128, <https://doi.org/10.1016/j.cpc.2004.12.014>.
- [48] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg, A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu, *J. Chem. Phys.* 132 (2010), <https://doi.org/10.1063/1.3382344> 154104.
- [49] A.E. DePristo, J.D. Kress, Kinetic-energy functionals via Padé approximations, *Phys. Rev. A* 35 (1987) 438–441, <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.35.438>.
- [50] M. Brehm, B. Kirchner, TRAVIS - A Free Analyzer and Visualizer for Monte Carlo and Molecular Dynamics Trajectories, *J. Chem. Inf. Model.* 51 (2011) 2007–2023, <https://doi.org/10.1021/ci200217w>.
- [51] R.C. Team, Computational Many-Particle Physics, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008. doi: 10.1007/978-3-540-74686-7.
- [52] E. Neuwirth, RColorBrewer: ColorBrewer palettes., (2014). <https://cran.r-project.org/package=RColorBrewer>.
- [53] N. Lewin-Koh, Hexagon Binning: an Overview. *Comprehensive R Archive, Network* (2014).
- [54] B.D. Team, Bokeh: Python library for interactive visualization, (2014). <http://www.bokeh.pydata.org>.
- [55] W.R. Bell, *Journal of Statistical Software*, *J. Stat. Softw.* 41 (2011) 1–3.
- [56] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, 2001.
- [57] A. Novak, Infrared and raman spectroscopy of biological molecules, in, *J. Mol. Struct.* (1980) 279–303, [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(80\)80386-3](https://doi.org/10.1016/0022-2860(80)80386-3).
- [58] P. Larkin, in: *Infrared and Raman Spectroscopy*, First, Elsevier, 2011, <https://doi.org/10.3390/rel9100297>.
- [59] D. O'Hagan, Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 308–319, <https://doi.org/10.1039/B711844A>.
- [60] J.P. Merrick, D. Moran, L. Radom, An evaluation of harmonic vibrational frequency scale factors, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 11683–11700, <https://doi.org/10.1021/jp073974n>.

- [61] M. Roca, C.M. Upfold, I.H. Williams, Critical evaluation of anharmonicity and configurational averaging in QM/MM modelling of equilibrium isotope effects, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22 (2020) 16267–16276, <https://doi.org/10.1039/d0cp01744b>.
- [62] D. Marx, J. Hutter, *Modern methods and algorithms of quantum chemistry*, John von Neumann Institute for Computing, NIC Series, Vol. 1, Jülich, 2000.
- [63] D. Chopra, V. Thiruvankatam, T.N.G. Row, In situ cryo-crystallization of fluorinated amines: A comparative study of cooperative intermolecular interactions involving ordered and disordered fluorine, *Cryst. Growth Des.* 6 (2006) 843–845, <https://doi.org/10.1021/cg060053d>.
- [64] M.A.V.R. Da Silva, A.I.M.C.L. Ferreira, J.R.B. Gomes, Experimental and computational study of the thermochemistry of the fluoromethylaniline isomers, *J. Phys. Chem. B.* 111 (2007) 6444–6451, <https://doi.org/10.1021/jp071232o>.
- [65] V.R. Thalladi, H.-C. Weiss, D. Bläser, R. Boese, A. Nangia, G.R. Desiraju, C–H...F Interactions in the Crystal Structures of Some Fluorobenzenes, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 8702–8710, <https://doi.org/10.1021/ja981198e>.
- [66] A. Bondi, Van der waals volumes and radii, *J. Phys. Chem.* 68 (1964) 441–451, <https://doi.org/10.1021/j100785a001>.
- [67] R.W. Bader, in: *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Clarendon Press, 1994, <https://doi.org/10.1038/1731012b0>.
- [68] S. Melandri, “Union is strength”: how weak hydrogen bonds become stronger, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 13901, <https://doi.org/10.1039/c1cp20824a>.
- [69] G. Desiraju, T. Steiner, in: *The Weak Hydrogen Bond*, Oxford University Press, 2001, <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198509707.001.0001>.



# Influence of fluorine substitution on nonbonding interactions in selected para-halogeno anilines

Wojciech Pietruś,<sup>[a,b]</sup> Rafał Kurczab,<sup>\*,[a,c]</sup> Justyna Kalinowska-Tłuścik,<sup>\*,[b]</sup> Ewa Machalska,<sup>[b,d]</sup> Dominika Golonka,<sup>[c]</sup> Małgorzata Barańska,<sup>[b,d]</sup> and Andrzej J. Bojarski<sup>[a]</sup>

- [a] Msc. Wojciech Pietruś, Dr. Rafał Kurczab\*, Prof. Andrzej J. Bojarski  
Department of Medicinal Chemistry  
Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences  
Smetna 12, 31-343 Kraków, Poland  
E-mail: kurczab@if-pan.krakow.pl
- [b] Msc. Wojciech Pietruś, Dr. Justyna Kalinowska-Tłuścik\*, Msc. Ewa Machalska, Prof. Małgorzata Barańska  
Faculty of Chemistry Jagiellonian University  
Gronostajowa 2, 30-387 Kraków, Poland  
E-mail: justyna.kalinowska-tluscik@uj.edu.pl
- [c] Dr. Rafał Kurczab, Dominika Golonka  
Faculty of Mathematical and Natural Sciences, University of Applied Sciences in Tarnow  
Mickiewicza 8, 33-100 Tarnów, Poland
- [d] Msc. Ewa Machalska, Prof. Małgorzata Barańska  
Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutic (JCET), Jagiellonian University  
Bobrzynskiego 14, 30-348 Krakow, Poland

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document.

**Abstract:** A series of 4-halogeno aniline derivatives was studied employing combined theoretical and experimental methods (i.e. crystal structure analysis and vibrational spectroscopies). This simplified model system was selected to shed light on the impact of fluorine substitution on the formation of noncovalent interactions such as halogen bonds (XBs) and hydrogen bonds (HBs), which are key interactions in fluorinated/halogenated drug-protein complex formation. Comparative analysis of three previously reported and five newly determined crystal structures indicated that, in most cases, 2-fluoro and 2,6-difluoro substitution of 4-X anilines increases the ability of adjacent amine to form strong N-H...N HBs. Additionally, fluorine substituents in the difluorinated derivatives are competitive and attractive HB and XB acceptors and increase the probability of halogen-halogen contacts. A peculiar observation was made for 4-iodoaniline and 2,6-difluoro-4-iodoaniline, which form distinct interaction patterns compared to the corresponding 4-Cl and 4-Br analogs. The observed intramolecular N-H...F interactions lead to additional NH bands in the FT-IR spectra.

## Introduction

Understanding the nature of noncovalent interactions (e.g., strong (HB) and weak (WHB) hydrogen bonds and van der Waals (vdW) contacts) stands at the core of many distinct scientific disciplines, such as solid-state chemistry and physics, material sciences, crystal engineering, medicinal chemistry, and drug discovery.<sup>[1-6]</sup> The introduction of specific functional groups to an organic molecule may significantly change the reactivity of the molecule but also affect the tendency of the molecule to form certain types of intra- and intermolecular contacts. This, in consequence, may influence and modify the micro- and macroscopic properties of the obtained molecule/material.<sup>[7-11]</sup> In the last decade, increasing interest in organic halides has manifested, leading to studies concerning halogen substituent properties, especially in terms of halogen bond (XB) formation and/or playing the role of hydrogen bond (HB) acceptors.<sup>[12-14]</sup>

The interest in halogenated derivatives is related to the peculiar properties of group 17 elements and their ability to form

and/or modulate noncovalent interactions and the patterns observed in the crystalline state. The anisotropy of the electron density distribution around halogen substituents leads to the occurrence of dual nucleophilic/electrophilic regions known as the negatively charged p-electron belt and the positive  $\sigma$ -hole.<sup>[15-17]</sup> Due to the aforementioned effects, all but two radioactive halogens (namely, astatine and tennessine) are of great importance in medicinal chemistry.<sup>[3,18-20]</sup> Organic halides not only endow a molecule with better pharmacokinetic properties, such as increased lipophilicity or metabolic stability of the bioactive agent<sup>[7]</sup> but also improve the affinity of a drug and its residence time within the binding site of a target protein.<sup>[19-21]</sup>

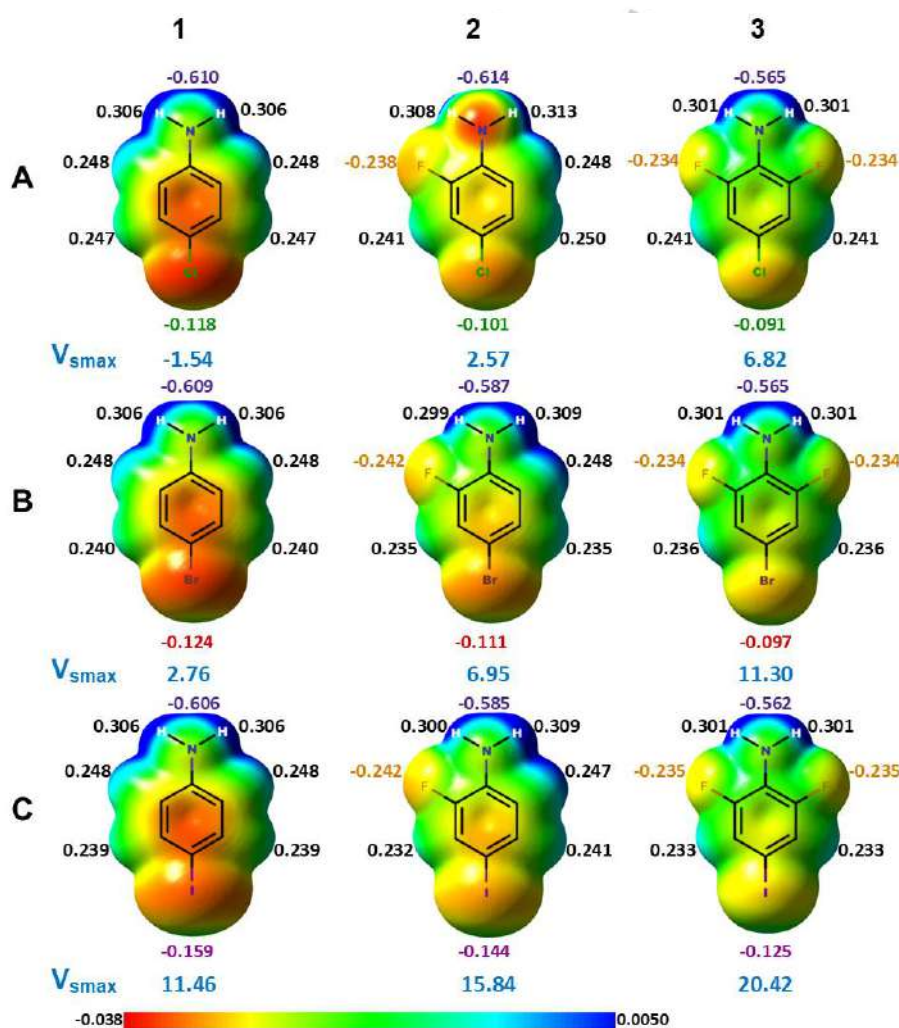
In contrast to heavier halogens (Cl, Br or I), fluorine is not a typical XB donor and HB acceptor.<sup>[22-26]</sup> However, due to having the highest electronegativity among halogens, the introduction of a fluorine substituent in organic compounds leads to significant changes in the physicochemical properties, reactivity, and biological activity of the new compound compared to its nonfluorinated analog. Additionally, the small size of the fluorine atom generates minimal steric perturbation while substituting hydrogen in organic compounds. Nevertheless, fluorine can influence the molecular conformation and strongly affect electron distribution within the molecule. This, in consequence, modulates the ability of a molecule to form noncovalent interactions.<sup>[27,28]</sup> It is especially interesting when fluorine is attached to an aromatic system. It may equally change the properties of other hydrogen or halogen bonding substituents<sup>[29]</sup> and influence the  $\pi$ -electron distribution and susceptibility of an aromatic moiety to form interactions characteristic of  $\pi$  electron-rich fragments (e.g.,  $\pi$ - $\pi$ , cation- $\pi$ , C-H... $\pi$  or X... $\pi$  contacts).<sup>[3,7,15]</sup> Although fluorination is currently an intuitive and routine approach in the modulation of molecular/material properties that is broadly applied in medicinal chemistry<sup>[30]</sup> and crystal engineering, the results of single or multiple fluorine substitutions are still not easy to predict. Thus, a more in-depth study to understand how fluorine influences the molecular tendency to form intra- and intermolecular interactions is required.

In our recent paper, we presented a theoretical, structural, and spectroscopic (FT-IR, Raman) study describing and characterizing the impact of the fluorine substituent position in aniline on the geometrical preferences and incidence rate of hydrogen bond formation.<sup>[31]</sup> To extend our understanding of the noncovalent interaction tunability by fluorine substituents, we chose a series of 4-X aniline derivatives (where X is Cl, Br, or I) as a model system. We aimed to elucidate how the presence of fluorine in the *ortho* position with respect to the amine influences the hydrogen and halogen bonding properties and other noncovalent interactions formed by the studied compounds. To reach this goal, we performed detailed theoretical and experimental analyses (crystal structure analysis and vibrational spectroscopy) of the pure, 2-mono- and 2,6-difluoro-substituted derivatives of the abovementioned 4-halogenated aniline derivatives. Our results shed new light on the molecular modification of organic halides with putative applications in crystal engineering, polymorphism, co-crystal design and support for drug discovery methodology.

## Results and Discussion

### Electrostatic potential surface (EPS)

To better understand the differences in the noncovalent interaction patterns in the studied crystal structures, electrostatic potential maps were calculated to determine the impact of halogen type in the 4-X aniline on the intermolecular interactions formed by the investigated compounds. Additionally, to quantify the intensities of the  $\sigma$ -holes through the maximum surface electrostatic potential values, we calculated the magnitude of the  $\sigma$ -holes, which can indicate the XB strength.<sup>[32]</sup> It is worth emphasizing that all of the investigated compounds were in the solid state, with only one exception (compound **2a** is a liquid at room temperature). The EPS showed the well-known tendency of increasing the magnitude of the  $\sigma$ -hole for heavier halogen atoms – from the lowest values for chlorine 0.53 kcal/mol, which means) to the highest values for bromine and iodine (5.58 and 13.26 kcal/mol, respectively) – which is caused by decreasing electronegativity and increasing polarizability (Supp. Fig. 1).<sup>[15,33]</sup> At the same time, the attractiveness of HB formation with the halogen atom decreases inversely due to the decreasing halogen electronegativity (Supp. Fig. 1).<sup>[34]</sup>



**Figure 1.** Electrostatic surface potential (EPS) with Mulliken atomic charges (a.u.) and the values of the magnitude of  $\sigma$ -hole ( $V_{smax}$  kcal/mol) calculated for the 4-X halide aniline molecules. Column 1 rows a, b and c show the Cl, Br and I derivatives, respectively, and columns 2 and 3 show their corresponding 2-F and 2,6-di-F analogs, respectively. T

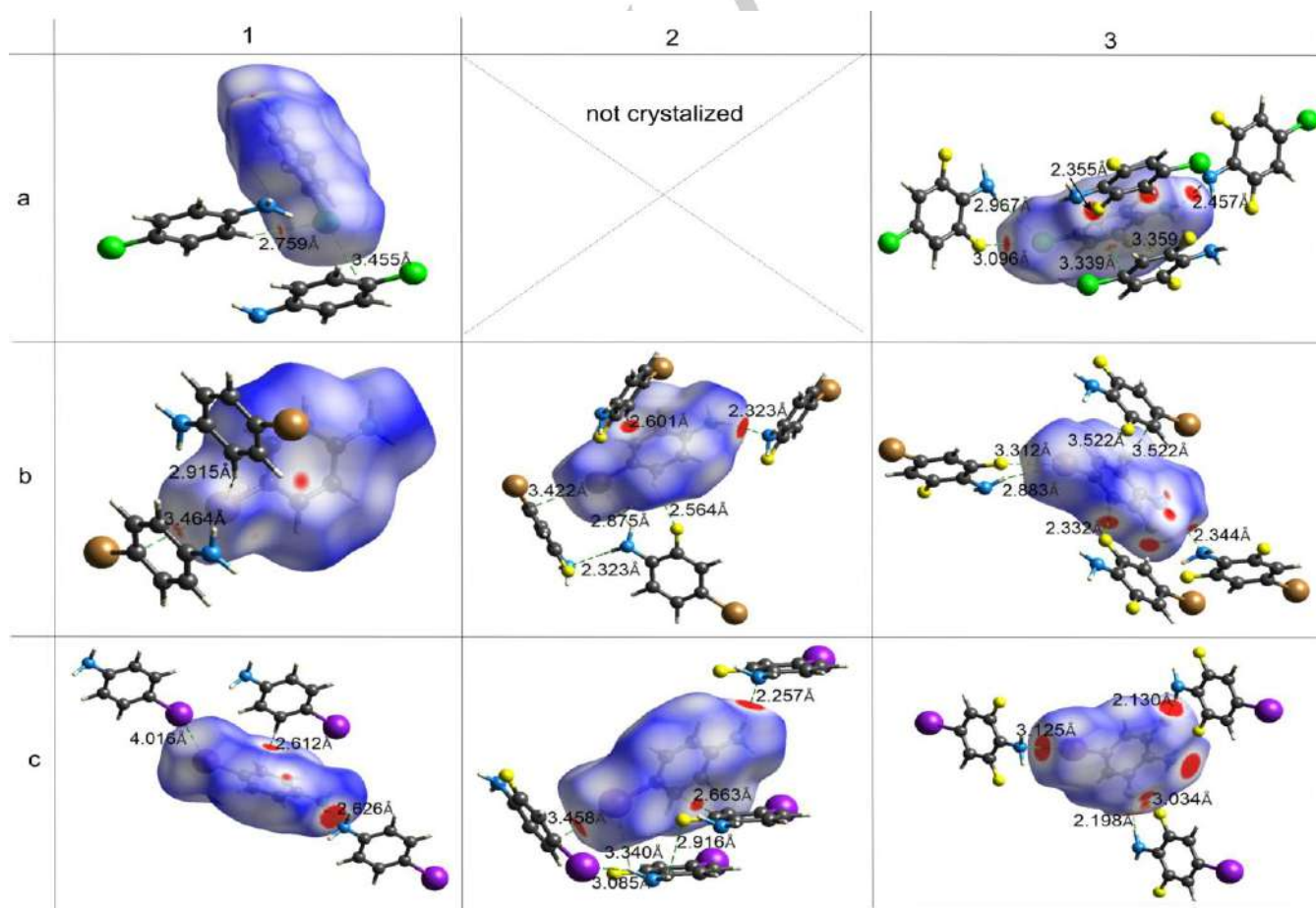


2-F or 2,6-di-F substitution of 4-X aniline derivatives increased the magnitude of the  $\sigma$ -hole by increasing the anisotropy on the halogen atom (in the range of 0.53 to 6.76 kcal/mol for Cl, 5.58 to 11.98 kcal/mol for Br, and 13.26 to 19.80 kcal/mol for I; Supp. Fig. 1). Moreover, the presence of fluorine decreased the HB acceptor properties of the halogen at position 4 by partial withdrawal of the electrons localized in the negative belt into the ring resonance (Fig. 1). The net result of the introduced fluorine substituent was an increase in the XB-donating capabilities.<sup>[15]</sup> On the other hand, fluorine had the opposite effect on the adjacent amine group. Because of the inductive effect, the fluorine drew the free electron pair of the nitrogen towards the aromatic ring,<sup>[35]</sup> so a small decrease in the Mulliken charge on the nitrogen atom was observed for the 2-F and 2,6-di-F derivatives (for all halogens from approx.  $-0.61$  a.u. to  $-0.56$  a.u.) suggesting that the HB acceptor properties of the amine group decreased. Additionally, fluorine in organic molecules hardly ever plays the role as a HB acceptor due to the high polarization of the C-F bond and closed electronic shell.<sup>[23,36]</sup> However, in difluorinated derivatives, the negative charge on the fluorine atom is smaller ( $\Delta \sim 0.1$  a.u.; Fig. 1), which may suggest that fluorine may have a greater ability to participate in noncovalent interactions.

### Crystal structure analysis

Crystal structures of compounds **1a–c** were determined and previously described in the literature.<sup>[37,38]</sup> Their structural data were available in the CSD. Due to the similar results obtained from our recrystallization trials and redetermination of the crystal structures as well as the lack of success in obtaining polymorphic forms, the packing and interaction motifs in **1a–c** were further studied based on the CSD reported data (CLANIC05,<sup>[37]</sup> PBRANL01,<sup>[38]</sup> and EJAYET<sup>[38]</sup>, respectively).

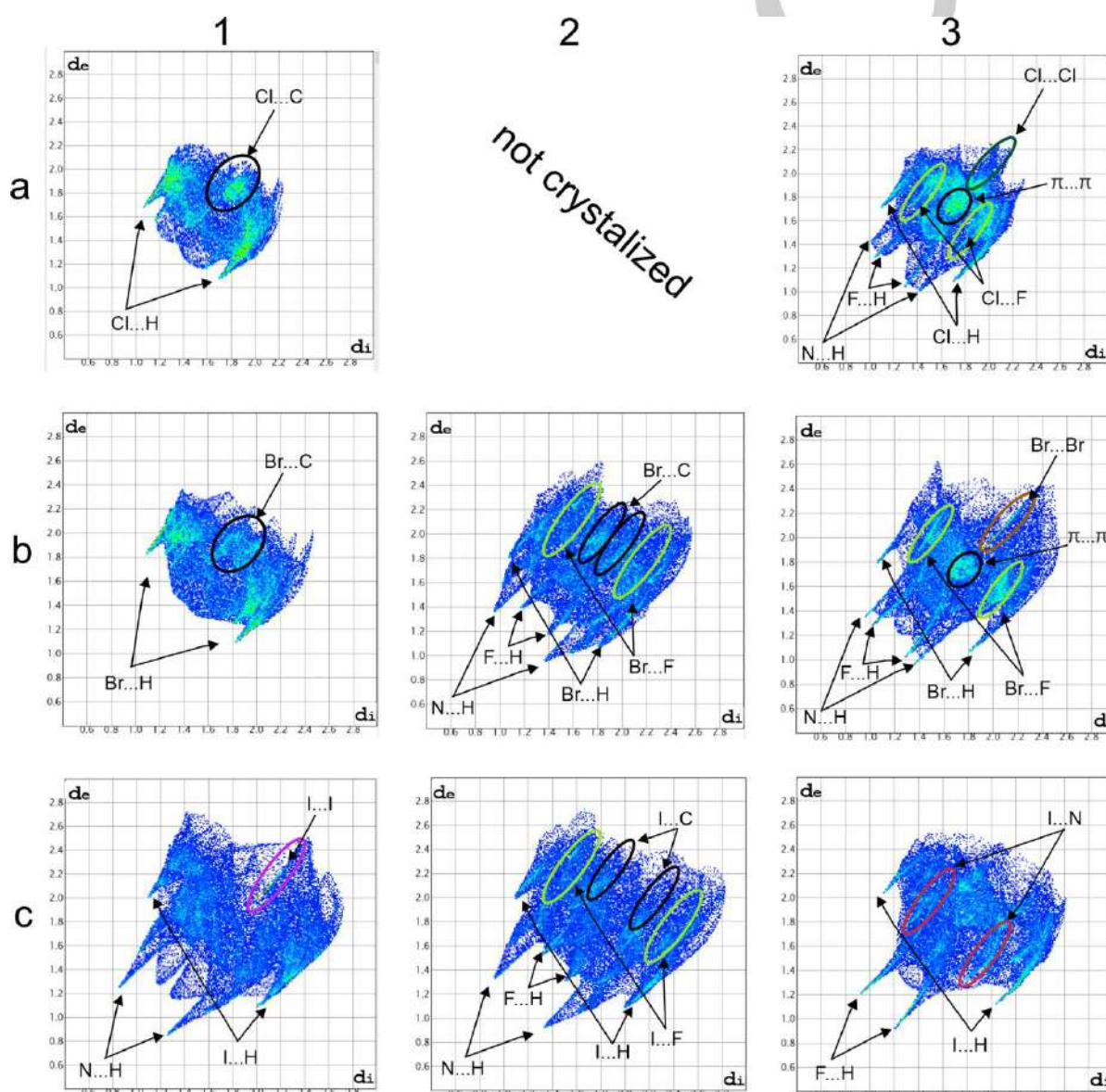
Compounds **1a–c** are symmetric molecules. Thus, in structures **1a** and **1b**, the molecules are located at special positions (a mirror plane perpendicular to the [010] axis). This location leads to fully symmetric motifs of the observed intermolecular interactions. The crystal packing of **1a** and **1b** are similar (Supp. Figs. 12 and 13). Both structures are stabilized by a pair of symmetric WHBs of the C-H...Cl (or Br) type<sup>[39]</sup> and N-H...Cl (or Br) contacts (Fig. 2, Tab. 1, Supp. Figs. 3 and 4). The chlorine or bromine substituents are additionally involved in the XB interaction, with the  $\pi$  electrons of the aromatic ring as the nucleophilic region (with Cl...Ct and Br...Ct distances of 3.332 Å and 3.390 Å, respectively, where Ct is the center of mass of the aromatic ring). However, the  $\sigma$ -hole effect and its corresponding attractive interaction with the  $\pi$  electrons are more evident when analyzing the calculated Hirshfeld surface of 4-bromoaniline than 4-chloroaniline (C...Br and C...Cl, including reciprocal contacts, are 7.5% and 6.7% of the total surface, respectively).



**Figure 2.** Hirshfeld surfaces generated for the investigated crystal structures of the 4-X anilines. Column 1, rows a, b and c represent the para Cl, Br and I derivatives, respectively) and columns 2 and 3 present their corresponding 2-F and 2,6-di-F derivatives, respectively, presenting the most important noncovalent interactions and short contacts.

In contrast, the structure of 4-iodoaniline (**1c**) exhibits lower symmetry in the crystal lattice and corresponding asymmetry in the observed intermolecular contacts. It is surprising that despite the same symmetry of the single molecule as **1a** and **1b**, aniline derivative **1c** diverges in its crystal structure formation. The nucleophilic, p-electron belt of the iodine substituent is a less attractive hydrogen bond acceptor compared with that observed for chlorine and bromine in structures **1a** and **1b** described above. Thus, the dominant interaction type in the crystal structure of **1c** is the strong N–H...N HB (Fig. 2, Tab. 1, Supp. Fig. 5). Additionally, stabilizing N–H...I and I...I contacts were observed. The I...I contact is a

poorly understood interaction in crystal assembly, but it is considered an important factor in crystal engineering due to its relatively small energy, allowing rapid rearrangements.<sup>[40]</sup> Halogen-halogen contact was not observed for **1a** or **1b**, while the contact surface area for I...I in structure **1c** was 2.9% of the total Hirshfeld surface (see corresponding fingerprint, Fig. 3). This contact may be classified as type I (Fig. 4). However, such contacts are not classical XBs according to the IUPAC definition.<sup>[17]</sup> The observed close halogen-halogen distance can be a result of crystal packing, but the calculated energy suggests its stabilizing character ( $E_{I...I} = -0.8$  kcal/mol; Tab. 1).<sup>[41]</sup>

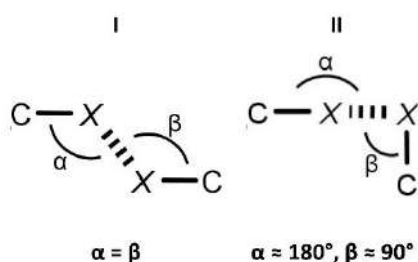


**Figure 3.** Hirshfeld surface fingerprint plots of the nearest internal distance ( $d_i$ ) vs. the nearest external distance ( $d_e$ ) calculated for the crystal structures of the 4-X anilines. Column 1, rows a, b and c show the *para* Cl, Br and I derivatives, respectively and columns 2 and 3 show their corresponding 2-F and 2,6-di-F analogs, respectively. Characteristic spikes represent the shortest distance observed between two atoms, which are specific for stabilizing interactions in the crystal structure.

The analyzed 2-F substituted 4-Cl-aniline derivative exhibits peculiar properties. The EPS analysis suggests strong localization and exposure of the nitrogen lone pair (Fig. 1).

Unfortunately, despite several trials performed at this stage of our study, we did not succeed in obtaining single crystals of **2a** to experimentally confirm this observation. As we postulated in

our previous work, in monofluoro-substituted derivatives of aniline,<sup>[31]</sup> fluorine may play a role as an acceptor during hydrogen bond formation, with a characteristic nonlinear geometry.<sup>[39,42]</sup> In the case of structures **2b** and **2c**, such C-H...F (in **2b** – 3.371 Å; 132.8°) and N-H...F (in **2c** – 3.512 Å, 120.5°) interactions were observed (Fig. 2, Supp. Figs. 5 and 6). The estimated F...H contact surfaces for both structures are similar (18.1% and 17.5% for **2b** and **2c**, respectively), and characteristic spikes were observed in the corresponding fingerprints (Fig. 3, Tab. 1). It is worth mentioning that the C-H...F HBs do not depend on the charge of the fragments involved, and the noncollinear geometry is a result of the predominant role of stronger interactions in the crystal lattice. This is the reason why the C-H...F interactions are categorized as "at the limit of the phenomenon".<sup>[42,43]</sup>



**Figure 4.** Classification of the halogen-halogen interactions (types I and II) based on the observed geometry.<sup>63</sup>

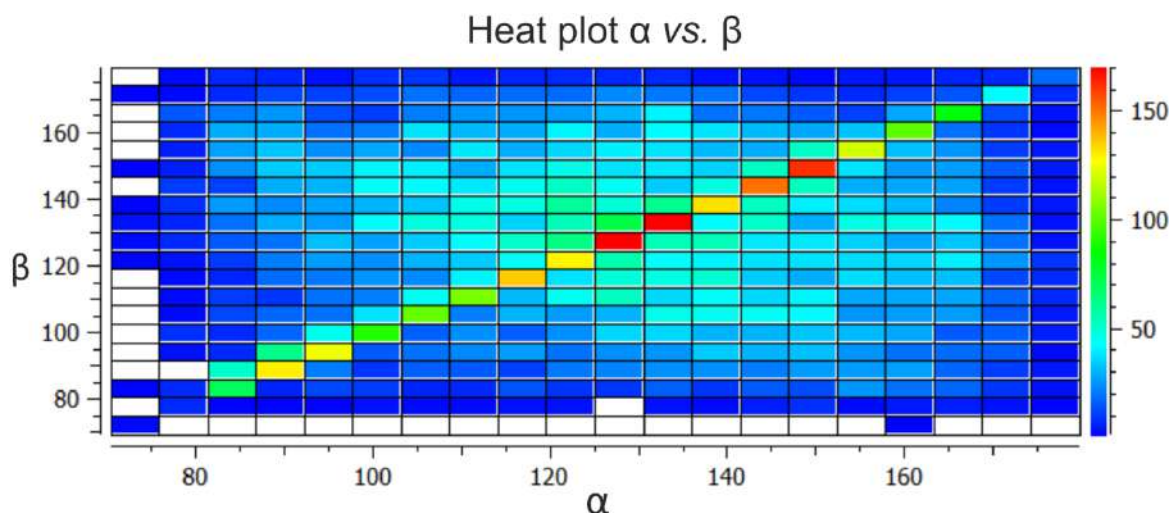
Indeed, due to the exposed nitrogen lone pair, the strongest observed interactions in the crystal structures of **2b** and **2c** were the N-H...N interactions (Figs. 2 and 3, Tab. 1). The mentioned lone pair exposure effect is the strongest among all studied crystal structures and can be additionally confirmed by the increased pyramidalicity of the nitrogen, which is expressed as the distance of this atom to the mean plane defined by the three atoms covalently bonded to N (0.276 Å and 0.275 Å for **2b** and **2c**, respectively). In the analyzed structures, this was an unexpected and nonintuitive observation because according to the resonance effect caused by the electronegative fluorine, free pair of electrons on the nitrogen should be drawn into the aromatic system.<sup>[35]</sup> Additionally, this observation contradicts our previously published data,<sup>[31]</sup> where in the 2-F aniline derivative, engagement of the nitrogen lone pair and planar geometry of the amine group were observed. Thus, the impact of a heavier halogen (-Cl, -Br or -I) substitution in the *para* position with respect to the amine group is not negligible and leads to a more tetrahedral geometry of the amine group despite a single 2-F substituent in proximity. For this reason, the nitrogen lone pair is the most attractive HB acceptor in the crystal lattices of **2b** and **2c**. Additionally, in these structures, the  $\pi$ -electron system of the aromatic ring is an attractive WHB partner of the C-H... $\pi$  type,

where a donor and an acceptor area are located at the corresponding carbon atom of two neighboring aromatic systems (Fig. 2).

Similar to the structures of series **1**, in series **2**, the observed  $\sigma$ -hole positive charge of the Br and I substituents interacts with the  $\pi$ -electrons of the neighboring aromatic system (the Br...C and I...C contact surfaces were 8.1% for both structures). The electron-rich belt of both mentioned halogens is an acceptor in N-H...Br (or I) contacts (Tab. 1, Figs. 2 and 3) present Br...H and I...H contacts, covering 23% and 24.5% of the total Hirshfeld surface, respectively, including reciprocal contacts). There are no homocontacts of the Br...Br or I...I type. However, Br...F and I...F contacts were observed (5.0% and 5.7% of the total Hirshfeld surface, respectively).

The nature of the interactions observed in the crystal structures changed for the symmetric 2,6-di-fluoro substituted derivatives of series **3**. These mostly concern the fluorine contribution to HB and XB contacts. The high electronegativity of this halogen and polarizability of the C-F bond in organic compounds<sup>[44]</sup> lead to poor acceptor properties of fluorine in HBs (F typically takes part in C-H...F interactions) and seldom forms XBs.<sup>[22,23,42]</sup> Interestingly, in structures **3a** and **3b**, fluorine is involved in the halogen bond as an acceptor, interacting with the exposed  $\sigma$ -hole of chlorine and bromine substituents (Fig. 2). The observed Cl...F (3.096 Å; 3.8% of the Hirshfeld surface, including the reciprocal contact) and Br...F (3.312 Å, corresponding 9.6% of the Hirshfeld surface) distances (Tab. 1) are smaller than the sum of van der Waals radii (3.22 Å and 3.32 Å, respectively).<sup>[45]</sup> However, for the 4-bromo substituent, this effect seems to be weaker than in the case of the chlorine derivative. Although the abovementioned interactions are of the halogen-halogen type, they should be considered pure XBs due to the observed geometrical parameters (Tab. 1). The mentioned interaction is additionally stabilized by the presence of the HB donor (-NH<sub>2</sub>) in the direct neighborhood of the fluorine involved in the described XB. Moreover, one of the hydrogen atoms of the amine group interacts with the Cl (or Br) p-electron belt (Fig. 2, corresponding spikes in the fingerprint plot in Fig. 3).

In the crystal structures of **3a** and **3b**, classical N-H...N interactions were also observed (Figs. 2 and 3; Tab. 1, Supp. Figs. 7 and 8). One of the fluorine substituents is involved in dimer formation, composed of two molecules interacting *via* a pair of centrosymmetric C-H...F WHBs. The additional stabilization of the crystal lattice is related to halogen-halogen contacts (Cl...Cl and Br...Br contacts are represented by 3% and 3.7% of the Hirshfeld surface, respectively) as well as  $\pi$ ... $\pi$  interactions (Figs. 2 and 3).



**Figure 5.** Statistical analysis of the nonbonding F...F contacts in crystal structures deposited in the CSD. The heat plot shows the  $\alpha$  and  $\beta$  angle correlation (angles defined as in Fig. 4) and the corresponding count represented in the color scale. According to the evaluated geometrical parameters, the majority of the C-F...F-C contacts in crystal structures are classified as type I.

Interestingly, the more symmetrical a single molecule is, the more distinct the observed interaction patterns are in the crystal structures of the investigated *para*-iodo derivatives. Despite two fluoro substituents in structure **3c**, the partial positive charge of the iodine  $\sigma$ -hole engages the lone pair of the amine nitrogen atom as a XB acceptor. This, in consequence, leads to alternative strong hydrogen bonding patterns, with fluorine assuming the role of the acceptor (Figs. 2 and 3; Tab. 1, Supp. Fig. 9). The *ortho* position of both fluorine substituents relative to the amine group and involvement of both substituent types in the mentioned N-H...F interaction provokes short F...F contacts. This rare interaction/contact (2.858 Å, 130.4°; Tab. 1) has been reported for only a few structures deposited in the CSD to date.<sup>[42]</sup> However, our statistical search (Supp. Figs. 10 and 11)

of the recent database release (CSD version 5.41; November 2019) revealed 5785 hits with F...F distances of less than 2.9 Å to ensure that the vdW radii overlapped. The obtained results suggest that for the majority of structures, the studied F...F interaction can be classified as type I (Fig. 5). In analyzed structure **3c**, the angles between the interacting C-F groups indicate that the observed short contact is a type II halogen-halogen interaction (Fig. 4) with a calculated F...F interaction energy of  $-2.9$  kcal/mol (Tab. 1). All of the abovementioned fluorine interactions seem to be weak in nature, but the crystal structure does not solely depend on strong interactions. Additionally, weaker forces play a vital role in the stabilization of systems by their ability to create numerous cooperating acts.<sup>[46]</sup>

**Table 1.** Geometrical parameters of the interactions/contacts observed in the crystal structures (distance parameterized as D...A) and the corresponding energies calculated using the QTAIM method *via* the Espinosa equation (see Experimental Section). The interactions are colored according to the type of interacting atoms (N...N – blue, N...X – red, X...Ct – green, X...X – magenta, C...X – gray) in the crystal. 1) 4-Halogeno anilines (a – Cl, b – Br, c – I); 2) 2-F derivatives of the 4-halogeno anilines; and 3) 2,6-di-F derivatives of the 4-halogeno anilines.

	1			2			3		
	Type of interaction / contact	Geometrical parameters	Energy kcal/mol	Type of interaction / contact	Geometrical parameters	Energy kcal/mol	Type of interaction / contact	Geometrical parameters	Energy kcal/mol
a	N-H...Cl	3.719 Å, 142.4°	-1.1	not crystallized			N-H...N	3.409 Å, 158.3°	-1.7
	Cl...Ct	3.332 Å, 162.2°	-1.1				N-H...Cl	3.077 Å, 146.7°	-0.6
	C-H...Cl	3.750 Å, 152.8°	-1.7				C-Cl...F	3.096 Å, 167.2°	-1.9
b	N-H...Br	3.908 Å, 147.8°	-0.9	N-H...N	3.245 Å, 152.8°	-2.6	N-H...N	3.305 Å, 160.1°	-2.3
	Br...Ct	3.390 Å, 144.7°	-1.1	N-H...Br	3.652 Å, 136.6°	-1.3	N-H...Br	3.859 Å, 163.8°	-1.1
	C-Br...Ct			Br...Ct	3.580 Å, 166.6°	-1.1	C-Br...F	3.312 Å, 158.9°	-1.2
	C-H...Br	3.910 Å, 153.1°	-1.3	C-Br...Ct	3.371 Å, 132.8°	-1.1	Br...F-C	139.2°	
c	N-H...N	3.126 Å, 170.8°	-2.6	N-H...N	3.231 Å, 162.8°	-3.0	N-H...F	3.130 Å, 170.9°	-2.4
	N-H...I	3.983 Å, 144.8°	-0.9	N-H...I	3.815 Å, 129.8°	-1.3	F...F	2.858 Å, 130.4°, 83.9°	-2.9
	I...I	4.016 Å, 158.4°, 121.8°	-0.8	N-H...F	3.512 Å, 120.5°	-0.5	N-H...F	3.200 Å, 172.4°	-3.4
				I...Ct	3.693 Å, 165.1°	-1.2	F...F	3.138 Å, 124.6°, 98.7°	-2.9
							I...N	3.125 Å, 173.8°	-2.9

### Vibrational analysis

Vibrational analyses were performed for both isolated molecules (gas phase approach) and the crystal structure unit cell (Supp. Figs. 3–10). Comparison of the predicted Raman and FT-IR spectra with the experimental spectra supported vibration modes to band assignments (Supp. Tabs. 1–9). The calculations in the gas-phase were used to find the position of the individual oscillation, however the intermolecular interactions cause a spectral shift of the bands (even  $50\text{ cm}^{-1}$ , Fig. 6), so the calculated frequencies from unit cells were used to track the changes on spectra.

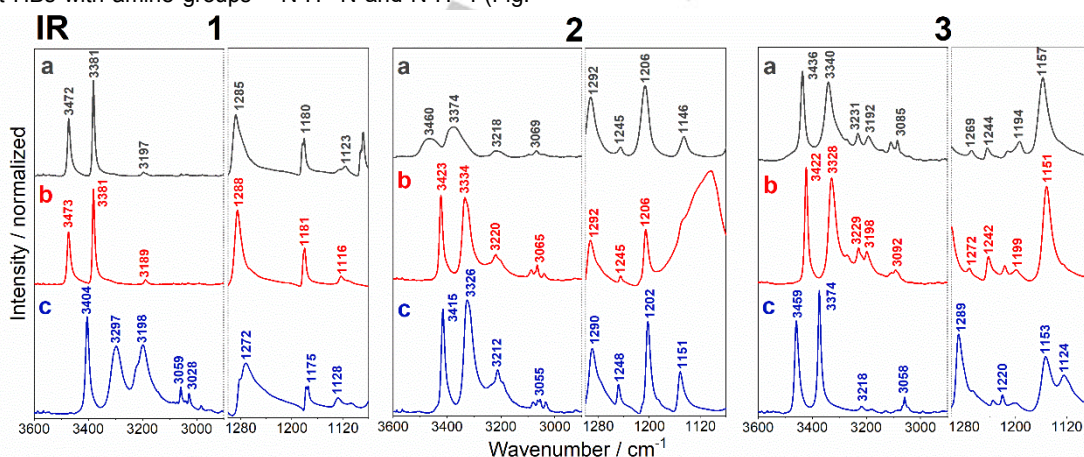
### IR spectroscopy

Two FT-IR spectral ranges were used as indicator bands to study changes within the functional groups involved in significant intermolecular interactions. The first range ( $3650\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$ ) describes stretching vibrations of  $\text{NH}_2$  and  $\text{CH}$  groups involved in HBs, and the second range ( $1300\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ ) includes bands assigned to a C-F stretching vibration (vCF). The bands associated with the asymmetric and symmetric  $\text{NH}_2$  stretching vibrations (range  $3472\text{--}3403\text{ cm}^{-1}$  and  $3381\text{--}3198\text{ cm}^{-1}$ , respectively) showed no changes between **1a** and **1b** (Fig. 6), most likely because the energy of HB interactions involving the  $\text{NH}$  groups (crystal structures; Fig. 2, Supp. Figs. 3 and 4) are almost equal (Tab. 1). The FT-IR spectrum of compound **1c** (Fig. 6) shows common strong hydrogen bonding features – a significant frequency downshift of hydrogen-bonded  $\text{NH}$  stretching vibrations accompanied by a large increase in oscillator strength ( $\text{N-H}\cdots\text{N}$  HB). In the crystal structure of **1c**, two different HBs with amine groups –  $\text{N-H}\cdots\text{N}$  and  $\text{N-H}\cdots\text{I}$  (Fig.

2, Supp. Fig. 5) were observed with a large energy difference (Tab. 1). This experimental observation can be explained by coupling with different acceptors, which results in the formation of two distinct  $\text{NH}$  oscillators. Furthermore,  $\text{N-H}\cdots\text{N}$  and  $\text{N-H}\cdots\text{I}$  HBs increase the energy gap between  $\text{NH}$  oscillations, which leads to Fermi resonance, with the overlap of two  $\nu_{\text{sym}}\text{NH}$  at different frequencies.<sup>[47]</sup>

The FT-IR spectral region of  $1350\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$  for nonfluorinated derivatives of aniline contains only bands assigned to aromatic ring stretching and its deformation vibrations. Among all studied substances, only **2a** was in a liquid state. This is visible in the spectrum, as a decrease in the integral intensity and broadening of the bands was observed in comparison with the spectra of the remaining derivatives, which were in the solid state.

The bands associated with the  $\text{NH}$  stretching motions in the spectrum of **2b** were shifted towards lower wavenumbers compared to its nonfluorinated analog **1b** ( $\Delta\nu \sim 50\text{ cm}^{-1}$ ). Moreover, the half-width of this band was broadened (Fig. 6), which indicated the presence of strong  $\text{N-H}\cdots\text{N}$  HBs. In contrast to the **2c** spectrum, a shift towards higher wavenumbers of the  $\nu\text{NH}$  bands was observed ( $\Delta\nu \sim 20\text{ cm}^{-1}$  vs. **1c**; Fig. 6), which may be due to the appearance of the intermolecular  $\text{N-H}\cdots\text{F}$  HB in the crystal (Fig. 2, Supp. Fig. 7). The first overtone of the  $\text{NH}$  bending vibration ( $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ ) appeared in the FT-IR and Raman spectra of gaseous and liquid aniline derivatives at  $\sim 3220\text{ cm}^{-1}$ ,<sup>[48]</sup> however, in the spectra of nonfluorinated derivatives **1a–c**, these bands were not observed.



**Figure 6.** Comparison of the FT-IR spectra within the range of  $2800\text{--}3650\text{ cm}^{-1}$  (range of the  $\nu\text{NH}$  bands) and  $1350\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$  (range of the vCF band) for 1) 4-halogeno anilines (a – Cl, b – Br, c – I); 2) 2-F derivatives of the 4-halogeno anilines; and 3) 2,6-di-F derivatives of the 4-halogeno anilines.

New bands appeared in the spectra of the monofluorinated derivatives at  $3220\text{ cm}^{-1}$  and  $3212\text{ cm}^{-1}$  for **2b** and **2c**, respectively. These bands may be related to the formation of intramolecular  $\text{N-H}\cdots\text{F}$  HBs (Fig. 6), which may affect the strength and frequency of the  $\text{N-H}$  stretching vibrations.<sup>[49]</sup> Unit cell vibrational analysis of the fluorinated derivatives showed that the C-F vibration was not isolated and occurred in combination with deformation modes of the aromatic ring and amino group (Fig. 6, Supp. Tabs. 1–9). Nevertheless, in the fluorinated derivatives, a fairly intense and well-separated vCF band ( $\sim 1151\text{ cm}^{-1}$ ) was observed, which was not visible in the

nonfluorinated compounds. In the case of **2b**, the vCF band was covered by a wide and very intense band at  $1104\text{ cm}^{-1}$  or artifacts, which were present in all attempts.

Difluorinated derivatives of the 4-halogeno anilines also showed a significant relationship between the interactions observed in the crystal structures (Fig. 2, Supp. Figs. 8–10) and the shifts of the corresponding bands (Fig. 6). In the spectrum of compound **3a**, a significant low-frequency shift of the bands assigned to  $\nu\text{NH}$  and their strong broadening was observed in contrast to its nonfluorinated analog **1a** ( $\Delta\nu \sim 40\text{ cm}^{-1}$ ). This

observation is associated with the existence of a N-H $\cdots$ N HB (Tab. 1).

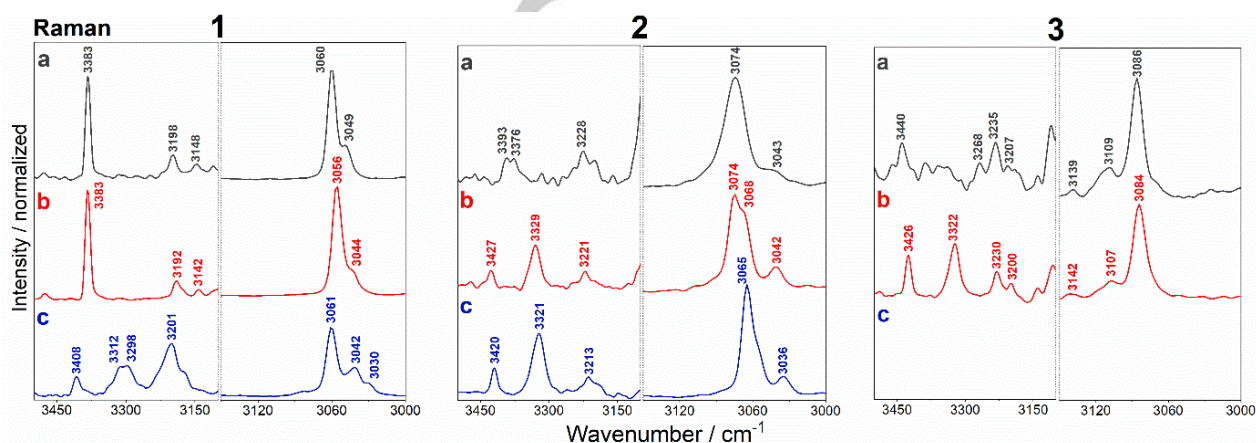
For compound **3b**, the energy of the N-H $\cdots$ N HB is slightly weaker than that of **2b** ( $E = -2.3$ , and  $-2.6$  kcal/mol, respectively; Tab. 1); but still, the shift towards lower wavenumbers ( $\Delta\nu = 6$   $\text{cm}^{-1}$ ) attributed to  $\nu_{\text{sym}}\text{N-H}$  was observed. Conversely, in the FT-IR spectrum of **3c**, a high-frequency shift of this band was noticed ( $\Delta\nu \sim 60$   $\text{cm}^{-1}$  vs. **1c**), which was caused by the appearance of strong N-H $\cdots$ F bonds. The results show that when fluorine acts as a hydrogen bond acceptor, unlike conventional HBs (e.g., O-H $\cdots$ O, N-H $\cdots$ N), the stretching vibrations of the donor groups involved in the HB may shift towards higher wavenumbers.<sup>[50]</sup> Fluorine substitution of aniline derivatives in the 2,6-positions results in the formation of two intramolecular N-H $\cdots$ F bonds, which induce the formation of two N-H oscillators with different strengths. This substitution phenomenon manifests in the FT-IR spectra as the splitting of a single band into two smaller bands (in the range 3228–3192  $\text{cm}^{-1}$  for compounds **3a** and **3b**). Interestingly, a rare F $\cdots$ F interaction was observed in the crystal structure of compound **3c**, where each fluorine simultaneously participated in the formation of nearly linear N-H $\cdots$ F HBs (Fig. 2, Supp. Fig. 10). However, both observed N-H $\cdots$ F HBs in **3c** have different energies (Tab. 1) due to the differences in the F $\cdots$ N distances, which is additionally visible in the spectrum as the split of the bands attributed to  $\nu\text{CF}$  (Fig. 6).

### Raman spectroscopy

In the Raman spectra of the studied compounds, two relevant ranges were selected, namely, the range of  $\nu\text{NH}$  vibrations (3500–3100  $\text{cm}^{-1}$ ), which can be characterized by very

intense signals in the IR spectra but rather low-intensity bands in the Raman spectra (Supp. Figs. 11 and 12). The second region was related to the  $\nu\text{CH}$  modes (3150–3000  $\text{cm}^{-1}$ ; Fig. 7). The experimental Raman spectra of the fluorinated compounds yielded some distinct spectral features compared to those of the nonfluorinated compounds, including a decrease in the background fluorescence. The increase in fluorescence was related to the number of fluorine atoms (in the order nonfluorinated < monofluorinated < difluorinated) and to the size of the halogen substituent (in the order Cl < Br < I). The striking signatures of the Raman spectra of the halogenated anilines are low-intensity bands associated with  $\nu\text{CF}$  stretching vibrations, which are difficult to observe due to the high polarization of the C-F bond. Moreover, the C-X stretching vibration bands are difficult to assign because they are coupled with other deformation modes of the aromatic ring and are located at low wavenumbers due to the high reduced mass.

Although the Raman spectra show a significant correlation with the FT-IR spectra, infrared spectroscopy has enhanced sensitivity in probing N-H $\cdots$ N HBs due to the appearance of highly intense bands located in the NH stretching vibration region. In the NH vibration range of the nonfluorinated aniline derivatives compounds **1a** and **1b**, only one NH stretching band was visible (the  $\nu_{\text{asym}}\text{NH}$  vibration band was too low to be distinguished from noise), while after the appearance of the N-H $\cdots$ N HB in the crystal of compound **1c**, both bands were visible and shifted towards lower wavenumbers. The locations of the bands assigned to the  $\nu\text{CH}$  vibration (3000–3120  $\text{cm}^{-1}$ ) showed small differences that are within the limit of spectral resolution.



**Figure 7.** Comparison of the FT-Raman spectra within the range of 3500–3120  $\text{cm}^{-1}$  (the range of  $\nu\text{NH}$  bands) and 3210–3000  $\text{cm}^{-1}$  (the range of  $\nu\text{CH}$  bands) for 1) 4-halogeno anilines (a, b and c refer to Cl, Br and I, respectively); 2) the 2-F derivatives of the 4-halogeno anilines; and 3) the 2,6-difluoro derivatives of the 4-halogeno anilines.

The  $\nu\text{NH}$  bands in the Raman spectrum of **2b** were broadened and shifted towards lower wavenumbers ( $\Delta\nu \sim 50$   $\text{cm}^{-1}$ ) compared to its nonfluorinated analog **1b** (Fig. 7), indicating the presence of a strong N-H $\cdots$ N HB. However, comparing the spectral regions of **2c** and **1c**, an upshift was indicated ( $\Delta\nu \sim 10$   $\text{cm}^{-1}$ ), which correlates with the presence of a N-H $\cdots$ F HB.

Additionally, the NH stretching vibration band, corresponding to the formation of intramolecular N-H $\cdots$ F HBs, is very poorly visible (slightly above the noise level). It is worth

emphasizing that after changing the compound symmetry (the nonfluorinated aniline derivatives exhibit mirror plane molecular symmetry), both asymmetrical and symmetrical  $\nu\text{NH}$  bands can be distinguished. Moreover, the observed C-H $\cdots$ F HB in the crystal of **2b** (Fig. 2, Supp. Fig. 6) was represented in the spectrum as the  $\nu\text{CH}$  band shift towards higher wavenumbers ( $\Delta\nu \sim 20$   $\text{cm}^{-1}$  vs. **1b**; Fig. 7). This finding agrees with the literature, which states that hydrogen bonds engaging fluorine cause a shift towards higher wavenumbers.<sup>[50]</sup>

The Raman spectrum of difluorinated compound **3a** showed considerable background fluorescence and a low signal-to-noise ratio (S/N), which caused further interpretation to not be as straightforward as that for the other samples. For compound **3b**, the N-H...N HBs were slightly weaker than those for **2b** ( $E = -2.3, -2.6$  kcal/mol, respectively; Tab. 1), and a small shift ( $\Delta\nu = 9$  cm<sup>-1</sup> vs. **2b**) in the  $\nu_{\text{sym}}\text{N-H}$  band towards lower wavenumbers was observed (Fig. 7). Due to the high level of electron density anisotropy and the possibility of excitation and electron transition to other excitation states for iodine, the Raman spectrum for compound **3c** could not be obtained due to very intense fluorescence.

## Conclusion

The presented multiapproach investigation was undertaken to increase understanding of the fluorine substitution effect on hydrogen and halogen bonding as well as the formation of other noncovalent interactions. These effects have been studied for a series of 4-halogeno aniline derivatives, which were selected as a simple molecular model. This research is a continuation of our previously reported work,<sup>[31]</sup> which elucidated the perturbation effect on HB formation observed for aniline and its monofluorinated derivatives. These results showed that a single fluorine substituent decreases the strength and frequency of N-H...N HBs in comparison to aniline. This may be the direct reason that, despite the reported crystal structures, the previously studied monofluoroanilines are liquids under ambient conditions,<sup>[51]</sup> whereas here, the discussed *para*-halides (Cl, Br, and I derivatives of aniline) are in the solid, crystalline state (except for **2a**). This difference in the state of matter is related to the presence of a halogen substituent, which changes the molecular properties and enables crystal formation as well as structural stabilization by XB and HB interactions.

In this work, we obtained and characterized five new crystal structures of 4-X aniline derivatives (where X is Cl, Br, or I) and their 2-F and 2,6-di-F substituted analogs. In contrast to the results obtained for the monofluoroanilines, direct fluorine proximity to the amine group in 4-X anilines does not exhibit a withdrawing effect but instead increases the accessibility of the nitrogen lone pair. Thus, strong N-H...N HBs were observed for the majority of the reported structures (namely, **2b-c** and **3a-b**). For the nonfluorinated crystals, this type of hydrogen bond was recognized for only **1c**, whereas in the chloro and bromo derivatives (**1a** and **1b**, respectively), only weak N-H...X HB and X...Ct XB interactions were indicated. In the crystals **1a-c** and **2b-c**, predominant stabilization of the lattice was determined by strong and weak HBs engaging halogen substituents as acceptors and XB interactions with  $\pi$ -electron systems, in structures **3a-c**, 2,6-di-F substitution increases the importance of halogen-halogen contacts (e.g., Cl...F, Br...F or F...F for **3a**, **3b** and **3c**, respectively). Thus, in the difluorinated derivatives, the fluorine substituent becomes a competitive and attractive acceptor for HBs and XBs and increases the probability of halogen-halogen contacts.

An interesting and surprising observation based on the obtained results was made for the 4-I derivatives with higher single-molecule symmetry (**1c** and **3c**). The mentioned compounds stand out by intermolecular interaction formation in comparison to their 4-Cl and 4-Br analogs. Compound **1c**, as the

sole nonfluorinated 4-X aniline, is stabilized by strong N-H...N HBs, but I...I contacts were also observed. In the case of **3c**, the presence of symmetrically distributed fluorines (2,6-di-F) leads to the formation of strongly stabilizing F...F interactions and highly linear I...N XBs in contrast to compounds **3a** and **3b**, where N-H...N HBs and F...X XBs were observed. This result suggests that when considering substitution of lighter halogens (F, Cl, Br) by iodide, extra care must be taken, as the properties of the newly designed material or pharmaceutical agent cannot be easily predicted due to the peculiar behavior of I.

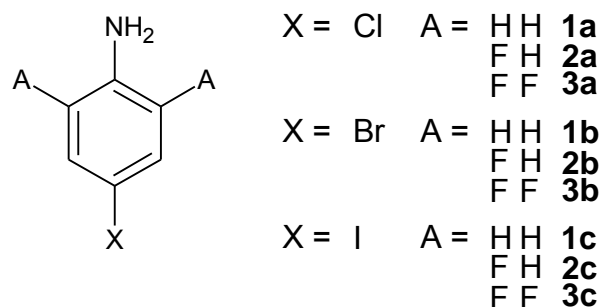
Vibrational spectroscopy allowed further exploration of the intermolecular contacts, with good correlation of the changes in the FT-IR and Raman spectra with individual interactions observed in the crystal structures. Despite many interactions engaging the NH group (N-H...N, N-H...X, N-H...F), the largest  $\nu_{\text{NH}}$  band displacement (50 cm<sup>-1</sup>) was associated with the appearance of a strong N-H...N HB, which mainly determines the position of the  $\nu_{\text{NH}}$  bands. Intramolecular N-H...F interactions led to the creation of additional NH bands in the FT-IR spectra and caused an increase in NH bond stability. Surprisingly, the obtained results suggest that hydrogen bonds with fluorine (as an acceptor) cause a shift towards higher wavenumbers of the donor bands. This upshift effect was unexpected and is controversial, but it is clearly indicated by both applied spectroscopic methods (IR and Raman). Due to the strong polarization of the C-F bond, the location of the  $\nu_{\text{CF}}$  band shows small changes in its position regardless of the fluorine-engaging interactions, and only the F...F contact in **3c** leads to splitting of the  $\nu_{\text{CF}}$  band.

Our previous results<sup>[31]</sup> along with those presented here show how the introduction of fluorine into a small molecular system can drastically modulate the tendency of other functional groups to form HBs and XBs. We think that the obtained data and derived conclusions can provide a deeper understanding of the tunability of intermolecular interactions by fluorine substituents. This, in consequence, can serve as a useful guide for rational drug/material design, leading to the accurate prediction of modification steps to improve the properties of newly designed compounds.

## Experimental Section

### Reagents

All studied compounds, with purities of approximately 98%, were purchased from Combi-Blocks (USA).



**Figure 8.** The general structure of all compounds used in this study.

### Spectroscopic measurements

Fourier transform infrared (FT-IR) spectra were measured using an FT-IR Nicolet™ iS™5 Thermo Scientific system using a single reflection zinc

selenide prism (ZnSe) to acquire spectra of the samples via the attenuated total reflection (ATR) method at room temperature. The FT-IR spectra of the samples were collected in the range of 4000–650  $\text{cm}^{-1}$ , and 32 scans were taken with a spectral resolution of 2  $\text{cm}^{-1}$ .

The Raman spectra were measured by employing a Bruker MultiRAM FT-Raman spectrometer using the macro TLC xyz stage in the range of 4000–50  $\text{cm}^{-1}$  with a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ , an excitation wavelength of 1064 nm, a laser power of 350 mW, and an accumulation of 100 scans. The baselines of all recorded spectra were subtracted by the asymmetric least squares smoothing method in Origin software.<sup>[52]</sup>

### Electrostatic surface potential

The electrostatic surface potential (ESP) was calculated using Gaussian G16<sup>[53]</sup> with Minnesota functional M06-2X-D3<sup>[54,55]</sup> and Karlsruhe basis set def2-TZVP.<sup>[56]</sup> The structures were previously optimized at the same level, using the polarizable continuum model (PCM)<sup>[57,58]</sup> in water.<sup>[57,58]</sup> Visualization of the results was carried out with GaussView 6.0.16.<sup>[59]</sup>

### Magnitude of the $\sigma$ -hole

MultiWFN<sup>[60,61]</sup> software was used to calculate the size of the  $\sigma$ -hole for the studied molecules. First, DFT<sup>[53]</sup> structure optimization was performed with the Gaussian 16 package at the M06-2X<sup>[54]</sup>/def2-QZVP<sup>[62]</sup> level of theory with the polarizable continuum model (PCM)<sup>[57,58]</sup> (solvent=water). The obtained wave functions (wfx files) were used to calculate the maximum electrostatic potential values over the isodensity surface with MultiWFN as an approach to quantifying the  $\sigma$ -holes.

### Crystallization, X-ray data collection, and crystal structure determination

Crystal structure analysis of the studied halogenated aniline derivatives was performed to investigate the intermolecular interaction

patterns in the crystalline state. The Cambridge Structural Database (CSD) was presearched to find previously determined structures. Data for **1a**, **1b**, and **1c** were found in this database (CLANIC05,<sup>[37]</sup> PBRANL01,<sup>[38]</sup> and EJAYET,<sup>[38]</sup> respectively), and were selected for further comparison. Irrespective of the reported data, we recrystallized and redetermined the structures of the abovementioned derivatives to confirm the possibility of alternative polymorphic lattice formation. However, the same crystal structures were obtained with nearly identical cell parameters and the same space group symmetry. These compounds, as well as their 2-F- and 2,6-di-F-substituted derivatives, were crystallized by the slow evaporation method from solution under ambient conditions.

X-ray diffraction data for suitable single crystals were collected using a XtalLAB Synergy-S four circle diffractometer (Rigaku - Oxford Diffraction) with a mirror monochromator and a microfocus dual radiation source (MoK $\alpha$   $\lambda$  = 0.7107 Å or CuK $\alpha$   $\lambda$  = 1.5418 Å). Additionally, the diffractometer was equipped with a CryoStream cryostat system allowing low-temperature experiments to be performed at 100(2) K. The obtained data sets were processed with CrysAlisPro software.<sup>[63]</sup> The phase problem was solved with direct methods using SIR2014.<sup>[64]</sup> The parameters of the obtained models were refined by full-matrix least-squares on  $F^2$  using SHELXL 2014/6.<sup>[65]</sup> Calculations were performed using the WinGX integrated system (ver. 2014.1).<sup>[66]</sup>

All nonhydrogen atoms were refined anisotropically. Hydrogen atoms attached to carbon atoms were positioned with the idealized geometry and refined using the riding model with isotropic displacement parameter  $U_{\text{iso}}[\text{H}] = 1.2U_{\text{eq}}[\text{C}]$ . The difference Fourier map was inspected to locate the hydrogens of the amine group. The crystal data and structure refinement results for the determined crystal structures are shown in Tab. 2.

**Table 2.** Crystal data and structure refinement results for determined crystal structures.

	2b	2c	3a	3b	3c
Empirical moiety formula	$\text{C}_6\text{H}_5\text{BrFN}$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{IFN}$	$\text{C}_6\text{H}_4\text{ClF}_2\text{N}$	$\text{C}_6\text{H}_4\text{BrF}_2\text{N}$	$\text{C}_6\text{H}_4\text{F}_2\text{IN}$
Formula weight [g/mol]	190.02	237.01	403.44	208.01	255.00
Radiation source	CuK $\alpha$	MoK $\alpha$	MoK $\alpha$	CuK $\alpha$	MoK $\alpha$
Crystal size [ $\text{mm}^3$ ]	0.3 × 0.3 × 0.1	0.2 × 0.1 × 0.05	0.2 × 0.1 × 0.1	0.2 × 0.05 × 0.01	0.1 × 0.07 × 0.03
Crystal system	Orthorhombic	Orthorhombic	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_1/n$	$P2_1/n$	$P2_1/n$
Unit cell dimensions	a = 5.4526(1) Å b = 8.8409(1) Å c = 13.3844(2) Å a = 90.0° b = 90.0° g = 90.0°	a = 5.4208(1) Å b = 9.1419(1) Å c = 13.9825(1) Å a = 90.0° b = 90.0° g = 90.0°	a = 12.0139(6) Å b = 3.7465(1) Å c = 14.2625(6) Å a = 90.0° b = 104.793(5)° g = 90.0°	a = 8.0548(1) Å b = 5.1837(1) Å c = 16.2476(2) Å a = 90.0° b = 104.258(1)° g = 90.0°	a = 4.8324(1) Å b = 14.4615(3) Å c = 9.9805(2) Å a = 90.0° b = 96.187(2)° g = 90.0°
Volume [Å <sup>3</sup> ]	645.207(17)	692.923(16)	620.68(5)	657.500(17)	693.41(2)
Z	4	4	4	4	4
$D_{\text{calc}}$ [ $\text{Mg/m}^3$ ]	1.956	2.272	1.750	2.101	2.443
$\mu$ [ $\text{mm}^{-1}$ ]	8.068	4.545	0.562	8.220	4.571
F(000)	368	440	328	400	472
$\Theta$ range	6.00° to 75.77°	2.66° to 26.61°	1.98° to 26.62°	5.62° to 76.59°	2.49° to 26.64°
Index ranges	-4 ≤ h ≤ 6, -10 ≤ k ≤ 11, -16 ≤ l ≤ 16	-6 ≤ h ≤ 6, -11 ≤ k ≤ 11, -17 ≤ l ≤ 16	-14 ≤ h ≤ 13, -4 ≤ k ≤ 3, -17 ≤ l ≤ 16	-9 ≤ h ≤ 10, -5 ≤ k ≤ 6, -18 ≤ l ≤ 20	-5 ≤ h ≤ 6, -18 ≤ k ≤ 17, -7 ≤ l ≤ 12
Refl. collected	5564	16709	4823	5659	6381
Independent reflections	1315 [R(int) = 0.0783]	1429 [R(int) = 0.1319]	1272 [R(int) = 0.0352]	1340 [R(int) = 0.0241]	1390 [R(int) = 0.0480]
Completeness [%]	100.0 ( $\Theta = 67.68^\circ$ )	100.0 ( $\Theta = 25.24^\circ$ )	99.9 ( $\Theta = 25.24^\circ$ )	100.0 ( $\Theta = 67.68^\circ$ )	99.9 ( $\Theta = 25.24^\circ$ )
Absorption correction	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan
$T_{\text{min}}$ and $T_{\text{max}}$	0.123 and 1.000	0.033 and 1.000	0.766 and 1.000	0.583 and 1.000	0.239 and 1.000
Data/restraints/parameters	1315/0/91	1429/0/79	1272/0/99	1340/0/99	1390/0/99
Goof on $F^2$	1.108	1.083	1.083	1.098	1.075
Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0.0452, wR2 = 0.1291	R1 = 0.0365, wR2 = 0.0935	R1 = 0.0302, wR2 = 0.0792	R1 = 0.0242, wR2 = 0.0673	R1 = 0.0245, wR2 = 0.0619
R indices (all data)	R1 = 0.0453, wR2 = 0.1293	R1 = 0.0370, wR2 = 0.0937	R1 = 0.0313, wR2 = 0.0805	R1 = 0.0247, wR2 = 0.0680	R1 = 0.0263, wR2 = 0.0629
$\Delta\rho_{\text{max}}$ and $\Delta\rho_{\text{min}}$ [ $\text{e}\cdot\text{Å}^{-3}$ ]	1.40 and -1.19	1.71 and -1.09	0.23 and -0.32	0.37 and -0.68	0.95 and -0.75



Additionally, the intermolecular interactions observed in the investigated crystal structures were studied by interpretation of Hirshfeld surfaces and their corresponding fingerprints. The Hirshfeld surfaces and 2D fingerprint plots were generated using Crystal Explorer<sup>[67]</sup> version 17.5 in the default mode. The X-ray single-crystal crystallographic information file (cif) of all presented halogeno aniline derivatives were used as input. Crystallographic data have been deposited in the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication nos. CCDC 2056284 (**2b**), CCDC 2056285 (**2c**), CCDC 2056287 (**3a**), CCDC 2056286 (**3b**) and CCDC 2056288 (**3c**). Copies of the data can be obtained free of charge via [www.ccdc.cam.ac.uk/structures](http://www.ccdc.cam.ac.uk/structures).

#### Nonbonding F...F contact statistics based on a Cambridge Structural Database (CSD) search

The nonbonding F...F contacts were statistically studied by searching CSD Version 5.41 (November 2019) with the ConQuest 2.0.5 program.<sup>[68,69]</sup> The searched fragment consisted additionally of carbon atoms covalently bound to F (C1-F...F-C2 fragment). Such fragment selection allowed us to define three studied geometrical parameters, namely, DIST1, which is defined as a F...F distance not longer than 2.9 Å to ensure that the vdW radii overlap and  $\alpha$  and  $\beta$  are the C1-F...F and F...F-C2 angles, respectively. This search was performed for only single crystal data of organic compounds with 3D coordinates available; organometallic structures were excluded. The search resulted in 5785 structures for which the distribution of the defined geometrical parameters was statistically studied. Histograms presenting the distribution of the selected parameter values, their frequencies and the calculated mean values are shown in the SI (Supp. Figs. 10 and 11). Additionally, the generated  $\alpha$  vs.  $\beta$  heat plot (Fig. 6) shows that the majority of the studied F...F contacts in the structures deposited within the CSD can be classified as type I according to the definition provided in Fig. 5.

#### The vibrational analysis

Vibrational analyses were performed for both isolated molecules (gas phase approach) and the crystal structure unit cell. In each case, the system was optimized, and theoretical FT-IR and Raman (excitation wavelength of 1064 nm) spectra were calculated using the M06-2X-D3 functional and def2svp basis set. The calculated theoretical spectra were multiplied by the scale factor (0.9855) to obtain the most accurate results.<sup>[70]</sup>

#### QTAIM calculation

The QTAIM (quantum theory of atoms in molecules)<sup>[71]</sup> calculations were performed for unit cell extracted from crystal structures of the aniline derivatives. Electron density topological analysis was carried out with the AIMAll program based on the electron density calculated with Gaussian G16 at the M06-2X-D3/def2svp level of theory. The energies of the noncovalent bonds detected in the crystal structures were calculated with the Espinosa equation:

$$E_{int} = \frac{1}{2} v(r)$$

where  $E_{int}$  is the energy of the interatomic interaction (a.u.) and  $v(r)$  is the kinetic energy at the bond critical point (BCP).<sup>[72]</sup>

#### Acknowledgements

This study was partially supported by the statutory funds of the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Cracow, Poland. Numerical simulations were performed by PLGrid Infrastructure (Prometheus, ACC Cyfronet, AGH). The Jagiellonian Center of Innovation is a partner of the Leading National Research Center (KNOW) supported by the Ministry of Science and Higher Education. WP acknowledges the support of InterDokMed project no. POWR.03.02.00-00-1013/16.




**Keywords:** nonbonding interactions • 4-halogeno anilines • fluorine substituent • hydrogen and halogen bonds • crystal structure analysis

- [1] N. A. Meanwell, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 5822–5880.
- [2] S. Melandri, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13901–13911.
- [3] C. Bissantz, B. Kuhn, M. Stahl, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5061–5084.
- [4] J. D. Dunitz, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 709–712.
- [5] A. Brown, P. D. Beer, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 8645–8658.
- [6] K. Fink, J. Boratyński, *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2014**, *68*, 1276–1286.
- [7] S. Swallow, in *Prog. Med. Chem.*, Elsevier B.V., United Kingdom, **2015**, pp. 65–133.
- [8] A. V. Vologzhanina, *Crystals* **2019**, *9*, 478.
- [9] G. Song, F. Bai, N. Xing, C. Chen, H. Shan, Y. Xing, *Chem. Res. Chinese Univ.* **2013**, *29*, 408–413.
- [10] T. Liang, C. N. Neumann, T. Ritter, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 8214–8264.
- [11] A. Abula, Z. Xu, Z. Zhu, C. Peng, Z. Chen, W. Zhu, H. A. Aisa, *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60*, 6242–6250.
- [12] P. Metrangolo, G. Resnati, *Halogen Bonding*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2008**.
- [13] A. Bauzá, D. Q. Onero, A. Frontera, *Molecules* **2017**, *23*, 18.
- [14] P. Varadwaj, A. Varadwaj, H. Marques, *Inorganics* **2019**, *7*, 40.
- [15] K. E. Riley, J. S. Murray, J. Fanfrlík, J. Řezáč, R. J. Solá, M. C. Concha, F. M. Ramos, P. Politzer, *J. Mol. Model.* **2011**, *17*, 3309–3318.
- [16] K. E. Riley, J. S. Murray, J. Fanfrlík, J. Řezáč, R. J. Solá, M. C. Concha, F. M. Ramos, P. Politzer, *J. Mol. Model.* **2013**, *19*, 4651–4659.
- [17] G. Cavallo, P. Metrangolo, R. Milani, T. Pilati, A. Priimagi, G. Resnati, G. Terraneo, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2478–2601.
- [18] M. Hernandez, S. M. Cavalcanti, D. R. Moreira, W. de Azevedo Junior, A. C. Leite, *Curr. Drug Targets* **2010**, *11*, 303–314.
- [19] R. Wilcken, M. O. Zimmermann, A. Lange, A. C. Joerger, F. M. Boeckler, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1363–1388.
- [20] S. Jiang, L. Zhang, D. Cui, Z. Yao, B. Gao, J. Lin, D. Wei, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34750.
- [21] C. Heroven, V. Georgi, G. K. Ganotra, P. Brennan, F. Wolfreys, R. C. Wade, A. E. Fernández-Montalván, A. Chaikuad, S. Knapp, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57*, 7220–7224.
- [22] J. A. K. Howard, V. J. Hoy, D. O'Hagan, G. T. Smith, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12613–12622.
- [23] J. D. Dunitz, R. Taylor, *Chem. - A Eur. J.* **1997**, *3*, 89–98.
- [24] G. Kaur, S. Singh, A. Sreekumar, A. R. Choudhury, *J. Mol. Struct.* **2016**, *1106*, 154–169.
- [25] H.-J. Schneider, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1381.
- [26] R. Taylor, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **2017**, *73*, 474–488.
- [27] D. Chopra, T. N. G. Row, *CrystEngComm* **2011**, *13*, 2175–

- 2186.
- [28] S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 320–330.
- [29] P. Wojciechowski, K. Helios, D. Michalska, *Vib. Spectrosc.* **2011**, *57*, 126–134.
- [30] Z. Xu, Z. Yang, Y. Liu, Y. Lu, K. Chen, W. Zhu, *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 69–78.
- [31] W. Pietruś, R. Kurczab, R. Kafel, E. Machalska, J. Kalinowska-Tłuścik, A. Hogendorf, M. Żylewski, M. Baranska, A. J. Bojarski, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, 119536.
- [32] G. Caballero-García, M. Romero-Ortega, J. Barroso-Flores, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 27300–27307.
- [33] M. H. Kolář, P. Hobza, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 5155–5187.
- [34] M. H. Kolář, P. Deepa, H. Ajani, A. Pecina, P. Hobza, *Top. Curr. Chem.* **2014**, 1–25.
- [35] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, **2001**.
- [36] P. Zhou, J. Zou, F. Tian, Z. Shang, *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 2344–2355.
- [37] H. Takazawa, S. Ohba, Y. Saito, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* **1989**, *45*, 432–437.
- [38] A. Dey, R. K. R. Jetti, R. Boese, G. R. Desiraju, *CrystEngComm* **2003**, *5*, 248.
- [39] G. Desiraju, T. Steiner, *The Weak Hydrogen Bond*, Oxford University Press, **2001**.
- [40] F. Bertolotti, A. V. Shishkina, A. Forni, G. Gervasio, A. I. Stash, V. G. Tsirelson, *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14*, 3587–3595.
- [41] M. Barceló-Oliver, C. Estarellas, A. García-Raso, A. Terrón, A. Frontera, D. Quiñonero, E. Molins, P. M. Deyà, *CrystEngComm* **2010**, *12*, 362–365.
- [42] R. Berger, G. Resnati, P. Metrangolo, E. Weber, J. Hulliger, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3496.
- [43] G. R. Desiraju, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 565–573.
- [44] D. O'Hagan, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 308–319.
- [45] A. Bondi, *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 441–451.
- [46] R. J. Baker, P. E. Colavita, D. M. Murphy, J. A. Platts, J. D. Wallis, *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 1435–1444.
- [47] C. Greve, E. T. J. Nibbering, H. Fidder, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 15843–15855.
- [48] J. C. Evans, *Spectrochim. Acta* **1960**, *16*, 428–442.
- [49] Y.-Y. Zhu, H.-P. Yi, C. Li, X.-K. Jiang, Z.-T. Li, *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 1294–1300.
- [50] G. Zhang, W. He, D. Chen, *Mol. Phys.* **2014**, *112*, 1736–1744.
- [51] D. Chopra, V. Thiruvengadam, T. N. G. Row, *Cryst. Growth Des.* **2006**, *6*, 843–845.
- [52] Origin(Pro), *Version 2019*. OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.
- [53] D. J. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratch, *Gaussian 16, Revis. A.03* **2016**.
- [54] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241.
- [55] Y.-S. Lin, G.-D. Li, S.-P. Mao, J.-D. Chai, *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 263–272.
- [56] B. P. Pritchard, D. Altarawy, B. Didier, T. D. Gibson, T. L. Windus, *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59*, 4814–4820.
- [57] B. Mennucci, R. Cammi, J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 6858–6870.
- [58] S. Miertuš, E. Scrocco, J. Tomasi, *Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117–129.
- [59] R. Dennington, T. Keith, J. Milliam, “GaussView, Version 5.0, Semichem Inc. Shawnee Mission KS,” **2009**.
- [60] T. Lu, F. Chen, *J. Mol. Graph. Model.* **2012**, *38*, 314–323.
- [61] T. Lu, F. Chen, *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 580–592.
- [62] F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3297.
- [63] CrysAlisPRO, Oxford Diffraction /Agilent Technologies UK Ltd, Yarnton, England.
- [64] M. C. Burla, R. Caliandro, B. Carrozzini, G. L. Casciarano, C. Cuocci, C. Giacovazzo, M. Mallamo, A. Mazzone, G. Polidori, *J. Appl. Crystallogr.* **2015**, *48*, 306–309.
- [65] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **2008**, *64*, 112–122.
- [66] L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **2012**, *45*, 849–854.
- [67] M. A. Spackman, D. Jayatilaka, *CrystEngComm* **2009**, *11*, 19–32.
- [68] C. R. Groom, I. J. Bruno, M. P. Lightfoot, S. C. Ward, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **2016**, *72*, 171–179.
- [69] I. J. Bruno, J. C. Cole, P. R. Edgington, M. Kessler, C. F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson, R. Taylor, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* **2002**, *58*, 389–397.
- [70] M. K. Kesharwani, B. Brauer, J. M. L. Martin, *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 1701–1714.
- [71] R. F. W. Bader, R. F. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Clarendon Press, **1994**.
- [72] E. Espinosa, E. Molins, C. Lecomte, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *285*, 170–173.

## Article

# Hydrogen Bonds with Fluorine in Ligand–Protein Complexes—the PDB Analysis and Energy Calculations

Wojciech Pietruś , Rafał Kafel, Andrzej J. Bojarski  and Rafał Kurczab \* 

Department of Medicinal Chemistry, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Smetna 12, 31-343 Krakow, Poland; pietrus@if-pan.krakow.pl (W.P.); rafal.kafel@gmail.com (R.K.); bojarski@if-pan.krakow.pl (A.J.B.)

\* Correspondence: kurczab@if-pan.krakow.pl; Tel.: +48-126-62-3301

**Abstract:** Fluorine is a common substituent in medicinal chemistry and is found in up to 50% of the most profitable drugs. In this study, a statistical analysis of the nature, geometry, and frequency of hydrogen bonds (HBs) formed between the aromatic and aliphatic C–F groups of small molecules and biological targets found in the Protein Data Bank (PDB) repository was presented. Interaction energies were calculated for those complexes using three different approaches. The obtained results indicated that the interaction energy of F-containing HBs is determined by the donor–acceptor distance and not by the angles. Moreover, no significant relationship between the energies of HBs with fluorine and the donor type was found, implying that fluorine is a weak HB acceptor for all types of HB donors. However, the statistical analysis of the PDB repository revealed that the most populated geometric parameters of HBs did not match the calculated energetic optima. In a nutshell, HBs containing fluorine are forced to form due to the stronger ligand–receptor neighboring interactions, which make fluorine the “donor’s last resort”.

**Keywords:** fluorine; PDB; hydrogen bonds; HBs



**Citation:** Pietruś, W.; Kafel, R.; Bojarski, A.J.; Kurczab, R. Hydrogen Bonds with Fluorine in Ligand–Protein Complexes—the PDB Analysis and Energy Calculations. *Molecules* **2022**, *27*, 1005. <https://doi.org/10.3390/molecules27031005>

Academic Editor: Miroslaw Jablonski

Received: 30 December 2021

Accepted: 29 January 2022

Published: 2 February 2022

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



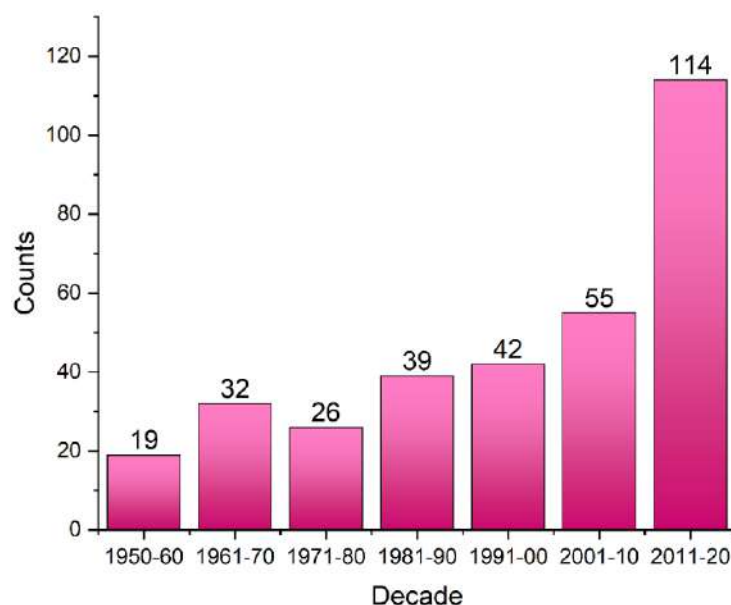
**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Fluorine is the most electronegative element, and this property has a significant impact on the bioavailability, lipophilicity, metabolic stability, acidity/basicity, and toxicity [1]. Since the second half of the 20th century [2], researchers have been exploring the possibility of using fluorinated molecules in medicine [1,3]. The important position of fluorinated molecules in medicinal chemistry can be understood by the exceptionally large number of fluorine-containing drugs currently available on the pharmaceutical market (Figure 1). The share of fluorinated compounds rose from 2% in 1970 to 8% in 1980, 13% in 1990, and reached 18% at the beginning of the 21st century. Among them, six products were in the “top-12” list and employed as anticancer, anti-inflammatory, analgesic, or antidepressant agents in medicine [4]. About 20% of the drugs used in 2010 contained fluorine atom(s) or fluoroalkyl group(s) [3], whereas in the last decade (2011–2020) 114 out of the 410 drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA) (data from the Center for Drug Evaluation and Research (CDER)) [5] contained fluorine (Figure 1). Currently, fluorinated pharmaceuticals account for over 50% of the most profitable drugs (blockbuster drugs), and are also recognized as the best among the drugs used in almost all therapeutic areas [6].

The biological activity of drugs is determined by intermolecular interactions. These interactions also play an important role in stabilizing the ligand–biomolecule system. Hydrogen bonds (HBs), in particular, are considered to significantly influence the action of drug molecules on their targets [7–9]. Interestingly, fluorine or substituents containing this element have been shown to tune the intermolecular interactions in ligand–protein complexes [1,10]. Although characterized by high electronegativity, fluorine is a weak acceptor of HBs and, unlike other halogens, it is not a halogen bond (XB) donor in aromatic

systems [11,12]. However, the results of our previous study on small model systems (e.g., 2,6-difluoro-4-halogenoanilines) indicated that fluorine can act as a competitive and attractive acceptor for HBs and XBs as well as form F...F interactions [13]. Additionally, it is considered that fluorine-containing HBs are not typical and do not behave like conventional HBs (e.g., O...H-O and N...H-N), as demonstrated by a more angular nature and preference for less electronegative donors [14].



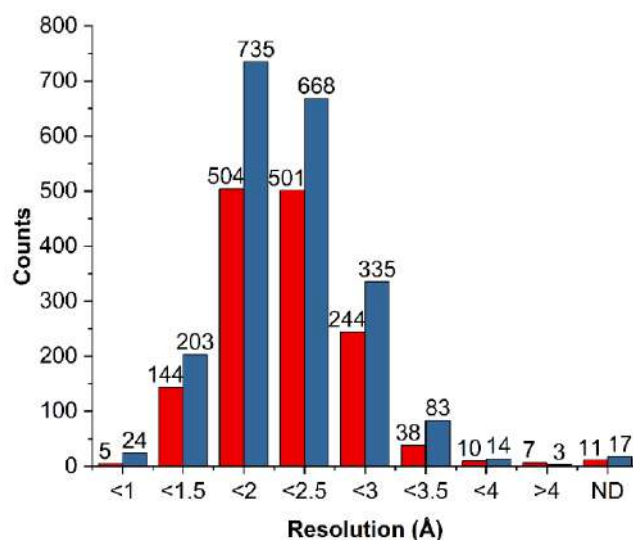
**Figure 1.** Number of marketed drugs containing fluorine per decade. Data were collected from the DrugCentral 2021 database (accessed 30 April 2021).

The biological activity of compounds can be tuned with the use of fluorine. However, there are no rules of thumb for predicting the preferred fluorine substitution sites in a molecule. Despite numerous studies on fluorine, the influence of this element on the pharmacodynamics properties of drugs remains unclear. A statistical analysis of the nature, geometry, and frequency of interactions occurring between fluorine in small molecules and the biological targets included in the Protein Data Bank (PDB) repository may allow understanding of the role of fluorine in ligand–receptor (L–R) complexes. Therefore, we carried out a wide statistical analysis and calculations to quantitatively and qualitatively explore the HBs (contacts) formed with fluorine in biological systems. The findings of this study may contribute to a thorough understanding of the effects of fluorine, to enable its rational use in drug design and for improving the efficiency of computational methods [15,16].

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Choice of a Model System

We carefully chose the model systems used for database mining and quantum chemical calculations, with a focus on providing accurate representations of HBs with fluorine in the biological systems. Three types of HB donors were distinguished, namely hydroxyl, amine, and methyl group, and a pH of  $7.4 \pm 0.5$  was considered to assess the protonation states of all entities. We extracted a ligand with interacting residue for performing high-level quantum chemical calculations in a reasonable time. This allowed us to determine the energy of isolated interaction with fluorine. For extracted amino acids from the main chain, the peptization reaction was reversed. Therefore, to maintain the proper structure of amino acids, missing atoms (hydroxyl to carboxylic group and hydrogen to nitrogen atom) were added and optimized with force field. Since 96% of the analyzed crystal structures were recorded with a resolution of  $<3 \text{ \AA}$  (Figure 2), we analyzed all the collected structures.



**Figure 2.** Statistical representation of the spectral resolution of the analyzed crystal structures deposited in the PDB database for L–R complexes with HB containing aliphatic fluorine (red bars) and aromatic fluorine (blue bars). “ND” (not determined) refers to the crystal structures obtained with the methods for which resolution was not specified (e.g., nuclear magnetic resonance).

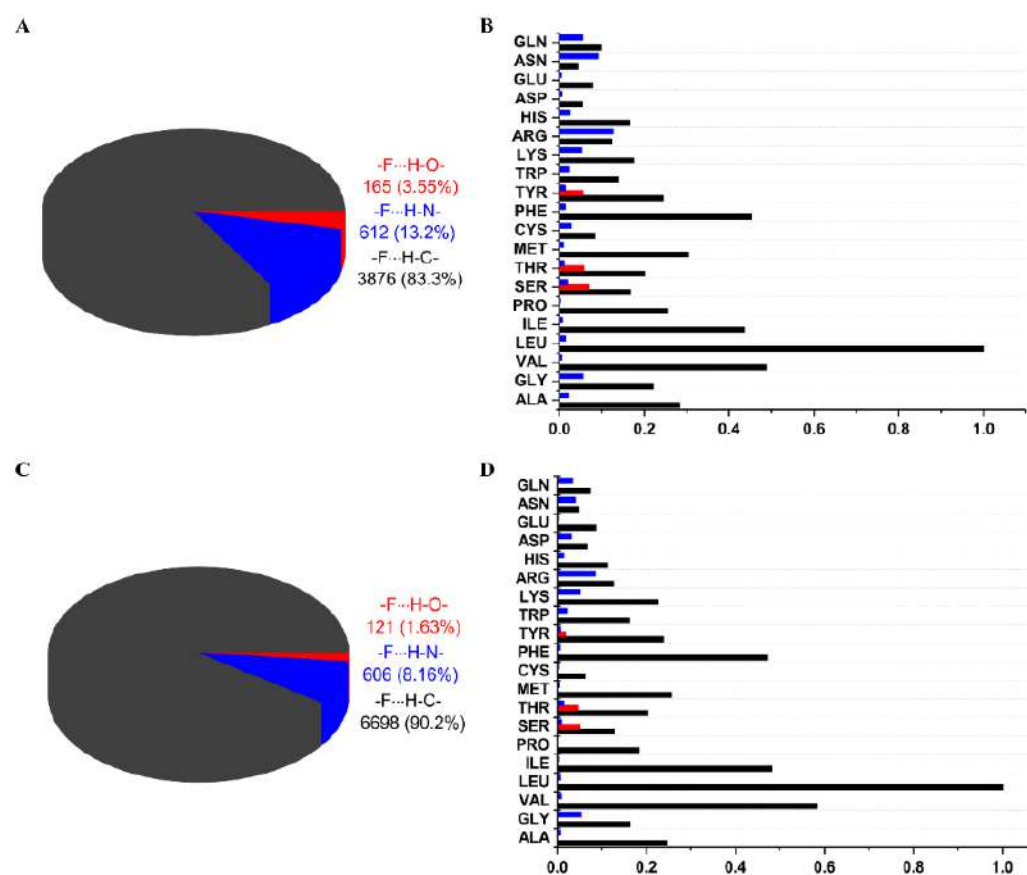
## 2.2. General Statistics of HBs Containing Fluorine Atoms

It should be emphasized that the thresholds of HB geometric parameters considered in the statistical investigation based on the PDB data can significantly influence the results and conclusion. In this study, we assumed that the HB distance was  $<4\text{Å}$  and the HB angle was  $90^\circ$ – $180^\circ$ . Because we aimed to determine all contacts with fluorine atoms, these values can significantly exceed the standard geometric parameters of HBs; the distance can be below the sum of the van der Waals radii of interacting atoms, and the angle can differ by up to  $120^\circ$ . Complexes containing ligands with fluorine (from the LigandExpo repository) were extracted and analyzed. If the PDB entry contained more than one asymmetric unit (receptor oligomerization), the number of HBs with fluorine was multiplied by the number of occurrences of the same ligand. All measured HBs were used in further analysis, even if they came from the same PDB entry. The ligands were divided into two categories: molecules in which fluorine is bonded to an aliphatic carbon ( $F_{al}$ ) and molecules containing fluorine bonded to an aromatic carbon ( $F_{ar}$ ).

A total of 1787 ( $F_{al}$ ) and 2324 ( $F_{ar}$ ) unique PDB entries were found for fluorine-containing ligands. Based on the assigned boundaries and defined geometric thresholds, 165 interactions with a hydroxyl group, 612 with an amine group, and 3875 with a methyl group were identified for aliphatic fluorine (Figure 3A); and 121 interactions with a hydroxyl group, 606 with an amine group, and 6698 with H–C were identified for aromatic fluorine (Figure 3C). The number of  $F \cdots H-O$  and  $F \cdots H-N$  HBs was found to be larger for  $F_{al}$ , whereas the number of  $F \cdots H-C$  HBs was two-fold higher for  $F_{ar}$ . For OH donors, three amino acids (SER, THR, TYR) were identified to be involved in HBs with  $F_{al}$ ; however, for  $F_{ar}$ , it appeared that TYR participates less frequently in HBs, which may be attributed to the greater acidity of the OH group.

The more significant differences were observed for NH donors, in which the amino acids commonly involved in HBs with  $F_{al}$  were in the order ARG>ASN>GLN>GLY>LYS (Figure 3B) and in HBs with  $F_{ar}$  were in the order ARG>GLY>LYS>GLN>ASN (Figure 3D). Surprisingly, glycine is the second most common amino acid, forming HBs with  $F_{ar}$  because the others are polar amino acids with a free amino group in their side chain.

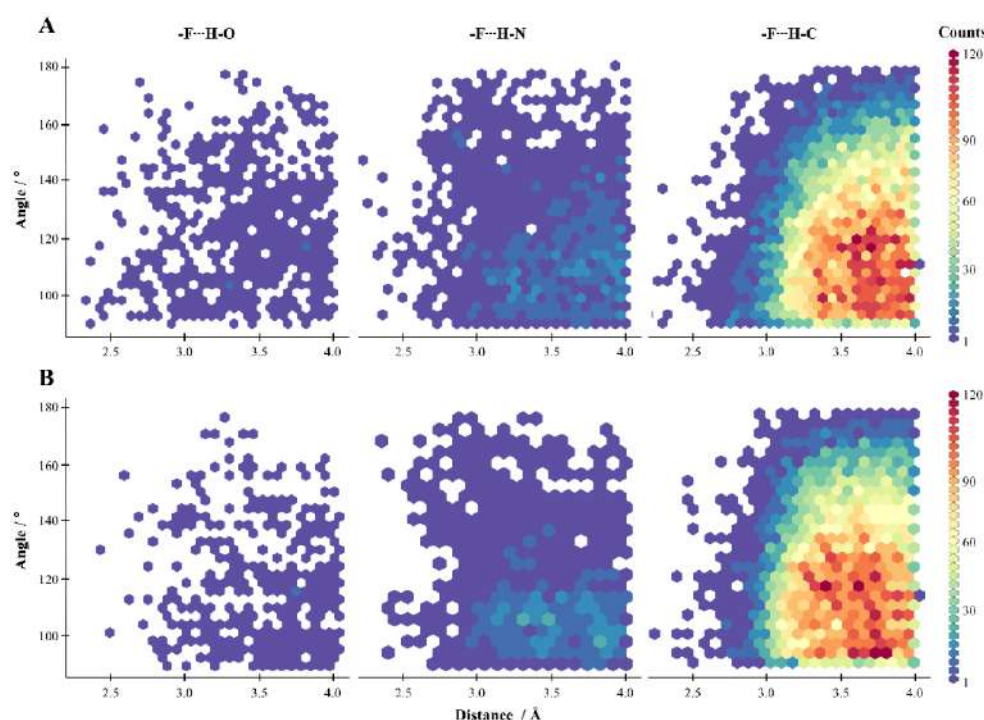
By contrast, no clear preferences of amino acids in the occurrence of HBs with  $F_{al}$  and  $F_{ar}$  were observed in the case of CH donors. However, the results highlighted that fluorine most frequently forms HBs with nonpolar amino acids (LEU, VAL, PHE, ILE, ALA), implying that it prefers hydrophobic areas of binding pockets (Figure 3B,D).



**Figure 3.** Number of hydrogen bonds found in the PDB repository to meet the boundaries for geometric parameters: (A) between  $F_{al}$  and OH, NH, and CH donors; (B) normalized division into interacting amino acids; (C) between  $F_{ar}$  and OH, NH, and CH donors; and (D) normalized division into interacting amino acids.

Based on this classification, we generated the density maps showing the geometric parameters of HBs (Figure 4). As only a small number of  $F \cdots H-O$  HBs were identified, certain conclusions could not be drawn (Figure 4). The density maps of HB geometric parameters obtained for the NH and CH donors (as well as OH) revealed that fluorine prefers geometries with a distance of  $>3 \text{ \AA}$  and an angle of  $100^\circ$ – $140^\circ$  (Figure 4). However, it should be noted that more HBs were found for NH than OH donors, with a more linear geometry and short distances, but in many cases, those interactions are forced by the neighboring functional groups of a ligand interacting with amino acids.

In summary, fluorine-containing HBs reveal more angular geometric preferences than typical HBs (rather linear HBs  $O \cdots H-O$ ,  $N \cdots H-N$ ). Thus, in the next step, we explored the relationship between the geometry of  $F \cdots H-X$  ( $X = O, N, C$ ) bond and the energy contribution to the ligand–receptor complexes.



**Figure 4.** Density maps of geometric parameters of HBs with (A)  $F_{al}$  and (B)  $F_{ar}$ .

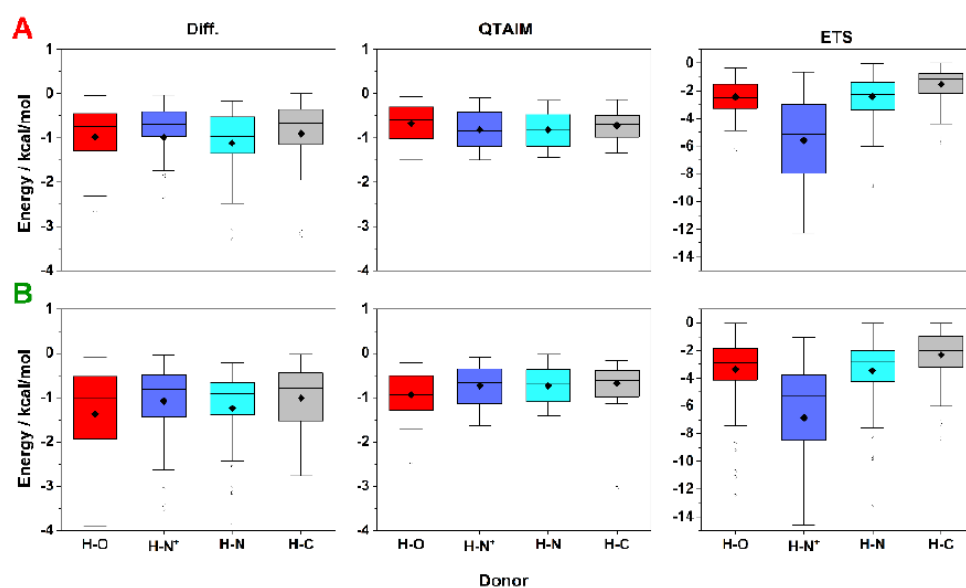
### 2.3. Energy of HBs with Fluorine

Ligand–receptor complexes are stabilized by various intermolecular forces, such as strong HBs ( $O\cdots H-O$ ,  $N\cdots H-O$ ,  $N\cdots H-N$ ), weak HBs ( $O\cdots H-C$ ,  $S\cdots H-N$ ), XBs,  $\pi$ -stacking, salt bridge, amide stacking, cation- $\pi$ , and hydrophobic interactions and others [17]. Fluorine-containing HBs, especially those with hydroxyl and amine donors, are not common in biological systems (Figures 3 and 4). Therefore, it is important to determine the strength and geometric preferences of these HBs in biological systems. In this study, we attempted to evaluate the nature and energetic dependencies of HBs with fluorine in the theoretical background by performing quantum chemical calculations using small molecular systems extracted from ligand–biomolecule crystals ( $O-H$ ,  $N-H$ ,  $+N-H$ , and  $C-H$  were only considered to be HB donors). We determined the energy of HBs with fluorine found in crystal structures by applying three different methods as follows: (1) Diff—energy was calculated as the difference between the energy of the interacting molecules and the sum of the energies of isolated species calculated in Gaussian; (2) QTAIM—energy was calculated at BCP in AIMAll software; and (3) ETS—energy was calculated between two interacting molecules using the ETS-NOCV scheme implemented in ADF software.

At first, a simple statistical analysis was performed on the data obtained from the three approaches using the correlation coefficient and Pearson test in R (Supplementary Tables S1 and S2). The results of the analysis indicated the highest correlation between Diff and ETS methods ( $p < 0.05$ , correlation coefficient  $\sim 1$ ) because they consider the energy of the entire system and approximately 70% of the calculated energy accounts for the same nature of interaction (attractive/repulsive). Additionally, the correlation decreased for stronger interactions (Supplementary Tables S1 and S2) due to the fact that the Diff method is intended for weak and medium HBs; strong HBs result in geometry distortion of the interacting molecules, which decreases the accuracy of the evaluation of the HB itself [18]. The energies of HBs calculated by QTAIM did not correlate with those determined by the remaining methods, since this method takes only isolated L–R interaction and neglects long-range interactions occurring between the atoms from separated fragments.

The distribution of calculated interaction energies for all selected complexes for a given type of HB with fluorine and method is illustrated in Figure 5. For HBs with  $F_{al}$ , the interaction energy calculated by QTAIM varied between 0 and  $-1.2$  kcal/mol (the

weakest HBs were found for  $F_{al} \cdots H-O$ , with an energy value of  $-0.64$  kcal/mol). For  $F_{al} \cdots H-C$  HBs, the energy was  $(-0.69$  kcal/mol). The strongest HBs ( $\sim -0.8$  kcal/mol) were observed for  $F_{al} \cdots H-N$  (no significant difference was noted between  $F_{al} \cdots H-N$  HB and  $F_{ar} \cdots H-N^+$  HB) (Figure 5A). The energy range determined by the Diff method was also between 0 and  $-1.2$  kcal/mol, while the energy determined by the ETS method ranged from 0 to  $-8$  kcal/mol (Figure 5A). Additionally, the Diff method indicated that the charge-assisted  $F_{al} \cdots H-N^+$  was the weakest HB ( $-0.70$  kcal/mol), while  $F_{al} \cdots H-N$  HB was stronger ( $-0.96$  kcal/mol). Unlike Diff, the results of the ETS method showed that the charge-assisted  $F_{al} \cdots H-N^+$  HB was the stronger ( $-5.11$  kcal/mol), while  $F_{al} \cdots H-N$  HBs were weaker than  $F_{al} \cdots H-O$  HBs ( $-2.28$  and  $-2.46$  kcal/mol, respectively) (Figure 5A). For HBs with  $F_{ar}$ , a different trend was noted in the QTAIM method than for HBs with  $F_{al}$ , where the strongest HBs had OH as a donor ( $-0.94$  kcal/mol). The  $F_{ar} \cdots H-N$  HBs were found to be slightly weaker with median energy values of  $\sim -0.7$  kcal/mol (for  $^+NH$  and  $NH$  donors), and the weakest was  $F_{ar} \cdots H-C$  HB ( $-0.62$  kcal/mol) (Figure 5B). A comparison of Diff and ETS methods revealed a similar trend as in the case of  $F_{al}$ —the Diff method indicated that the  $F_{ar} \cdots H-N^+$  HB was the weakest ( $-0.8$  kcal/mol), while the ETS method indicated it as the strongest interaction ( $-5.3$  kcal/mol) (Figure 5B). The QTAIM method showed that  $F \cdots H-O$  HBs with  $F_{ar}$  were stronger than those with  $F_{al}$ , while HBs with other donors were found at a similar energy level. However, it should be emphasized that both Diff and ETS methods revealed higher stabilization energy for HBs with  $F_{ar}$  compared to HBs with  $F_{al}$ .

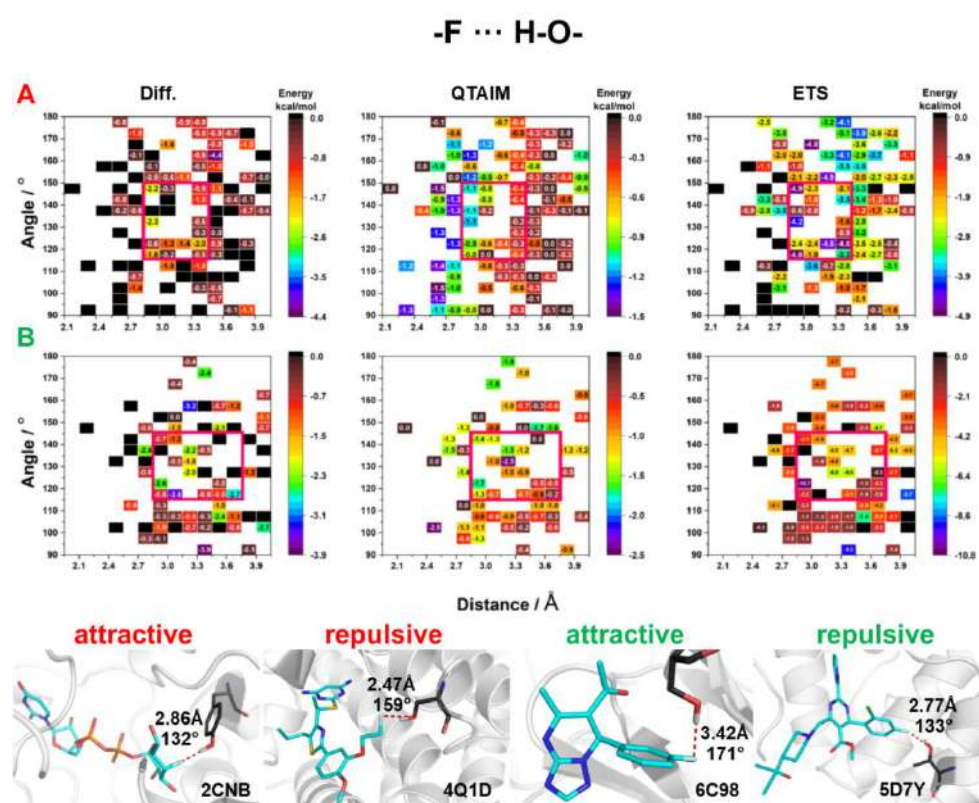


**Figure 5.** Box plots showing the distribution of the stabilization energy for HBs containing fluorine bonded to an (A) aliphatic or (B) aromatic carbon. A comparison is made for the individual donor groups (OH,  $^+NH$ , NH, and CH) as well as the calculation approaches used (Diff, QTAIM, and ETS).

The hydroxyl donor occurs in the side chains of three amino acid—tyrosine (TYR), threonine (THR), and serine (SER). The phenolic hydroxyl group (TYR) is significantly more acidic ( $pK_a$  of about 9.8 in polypeptides) than the aliphatic hydroxyl group (SER or THR,  $pK_a \sim 13.6$ ) [19]. In addition, Graton et al. found in an analysis of the PDB repository that the distances and angle of HBs with a hydroxyl group decreased in the order  $THR > SER > TYR$ , which suggests that TYR forms the stronger HBs [20]. In the present study, the results obtained by the QTAIM method revealed that for  $F_{al}$  (Figure 6A), the energy of HBs does not depend on the  $F \cdots H-O$  angle, as the highest values were observed in the whole range of the analyzed angles. Instead, the energy of  $F_{al} \cdots H-O$  HBs closely correlated with the distance, as observed in the case of conventional hydrogen bonding. It should be mentioned that the QTAIM method showed higher energy for  $F \cdots H-O$  HBs



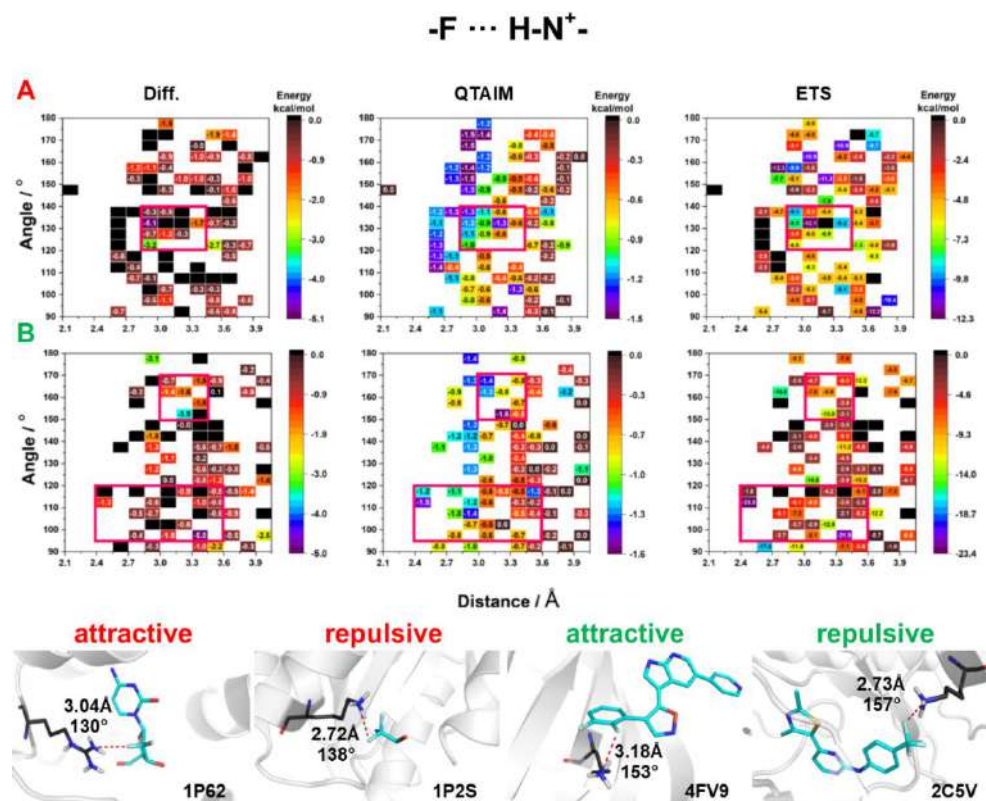
with aromatic fluorine than for HBs with aliphatic fluorine (Figure 6). Most of the  $F \cdots H-O$  HBs with distances shorter than 2.75 Å are repulsive (Figure 6), which shows that despite the stabilizing nature of the  $F \cdots H-O$  HB itself, the interacting fragments have a positive energy contribution (repulsive character). This effect may be due to the interaction of the neighboring atoms, or high positive kinetic energy. All three methods showed that the highest stabilizing energies (red squares in Figure 6) were in the range of 2.85–3.45 Å (for both fluorine) and  $150^\circ$ – $120^\circ$  for  $F_{al}$  and  $145^\circ$ – $120^\circ$  for  $F_{ar}$ , suggesting that these are the optimal ranges of geometric parameters for  $F \cdots H-O$  HBs. The analysis of the selected crystal structures did not show any significant differences between the  $F \cdots H-O$  HBs of attractive and repulsive nature. The only differentiating factor identified was the  $F \cdots O$  distance (Figure 6).



**Figure 6.** HB energy maps generated based on Diff, QTAIM, and ETS calculations of interaction energy between OH donor and fluorine attached to (A) an aliphatic fragment and (B) an aromatic ring for specific geometric parameters. The areas for which the highest stabilizing energy was observed in all three methods are marked with a red square.

Among amino acids, three (ARG, LYS, HIS) have additional amino groups. The side chain of arginine (ARG) is amphipathic because at physiological pH it contains a positively charged guanidine group ( $pK_a = 12.48$ ). Another amphipathic amino acid is lysine (LYS), the side chain of which contains a positively charged primary amine group at the end of the long hydrophobic carbon tail ( $pK_a = 10.53$ ). Histidine (HIS) contains an imidazole side chain. His  $pK_a$  is 6, above which one of the two protons is missing (in physiological pH, histidine has two tautomers). Since it is difficult to automatically protonate the appropriate nitrogen atom of histidine which forms an  $F \cdots H-N^+$  HB, we calculated the energy of  $F \cdots H-N^+$  HB only for LYS and ARG (Figure 7). The QTAIM calculations showed that the energy of  $F_{al} \cdots H-N^+$  and  $F_{al} \cdots H-O$  HBs was similar. Additionally,  $F \cdots H-N^+$  was found to be strongly influenced by the distance between  $F \cdots N$  and not by the angle (Figure 7) (as noticed for  $F \cdots H-O$  HBs). A similar trend for both aliphatic and aromatic F was observed for  $F \cdots H-N^+$  HBs, but the highest interaction energy was mostly localized at higher values of the  $F_{ar} \cdots H-N^+$  angle (Figure 7). For aliphatic fluorine, the range of geometric parameters

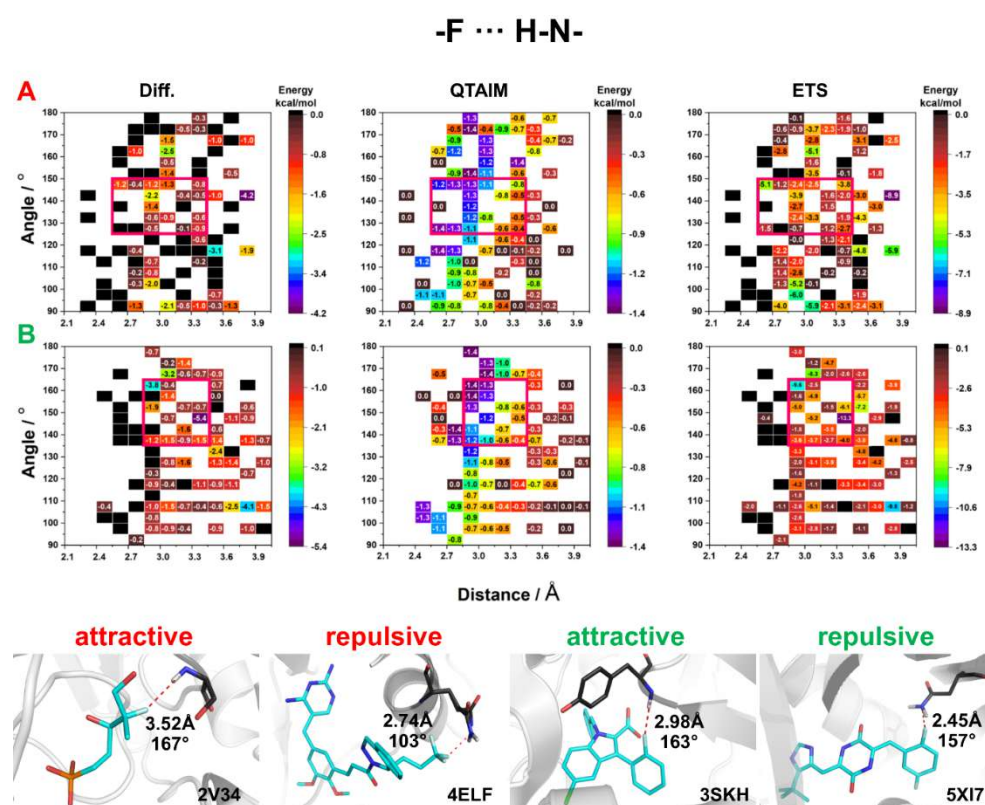
in which the three methods indicated the strongest  $F_{al}\cdots H-N^+$  HBs was  $140^\circ$ – $120^\circ$  and  $2.85$ – $3.45$  Å (as for  $F\cdots H-O$  HB). In the case of  $F_{ar}$ , two ranges of geometric parameters were distinguished: (1)  $170^\circ$ – $150^\circ$  and  $3.0$ – $3.6$  Å; and (2)  $<120^\circ$  and  $2.4$ – $3.6$  Å. Due to its large volume, the guanidine group interacts not only with fluorine directly but also with neighboring atoms. Therefore, the energy calculated by Diff and ETS methods might be overestimated.



**Figure 7.** HB energy maps generated based on Diff, QTAIM, and ETS calculations of interaction energy between positively charged NH donor and fluorine attached to (A) an aliphatic fragment and (B) an aromatic ring for specific geometric parameters. The areas for which the highest stabilizing energy was observed in all three methods are marked with a red square.

Interestingly, the analysis of crystal structures with  $F\cdots H-N^+$  HBs showed that for  $F\cdots N^+$  distances of  $<2.8$  Å, almost 70% of HBs exhibited a destabilizing character. Moreover, the interaction of positively charged nitrogen with the  $CF_3$  group, with a partial positive charge on the carbon atom, is often repulsive (Figure 7).

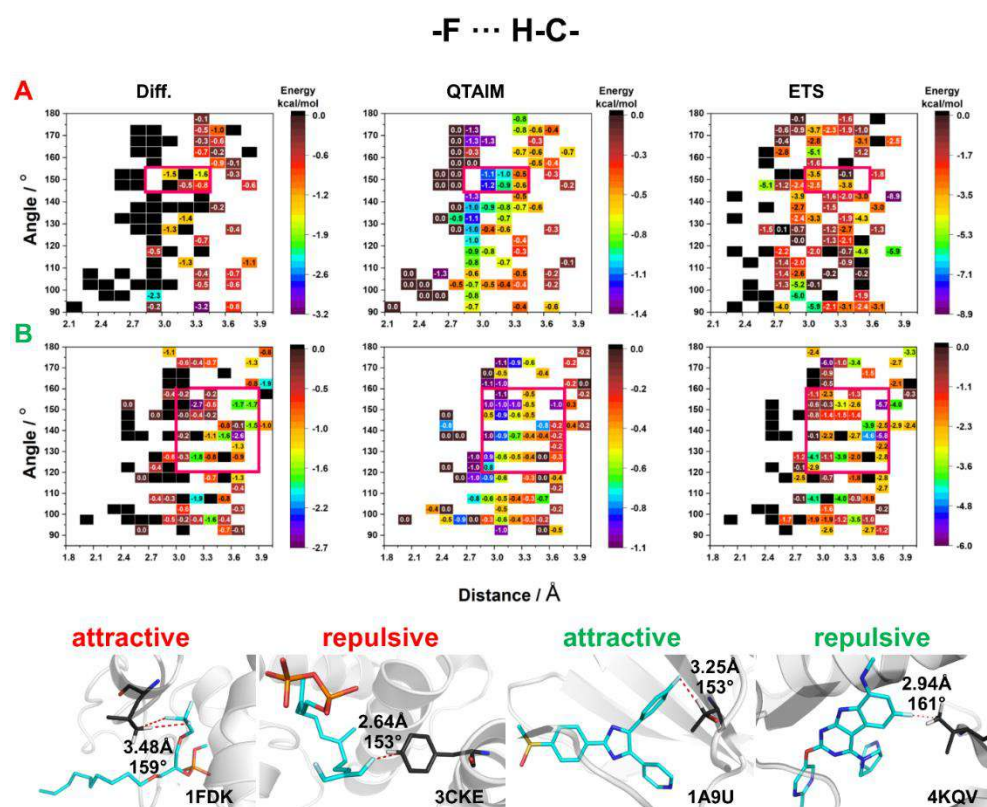
The  $F\cdots H-N$  HBs were found almost four times more frequently in PDB than  $F\cdots H-O$  HBs (Figures 3 and 4). The energies of  $F\cdots H-N$  HBs were calculated for all amino acids, except for arginine and lysine as these amino acids contain positively charged nitrogen atoms. Furthermore, whether the nitrogen atom was in the main chain or the side chains (ASN, GLN) was not considered in the analysis. The energies of  $F\cdots H-N$  HBs determined by the QTAIM method showed no significant differences between  $F_{al}$  and  $F_{ar}$ . In addition, it must be noted that energy is inversely proportional to the HB distance and does not depend on the  $F\cdots H-N$  angle (Figure 8). However, since the nitrogen atom was mostly present in the main chain, and was thus adjacent to different atoms, the energies calculated by Diff and ETS methods mostly had a destabilizing nature, which might be due to steric effects. On the other hand, for  $F_{al}$ , the areas where the energies were found to be high and exhibited a stabilizing character had a narrow range of  $150^\circ$ – $125^\circ$  and  $2.4$ – $3.45$  Å, while for  $F_{ar}$  the areas were within the range of geometric parameters ( $165^\circ$ – $135^\circ$  and  $2.85$ – $3.75$  Å) (Figure 8). The analysis of selected crystal structures showed no significant differences between the systems with attractive energy and repulsive energy (Figure 8).



**Figure 8.** HB energy maps generated based on Diff, QTAIM, and ETS calculations of interaction energy between NH donor and fluorine attached to (A) an aliphatic fragment and (B) an aromatic ring for specific geometric parameters. The areas for which the highest stabilizing energy was observed in all three methods are marked with a red square.

The  $F \cdots H-C$  HBs were found to be the most abundant in biological systems (Figures 3 and 4). The interaction energies calculated by the QTAIM method showed that  $F_{al} \cdots H-C$  HBs are stronger than  $F_{ar} \cdots H-C$  HBs. In addition, the interactions with an HB distance of  $<2.7$  Å showed a destabilizing character (Figure 9). The results produced by Diff and ETS methods were quite divergent, and it is difficult to find any constant trend. Interestingly, the results obtained from all three methods indicate that HBs with  $F_{al}$  are stronger than those with  $F_{ar}$  (Figure 9). The energetically favorable HBs with  $F_{al}$  had an angle of  $155^\circ$ – $145^\circ$  and a distance of  $>2.7$  Å, while HBs with  $F_{ar}$  had an angle of  $160^\circ$ – $120^\circ$  and a distance of  $>2.85$  Å (red squares in Figure 9). The analysis of selected crystal structures showed that  $F \cdots H-C$  HBs mostly exhibited a stabilizing character for distances longer than 3 Å (Figure 9).

Analysis of the ETS-NOCV decomposition results showed that for uncharged donors (OH, NH, CH) the contribution of Coulomb energy term has the greatest impact on the stabilization energy of HBs with fluorine, while for  $NH^+$  the XC energy term has the largest contribution. The reason for the destabilizing nature of the shorter HBs with fluorine may be due to the high value of the kinetic energy contribution (Figure S2). To determine the significance of HBs with fluorine, the density maps of geometric parameters of HBs found in the PDB repository (Figures 3 and 4) were compared with the corresponding HB energy maps (Figures 6–9). The proposed areas (red squares) of favorable geometric parameters with the highest energy values did not match with the most occupied areas of geometric parameters. This suggests that HBs with fluorine do not play a significant role in the stabilization of the L–R system and are often formed under unfavorable geometric parameters.



**Figure 9.** HB energy maps generated based on Diff, QAIM, and ETS calculations of interaction energy between CH donor and fluorine attached to (A) an aliphatic fragment and (B) an aromatic ring for specific geometric parameters. The areas for which the highest stabilizing energy was observed in all three methods are marked with a red square.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. PDB Analysis

We performed a statistical analysis of the structural data and investigated in detail the geometric parameters of the intermolecular HBs of fluorine in the structures deposited in the PDB repository. In the first step, all fluorine-containing ligands were identified in the LigandExpo database [21] and then divided into two groups: fluorine attached to an aliphatic carbon ( $F_{al}$ ) and fluorine attached to an aromatic carbon ( $F_{ar}$ ). In the next step, all crystal structures containing the abovementioned ligands were identified. The positions of hydrogen atoms were added, considering the stereochemical rules determining the most favorable position of hydrogens, using the Protein Preparation Wizard (Schrödinger Maestro Software) [22]. The in-house script was used to detect the interactions (contact) occurring between fluorine (as an acceptor) in the ligand and the neighboring HB donors (i.e., OH, NH, CH) in the receptor that met the following criteria: a distance of  $<4$  Å and an angle of  $90$ – $180^\circ$ .

Based on the obtained data, density maps showing the distribution of the geometric parameters of HBs were generated using R [23] environment as well as RColorBrewer [24], Hexbin [25], Rbokeh [26], and ggplot2 [27] libraries.

#### 3.2. Calculation of Interaction Energy

To determine the energy of the studied intermolecular interactions with fluorine, all complexes obtained from the PDB were divided into subgroups based on the following: (i) angle of HB (ranged from  $90^\circ$  to  $180^\circ$  with a step of  $10^\circ$ ), (ii) distance of HB (ranged from  $2.5$  to  $4$  Å with a step  $0.1$  Å), (iii) donor type of HB (OH, NH,  $^+NH$ , CH), and (iv) whether fluorine is bonded to an aromatic ( $F_{ar}$ ) or aliphatic ( $F_{al}$ ) carbon. Then, one representative PDB complex was randomly selected from each rectangle defined by unit distance and

angle change. In the next step, all the selected systems were visually inspected to identify those in which the HB with fluorine was not the main stabilizing interaction and the number of adjacent supporting interactions was the smallest. These identified complexes were used to calculate the interaction energy of the fluorine-containing HB for the given geometric parameters. Figure S1 illustrates the distribution of complexes in a given HB distance–angle interval.

The appropriate ionization states at  $\text{pH } 7.4 \pm 0.5$  were determined using Epik v3.4 [28,29]. Using an in-house script, the structure of the ligand and the amino acid participating in the interaction was extracted, the missing atoms (included in the peptide bond) were added, and their positions were optimized (OPLS3 force field). The interaction energy of the identified complexes with fluorine was calculated using three commonly used approaches as follows.

The first method, named difference approach or Diff, works based on the assumption that the total interaction energy equals the energy required to separate two interacting molecules. Thus, the energy between the HB donor (X) and the acceptor (Y) is calculated as the difference between the total energy of the  $X \cdots Y$  complex and the sum of the total energies of its frozen components [18,30]:

$$E_{int} = E(X \cdot Y) - [E(X) + E(Y)]$$

The energies of the separated molecules, as well as that of the complex, were calculated in Gaussian G16 software [31], using the Minnesota functional M06-2X [32,33] and Karlsruhe basis set def2-TZVP [34]. The polarizable continuum model (PCM) (solvent = water) was used for the calculation [35,36].

The second approach works based on Bader's quantum theory of "atoms in molecules" (QTAIM). In this approach, the topological analysis of electron density was carried out in AIMAll program [37]. The electron density calculated in Gaussian G16 at the M06-2X/def2-TZVP level and the PCM (solvent = water) were used in the analysis. The energy of the noncovalent bonds detected in the crystal structures was calculated using the Espinosa equation as follows:

$$E_{int} = \frac{1}{2}v(r)$$

where  $E_{int}$  is the energy of the interatomic interaction and  $v(r)$  is the kinetic energy at the bond critical point (BCP). The above equation can be used for all types of HBs, van der Waals interactions, and weak interactions such as  $H \cdots H$  and  $C-H \cdots O$  [38].

The third approach works based on the energy decomposition analysis. Bonding was analyzed using the extended transition state (ETS) method [39], with the natural orbitals for the chemical valence (NOCV) scheme [40–42]. In this approach, the total energy of bonding between the interacting molecules ( $\Delta E_{int}$ ) is divided into different components as follows:

$$\Delta E_{int} = \Delta E_{dist} + \Delta E_{el} + \Delta E_{Pauli} + \Delta E_{orb} \quad (1)$$

where  $\Delta E_{dist}$  is the energy required to promote the separated fragments from their equilibrium geometry to the structure they will take up in the complex,  $\Delta E_{el}$  is the energy of the electrostatic interaction occurring between the two fragments in the supermolecule geometry,  $\Delta E_{Pauli}$  is the energy of repulsion between the occupied orbitals of the two fragments, and  $\Delta E_{orb}$  or the orbital interaction term refers to the energy of the stabilizing component due to the final orbital relaxation. All calculations were performed using the Amsterdam Density Functional (ADF) program [43–46], using the ETS-NOCV scheme. The Becke, Lee, Yang, and Parr exchange–correlation functional with the Grimme dispersion correction (B3LYP-D3) was used. A standard double- $\zeta$  STO basis containing one set of polarization functions was adopted for all the electrons (TZP). The total (electronic) bonding enthalpies ( $\Delta E = \Delta E_{int}$ ) did not include the zero-point energy (ZPE) additions, finite temperature contributions or basis set superposition error corrections (BSSE).

#### 4. Conclusions

Fluorine is a common substituent in medicinal chemistry and is found in the structure of several currently available blockbuster drugs. This element influences many pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs, but its role in stabilizing ligand–biomolecule systems still remains unclear. In this study, we performed a statistical and theoretical analysis of HBs with fluorine found in the PDB database, focusing on the different HB donors (hydroxyl, amine, and methyl groups). The energy range of distinct HBs (i.e.,  $F \cdots H-O$ ,  $F \cdots H-N^+$ ,  $F \cdots H-N$ ,  $F \cdots H-C$ ) and optimal ranges of geometric parameters of HBs with fluorine were determined based on the selected PDB complexes.

The results of the analyses showed significant differences in the interaction of fluorine attached to an aliphatic carbon ( $F_{al}$ ) and fluorine attached to an aromatic carbon ( $F_{ar}$ ). The  $F \cdots H-O$  HBs with  $F_{ar}$  are more frequently formed with SER and THR, while those with  $F_{al}$  are formed by all amino acids with a polar hydroxyl group. Typically,  $F \cdots H-N$  HBs are formed with amino acids that have an amino group in their side chain (ARG, LYS, ASN, GLU). Hydrophobic amino acids most often form  $F \cdots H-C$  interactions, which suggests that fluorine prefers a hydrophobic environment in biological systems. It is worth noting that due to the three free electron pairs of fluorine, HBs are only influenced by the donor–acceptor distance and not by the angles. Although the three free electron pairs occupy the entire space around fluorine,  $F \cdots H-X$  HBs exhibit the characteristics of HBs, with exceeded standard angles. However, no significant differences were noted in the energies of HBs with fluorine depending on the donor type, which indicates that fluorine acts as a weak HB acceptor for all types of atoms. The optimal ranges of geometric parameters for HBs with fluorine were found to be  $150^\circ$ – $120^\circ$  and 2.9–3.6 Å. For  $F \cdots N^+$  interactions, an HB distance shorter than 2.8 Å showed a destabilizing character in almost 70% of the cases.

It must be emphasized that all the analyzed crystal structures may not be crystallized at the lowest free energy form, and hence the observed interactions might not be in optimal geometries [47]. However, the results suggest that HBs with fluorine are forced to form, due to the stronger ligand–receptor neighboring interactions, which make fluorine the “donor’s last resort” [48]. This is in line with Margareth Etter’s rule that stronger HBs form first, and weaker donors and acceptors interact afterward [47]. All these findings suggest that fluorine does not form strong, stabilizing intermolecular interactions, and thus it seems that indirect influence of this element (electrostatic, inductive, and resonance effects) has a greater impact on the biological activity of compounds than his influences on the pharmacodynamics. The results of this study may contribute to a thorough understanding of hydrogen bonding with fluorine in biological systems which may serve to improve the tools currently available for the rational design of new fluorinated drugs.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded, Figure S1: Points of geometrical parameters of hydrogen bonds for which the energy value was calculated; Figure S2: Box plots showing the distribution of the different energy components: kinetic (red), electrostatic (cyan), Coulomb (blue), XC (olive), dispersion (magenta) energy for HB donors and fluorine attached to (A) an aliphatic fragment and (B) an aromatic ring. The energy values were calculated for specific geometric parameters using ETS-NOCV approach. Table S1: Correlation coefficient values calculated between results from every method; Table S2: Pearson test values calculated between results from every method.

**Author Contributions:** W.P.: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing—original draft, Visualization, Project administration; R.K. (Rafał Kurczab): Conceptualization, Resources, Writing—original draft, Supervision, Project administration; R.K. (Rafał Kafel): Software, Visualization; A.J.B.: Investigation, Writing—original draft, Funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The authors acknowledge the financial support from the National Science Centre, Poland (grant no. 2019/35/N/NZ7/04312) and the statutory funding from the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Poland.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data were obtained from the PDB repository and the DrugCentral 2021 database (accessed 30 April 2021).

**Acknowledgments:** Numerical simulations were performed by PLGrid Infrastructure (Prometheus, ACC Cyfronet, AGH). WP acknowledges the support of InterDokMed project no. POWR.03.02.00-00-1013/16. The authors thank Justyna Kalinowska-Thućik (Jagiellonian University), Mariusz Mitoraj (Jagiellonian University), and Filip Sagan (Jagiellonian University) for providing technical and substantive assistance in research.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Sample Availability:** Samples of the compounds are not available from the authors.

## References





1. Swallow, S. Fluorine in Medicinal Chemistry. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Lawton, G., Witty, D.R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; Volume 54, pp. 65–133.
2. Fried, J.; Sabo, E.F. 9 $\alpha$ -Fluoro derivatives of cortisone and hydrocortisone. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 1455–1456. [[CrossRef](#)]
3. Zhou, Y.; Wang, J.; Gu, Z.; Wang, S.; Zhu, W.; Aceña, J.L.; Soloshonok, V.A.; Izawa, K.; Liu, H. Next Generation of Fluorine-Containing Pharmaceuticals, Compounds Currently in Phase II–III Clinical Trials of Major Pharmaceutical Companies: New Structural Trends and Therapeutic Areas. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 422–518. [[CrossRef](#)]
4. Tressaud, A. Fluorine, a key element for the 21st century. In *Fluorine*; Tressaud, A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 77–150.
5. Brown, D.G.; Wobst, H.J. A Decade of FDA-Approved Drugs (2010–2019): Trends and Future Directions. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 2312–2338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ursu, O.; Holmes, J.; Bologa, C.G.; Yang, J.J.; Mathias, S.L.; Stathias, V.; Nguyen, D.T.; Schürer, S.; Oprea, T. DrugCentral 2018: An update. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D963–D970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Chen, D.; Oezguen, N.; Urvil, P.; Ferguson, C.; Dann, S.M.; Savidge, T.C. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1501240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bitencourt-Ferreira, G.; Veit-Acosta, M.; de Azevedo, W.F. Hydrogen bonds in protein-ligand complexes. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *2053*, 93–107. [[PubMed](#)]
9. Sarkhel, S.; Desiraju, G.R. Hydrogen Bonds in Protein-Ligand Complexes: Strong and Weak Interactions in Molecular Recognition. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2004**, *54*, 247–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Hogendorf, A.S.; Hogendorf, A.; Popiołek-Barczyk, K.; Ciechanowska, A.; Mika, J.; Satała, G.; Walczak, M.; Latacz, G.; Handzlik, J.; Kieć-Kononowicz, K.; et al. Fluorinated indole-imidazole conjugates: Selective orally bioavailable 5-HT7 receptor low-basicity agonists, potential neuropathic painkillers. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *170*, 261–275. [[CrossRef](#)]
11. Howard, J.A.K.; Hoy, V.J.; O'Hagan, D.; Smith, G.T. How good is fluorine as a hydrogen bond acceptor? *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12613–12622. [[CrossRef](#)]
12. Pietruś, W.; Kurczab, R.; Kafel, R.; Machalska, E.; Kalinowska-Thućik, J.; Hogendorf, A.; Żylewski, M.; Baranska, M.; Bojarski, A.J. How can fluorine directly and indirectly affect the hydrogen bonding in molecular systems?—A case study for monofluoroanilines. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, *252*, 119536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pietruś, W.; Kurczab, R.; Kalinowska-Thućik, J.; Machalska, E.; Golonka, D.; Barańska, M.; Bojarski, A. Influence of fluorine substitution on nonbonding interactions in selected para-halogeno anilines. *ChemPhysChem* **2021**. [[CrossRef](#)]
14. Zhang, G.; He, W.; Chen, D. On difference of properties between organic fluorine hydrogen bond C-H F-C and conventional hydrogen bond. *Mol. Phys.* **2014**, *112*, 1736–1744. [[CrossRef](#)]
15. Meanwell, N.A. Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 5822–5880. [[CrossRef](#)]
16. Dunitz, J.D.; Taylor, R. Organic Fluorine Hardly Ever Accepts Hydrogen Bonds. *Chem. A Eur. J.* **1997**, *3*, 89–98. [[CrossRef](#)]
17. Ferreira De Freitas, R.; Schapira, M. A systematic analysis of atomic protein-ligand interactions in the PDB. *Medchemcomm* **2017**, *8*, 1970–1981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Afonin, A.V.; Vashchenko, A.V.; Sigalov, M.V. Estimating the energy of intramolecular hydrogen bonds from <sup>1</sup>H NMR and QTAIM calculations. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 11199–11211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Šolínová, V.; Kašička, V. Determination of acidity constants and ionic mobilities of polyprotic peptide hormones by CZE. *Electrophoresis* **2013**, *34*, 2655–2665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Graton, J.; Besseau, F.; Brossard, A.M.; Charpentier, E.; Deroche, A.; Le Questel, J.Y. Hydrogen-bond acidity of OH groups in various molecular environments (phenols, alcohols, steroid derivatives, and amino acids structures): Experimental measurements and density functional theory calculations. *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 13184–13193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Berman, H.; Henrick, K.; Nakamura, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2003**, *10*, 980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Madhavi Sastry, G.; Adzhigirey, M.; Day, T.; Annabhimoju, R.; Sherman, W. Protein, and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2013**, *27*, 221–234. [CrossRef]
23. Team, R.C. Computational Many-Particle Physics. In *Lecture Notes in Physics*; Fehske, H., Schneider, R., Weiße, A., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2008; Volume 739.
24. Neuwirth, E. *RColorBrewer: ColorBrewer Palettes*; R Package Version 1.1.2; R Package: Vienna, Austria, 2014. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer> (accessed on 29 December 2021).
25. Lewin-Koh, N. *Hexagon Binning: An Overview*; R Core Team: Vienna, Austria, 2014.
26. Bokeh Development Team. Bokeh: Python Library for Interactive Visualization. 2014. Available online: <http://www.bokeh.pydata.org> (accessed on 29 December 2021).
27. Villanueva, R.A.M.; Chen, Z.J. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis (2nd ed.). *Meas. Interdiscip. Res. Perspect.* **2019**, *17*, 160–167. [CrossRef]
28. Greenwood, J.R.; Calkins, D.; Sullivan, A.P.; Shelley, J.C. Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2010**, *24*, 591–604. [CrossRef] [PubMed]
29. Shelley, J.C.; Cholleti, A.; Frye, L.L.; Greenwood, J.R.; Timlin, M.R.; Uchimaya, M. Epik: A software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2007**, *21*, 681–691. [CrossRef]
30. Jabłoński, M. A Critical Overview of Current Theoretical Methods of Estimating the Energy of Intramolecular Interactions. *Molecules* **2020**, *25*, 5512. [CrossRef] [PubMed]
31. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian 16 Revision C.01*; Gaussian Inc.: Wallingford, CT, USA, 2016.
32. Zhao, Y.; Truhlar, D.G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functions. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241. [CrossRef]
33. Lin, Y.-S.; Li, G.-D.; Mao, S.-P.; Chai, J.-D. Long-Range Corrected Hybrid Density Functionals with Improved Dispersion Corrections. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 263–272. [CrossRef]
34. Pritchard, B.P.; Altarawy, D.; Didier, B.; Gibson, T.D.; Windus, T.L. New Basis Set Exchange: An Open, Up-to-Date Resource for the Molecular Sciences Community. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59*, 4814–4820. [CrossRef]
35. Mennucci, B.; Cammi, R.; Tomasi, J. Analytical free energy second derivatives with respect to nuclear coordinates: Complete formulation for electrostatic continuum solvation models. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 6858–6870. [CrossRef]
36. Miertuš, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117–129. [CrossRef]
37. Keith, T.A. *AIMAll*; TK Gristmill Software: Overland Park, KS, USA, 2015.
38. Espinosa, E.; Molins, E.; Lecomte, C. Hydrogen bond strengths revealed by topological analyses of experimentally observed electron densities. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *285*, 170–173. [CrossRef]
39. Ziegler, T.; Rauk, A. On the calculation of bonding energies by the Hartree Fock Slater method—I. The transition state method. *Theor. Chim. Acta* **1977**, *46*, 1–10. [CrossRef]
40. Michalak, A.; Mitoraj, M.; Ziegler, T. Bond orbitals from chemical valence theory. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 1933–1939. [CrossRef] [PubMed]
41. Mitoraj, M.; Michalak, A. Applications of natural orbitals for chemical valence in a description of bonding in conjugated molecules. *J. Mol. Model.* **2008**, *14*, 681–687. [CrossRef] [PubMed]
42. Mitoraj, M.; Michalak, A. Natural orbitals for chemical valence as descriptors of chemical bonding in transition metal complexes. *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 347–355. [CrossRef]
43. Velde, G.; Bickelhaupt, F.M.; Baerends, E.J.; Fonseca Guerra, C.; van Gisbergen, S.J.A.; Snijders, J.G.; Ziegler, T. Chemistry with ADF. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 931–967. [CrossRef]
44. Baerends, E.J.; Ros, P. Self-consistent molecular Hartree-Fock-Slater calculations II. The effect of exchange scaling in some small molecules. *Chem. Phys.* **1973**, *2*, 52–59. [CrossRef]
45. Baerends, E.J.; Ellis, D.E.; Ros, P. Self-consistent molecular Hartree-Fock-Slater calculations I. The computational procedure. *Chem. Phys.* **1973**, *2*, 41–51. [CrossRef]
46. Velde, G.; Baerends, E.J. Numerical integration for polyatomic systems. *J. Comput. Phys.* **1992**, *99*, 84–98. [CrossRef]
47. Etter, M.C. Hydrogen bonds as design elements in organic chemistry. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 4601–4610. [CrossRef]
48. Taylor, R. The hydrogen bond between N-H or O-H and organic fluorine: Favourable yes, competitive no. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **2017**, *73*, 474–488. [CrossRef]



## Article

# Data-Driven Analysis of Fluorination of Ligands of Aminergic G Protein Coupled Receptors

 Wojciech Pietruś <sup>1,2</sup> , Rafał Kurczab <sup>1,\*</sup> , Dagmar Stumpfe <sup>2</sup>, Andrzej J. Bojarski <sup>1</sup>  and Jürgen Bajorath <sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Medicinal Chemistry, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Smetna 12, 31-343 Krakow, Poland; pietrus@if-pan.krakow.pl (W.P.); bojarski@if-pan.krakow.pl (A.J.B.)

<sup>2</sup> Department of Life Science Informatics, LIMES Program Unit Chemical Biology and Medicinal Chemistry, B-IT, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Friedrich-Hirzebruch-Allee 6, D-53115 Bonn, Germany; stumpfe@bit.uni-bonn.de

\* Correspondence: kurczab@if-pan.krakow.pl (R.K.); bajorath@bit.uni-bonn.de (J.B.);  
Tel.: +48-126-62-3301 (R.K.); +49-228-73-69100 (J.B.)

**Abstract:** Currently, G protein-coupled receptors are the targets with the highest number of drugs in many therapeutic areas. Fluorination has become a common strategy in designing highly active biological compounds, as evidenced by the steadily increasing number of newly approved fluorine-containing drugs. Herein, we identified in the ChEMBL database and analysed 1554 target-based FSAR sets (non-fluorinated compounds and their fluorinated analogues) comprising 966 unique non-fluorinated and 2457 unique fluorinated compounds active against 33 different aminergic GPCRs. Although a relatively small number of activity cliffs (defined as a pair of structurally similar compounds showing significant differences of activity  $-\Delta pPot > 1.7$ ) was found in FSAR sets, it is clear that appropriately introduced fluorine can increase ligand potency more than 50-fold. The analysis of matched molecular pairs (MMPs) networks indicated that the fluorination of the aromatic ring showed no clear trend towards a positive or negative effect on affinity; however, a favourable site for a positive potency effect of fluorination was the ortho position. Fluorination of aliphatic fragments more often led to a decrease in biological activity. The results may constitute the rules of thumb for fluorination of aminergic receptor ligands and provide insights into the role of fluorine substitutions in medicinal chemistry.

**Keywords:** G protein-coupled receptors; GPCR; aminergic receptors; fluorine; activity cliffs; MMP; ChEMBL



**Citation:** Pietruś, W.; Kurczab, R.; Stumpfe, D.; Bojarski, A.J.; Bajorath, J. Data-Driven Analysis of Fluorination of Ligands of Aminergic G Protein Coupled Receptors. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1647. <https://doi.org/10.3390/biom11111647>

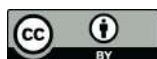
Academic Editor: Vsevolod Katritch

Received: 13 October 2021

Accepted: 5 November 2021

Published: 8 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Currently, almost 700 unique human proteins are known drug targets, of which five of the most druggable target classes are: G protein-coupled receptors (GPCRs), ion channels, kinases, nuclear hormone receptors and proteases. GPCRs are a target for 34% of the global market share of therapeutic drugs [1,2], with aggregated sales for 2011–2015 of ~US\$890 billion [3]. GPCRs are membrane-bound (located also in various intracellular compartments) receptors [4] used in the treatment of neurodegenerative, immunological, cardiac, and renal diseases, cancer [3], and many other disorders [5], as well as in many cases being important off-targets [6].

Selective fluorination of bioactive compounds is a well-established strategy in the design of new drugs to increase pharmacological efficacy, biological half-life, and absorption. Additionally, the fluorine substituent may affect protein-ligand affinity and selectivity [7–9]. Indeed, a continuous increase in the number of approved fluorinated drugs or drug candidates that enter clinical trials are observed and it is worth emphasizing that fluorine-containing compounds constitute over 50% of blockbuster drugs [10]. Fluorinated drugs cover all therapeutic areas, exhibit broad structural diversity, and contain a variety of fluorinated moieties, despite the limited covalent connectivity of fluorine atoms compared to other heteroatoms [11,12].

Considering the therapeutic potential of GPCRs and fluorine introduction as one of the most frequently used modifications of a lead compound to further improve its biological activity, we examined fluorine substituents in the context of activity cliffs (ACs). An AC is generally defined as a pair of structurally similar compounds having a large difference in potency.

First, we systematically searched for fluorinated aminergic GPCR ligands in ChEMBL. Ligand pairs and sets of pairs that differed only by fluorine atoms were identified and potency differences between fluorinated and non-fluorinated compounds were determined. In addition, substructure relationships between ligands pairs and sets were analyzed relative to underlying structure-activity relationships (SARs). The AC formalism was modified and applied to the fluorinated and non-fluorinated compound pairs.

Nearly 1200 non-fluorinated active ChEMBL compounds were identified across more than 35 qualifying GPCR targets that had at least one structural analogue containing one or more F atoms. For those ligand sets, a new network data structure was designed to investigate contributions of individual substitutions of F atoms to potency changes. The introduced network represents structural relationships between sets of compounds instead of individual compounds only. The non-fluorinated and fluorinated ligand sets are informative test cases for SAR exploration in light of the contributions of single or multiple fluorine atoms to the activity towards aminergic GPCR targets.

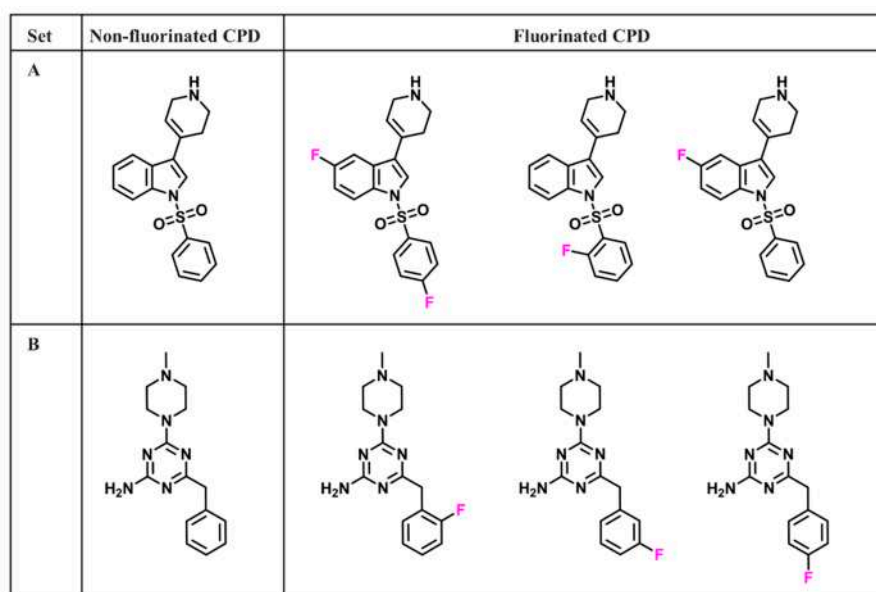
## 2. Materials, Methods, and Analysis Concepts

### 2.1. Compounds and Activity Data

Bioactive compounds were extracted from the ChEMBL database version 26 [13]. Only compounds with reported direct interactions (target relationship type: "D") with annotation for 35 human aminergic GPCR [14] targets at the highest confidence level (target confidence score: 9), and exact measurements ("=") were selected. In addition, only chosen potency measurements were taken into account (standard type: "K<sub>i</sub>", "IC<sub>50</sub>", "EC<sub>50</sub>", "K<sub>b</sub>", "K<sub>d</sub>", "pK<sub>i</sub>", "pIC<sub>50</sub>", "pEC<sub>50</sub>", "pK<sub>b</sub>", "LogK<sub>i</sub>", or "pK<sub>d</sub>") and converted/reported as negative decadic logarithmic values. Given these criteria, a total of 21,800 unique compounds (44,033 measurements) with activity against 35 GPCRs were obtained and screened for the presence or absence of F atoms. Compound and activity data were extracted using in-house python scripts and KNIME ([knime.org](https://www.knime.org), accessed on 10 October 2021) protocols with the aid of Open Eye Toolkit (OpenEye Scientific Software, OEChem TK 2012).

### 2.2. Fluorine-Dependent Analogue Sets

The structures of all 21,800 compounds were systematically compared and if two or more compounds were active against the same target and differed only in the number of substituted fluorine atoms, requiring the presence of one non-F analogue, they were combined into an F-based analogue set for SAR analysis (FSAR set), as illustrated in Figure 1. Accordingly, 1554 target-based FSAR sets were identified, comprising 966 unique non-fluorinated and 2457 unique fluorinated compounds active against 33 different aminergic GPCRs (Table S1 in Supplementary Materials).



**Figure 1.** FSAR sets. Two exemplary FSAR sets A and B with ligands active against serotonin 6 (5-HT6) receptor are shown. On the left side, the non-fluorinated active compound of each set is shown and on the right side, corresponding active fluorinated analogues are shown.

For each FSAR set, pairwise potency differences ( $\Delta pPot$ ) between the non-F compound and their fluorinated analogues were determined and categorized as no effect, positive effect, or negative effect (category (i), (ii), and (iii) below, respectively). Then, the union of all pairwise potency effects was generated and the effect for the FSAR set was assigned to category (i)–(v):

- (i) No effect:  $\text{MIN } \Delta pPot > -0.3$  and  $\text{MAX } \Delta pPot < 0.3$
- (ii) Positive effect:  $\text{MIN } \Delta pPot \geq -0.3$  and  $\text{MAX } \Delta pPot > 0.3$
- (iii) Negative effect:  $\text{MAX } \Delta pPot \leq -0.3$  and  $\text{MIN } \Delta pPot < 0.3$
- (iv) Mixed effect:  $\text{MIN } \Delta pPot < -0.3$  and  $\text{MAX } \Delta pPot > 0.3$
- (v) Inconclusive effect:  $\text{MIN } \Delta pPot \leq -1.7$  and  $\text{MAX } \Delta pPot \geq 1.7$

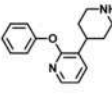
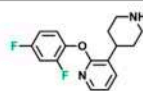
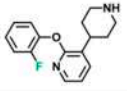

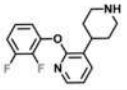
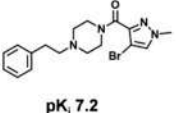
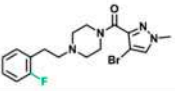
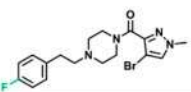
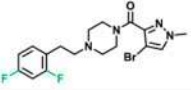
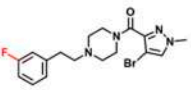
The categorization is illustrated in Figure 2.

### 2.3. Activity Cliffs

Here, a pair of non-fluorinated/fluorinated analogues from the same FSAR set was classified as an AC if and  $\Delta pPot$  was  $|1.7|$  or larger. A  $\Delta pPot$  of 1.7 corresponds to a 50-fold difference in potency. As a standard criterion, AC formation often requires a 100-fold change in biological activity (i.e.,  $\Delta pPot > 2$ ).

### 2.4. Matched Molecular Pairs

For a systematic similarity comparison of different FSAR sets, matched molecular pairs (MMPs) were calculated. MMPs were generated by systematic computational fragmentation of exocyclic single bonds in compound structures according to Hussain and Rea [15,16], and in this analysis, only transformation size-restricted MMPs [17] resulting from single-cut fragmentation [18] were sampled. A transformation size-restricted MMP is an MMP in which the shared core of the two molecules has at least twice the size of the exchanged substructures. In addition, the difference in size between the exchanged substructures is limited to at most eight heavy atoms, and both are not allowed to contain more than 13 heavy atoms [17]. For similarity assessment, MMPs were calculated for all 966 unique non-F compounds.

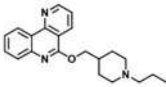
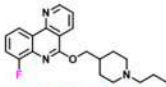
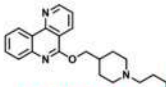
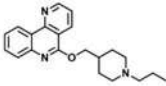
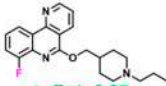
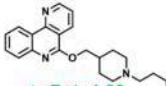
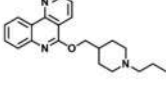
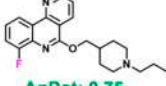
A	Non-fluorinated CPD	Fluorinated CPD	$pK_i$	Effect		FSAR set: positive effect
 <p><math>pK_i</math> 7.0</p>		7.5	0.5	positive effect		
		7.9	0.9	positive effect		
		8.1	1.1	positive effect		
		6.8	-0.2	no effect		
B	Non-fluorinated CPD	Fluorinated CPD	$pK_i$	Effect		FSAR set: mixed effect
 <p><math>pK_i</math> 7.2</p>		7.8	0.6	positive effect		
		8.5	1.3	positive effect		
		9.0	1.8	positive effect Activity cliff		
		6.3	-0.9	negative effect		

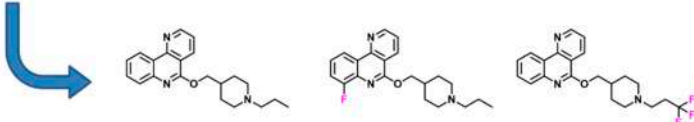
**Figure 2.** Potency effects. For two exemplary FSAR sets, the potency effect for each non-F (left)–fluorinated (middle) analogue pair and the resulting FSAR effects are given on the right. Potency values against serotonin 1a (5-HT1a) receptor (**A**) and serotonin 2a (5-HT2a) receptor (**B**) and  $\Delta pPot$  are reported. As an AC criterion, a  $\Delta pPot$  of 1.7 corresponding to a 50-fold difference in potency was applied.

### 2.5. MMP Networks

MMP networks were generated in which nodes represented compound and edges pairwise MMP relationships. These networks were drawn with Cytoscape [19]. A non-F compound can be the origin of multiple FSAR sets with activity against different GPCR targets. Accordingly, the 1554 target-based FSAR sets contained 966 non-F compounds, a subset of which participated in multiple identical or overlapping target-based sets. For MMP network generation, these FSAR sets were combined, as shown in Figure 3, and might thus contain different potency effects for individual targets. The MMP network captured similarity relationships between the resulting 966 FSAR sets. In the MMP network, sets were color-coded according to the sum of all potency effects as follows:

- (i). No effect: No effects for all targets (grey).
- (ii). Positive effect: Only positive effects (possibly in combination with no effects) (green).
- (iii). Negative effect: Only negative effects (possibly in combination with no effects) (red).
- (iv). Mixed effect: Combinations of negative, positive, and mixed effects (possibly in combination with no effects) (yellow).

Target-based FSAR set	Non-fluorinated CPD	Fluorinated CPD	Effect
5-HT2b		 $\Delta pPot: 0.66$  $\Delta pPot: 0.44$	positive effect
5-HT4		 $\Delta pPot: 2.27$  $\Delta pPot: 1.83$	positive effect - Activity cliff
5-HT2c		 $\Delta pPot: 0.75$	positive effect

**Figure 3.** FSAR sets with multiple targets. Three target-based FSAR sets with  $\Delta pPot$  values and their individual potency effects for the serotonin 2b (5-HT2b) receptor, serotonin 4 (5-HT4) receptor, and serotonin 2c (5-HT2c) receptor are shown (from top to bottom). For network analysis, target-based FSAR sets having the same non-F compound were combined into a “FSAR meta set” with a consensus potency effect.

Each of the 966 FSAR sets was represented by its non-F compound as a single node and two nodes were connected by an edge if they formed an MMP. Nodes were color-coded by the corresponding effect(s) observed for the set (grey: no effect(s), green: positive effect(s), red: negative effect(s), yellow: mixed effect(s)). In addition, nodes were shown with a black border if at least one  $\Delta pPot$  value within the set was larger or smaller than 1.7 and  $-1.7$ , respectively, thus representing an AC. If one non-F compound was a substructure of another and both formed an MMP (i.e., the MMP transformation involved a hydrogen atom in one compound and a non-hydrogen moiety in the other compound), the edge was colored in blue. All remaining edges were colored in grey.

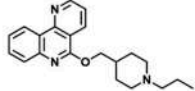
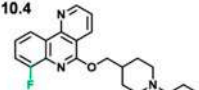
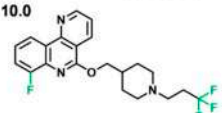
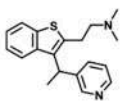
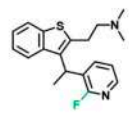
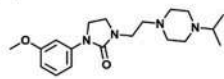
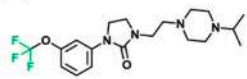
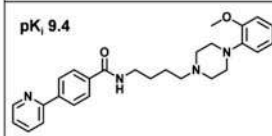
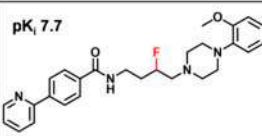
### 3. Results and Discussion

#### 3.1. FSAR Sets

From ChEMBL, all high-confidence GPCR ligands annotated with 35 aminergic GPCR targets were extracted and divided into two groups including non-F and fluorinated compounds. For each non-F compound, a search for fluorinated analogues was conducted, leading to the assembly of 1554 target-based FSAR sets with activity against 33 GPCRs, comprising a total 966 unique non-F GPCR ligands and 2457 unique fluorinated compounds. The size of the FSAR sets ranged from two to 13 compounds and 420 FSAR sets contained at least two fluorinated analogues. Based on the determination of pairwise compound potency differences and categorization of potency effects, as detailed in Materials and Methods, the 1554 target-based FSAR sets contained 617 sets with no potency effects, 387 with positive, 480 with negative, and 70 with both positive and negative effects. More than half (56%) of the FSAR sets were characterized by the presence of consistent potency effects for their target caused by the introduction of fluorine atoms. Only 4.5% of the detected potency effects were inconclusive and no FSAR set contained compound pairs with large opposing potency effects ( $\Delta pPot \geq 1.7$ ). Hence, the majority of FSAR exhibited well-defined potency effects as a consequence of compound fluorination and provided a sound basis for SAR analysis.

### 3.2. Activity Cliffs in FSAR Sets and Their Interpretation

The individual potency changes for compound pairs in FSAR sets ranged from  $\Delta p\text{Pot}$  of  $-2.8$  to  $4.2$  with a mean of  $-0.06$  (median  $-0.04$ ). Hence, less than half of the compound pairs ( $\sim 46\%$ ) had potency values within the expected range of measurement fluctuations. A subset of 1354 of the total 2526 compound pairs contained in the 1554 FSAR sets showed a  $\Delta p\text{Pot}$  of at least  $\pm 0.3$  (i.e., a two-fold difference). However, only 54 compound pairs had a  $\Delta p\text{Pot}$  greater than 50-fold ( $\pm 1.7$ ) and were thus classified as ACs. In 48 (3%) of the FSAR sets, one to three ACs per set were identified for 18 different GPCRs. Hence, only 2.2% of all pairs represented ACs capturing an at least a 50-fold difference in potency. For comparison, the frequency of target-based ACs formed by analogue pairs in ChEMBL with at least a 100-fold difference in potency has remained essentially constant at  $\sim 5\%$  of all pairs [20]. Accordingly, large-magnitude potency alterations as a consequence of compound fluorination were rare. Exemplary fluorination-dependent ACs are shown in Figure 4.

Non-fluorinated CPD	Fluorinated CPD	$\Delta pK_i$	Target
<p>pK<sub>i</sub> 8.1</p> 	<p>pK<sub>i</sub> 10.4</p>  <p>pK<sub>i</sub> 10.0</p> 	<p>2.3</p> <p>1.9</p>	Serotonin 4 (5-HT4) receptor
<p>pK<sub>i</sub> 4.6</p> 	<p>pK<sub>i</sub> 8.8</p> 	4.2	Histamine H1 receptor
<p>pK<sub>i</sub> 6.8</p> 	<p>pK<sub>i</sub> 8.5</p> 	1.7	Dopamine D3 receptor
<p>pK<sub>i</sub> 9.4</p> 	<p>pK<sub>i</sub> 7.7</p> 	-1.7	Dopamine D3 receptor

**Figure 4.** Exemplary activity cliffs. Five exemplary ACs resulting from compound fluorination are shown. For each non-F (left)–fluorinated (middle) compound pair, the  $\Delta p\text{Pot}$  (i.e.,  $\Delta pK_i$ ) value, and the corresponding target name are reported on the right. In addition, potency values for each compound are displayed.

In the first example of 5-HT4 receptor ligands in Figure 4, the introduction of F atoms significantly improved the activity. However, molecular modeling studies indicated that in this case, fluorine did not form direct interactions in the binding pocket [21], suggesting that fluorine affected activity indirectly by, e.g., influencing the acidity/basicity and partial charges of adjacent atoms. Interestingly, the introduction of the trifluoro substituent changed the functional profile of the analogue from inverse agonist to antagonist [22].

Although fluorine is a bioisostere of hydrogen, the improvement of H1 receptor ligands activity in the second example might be due to conformational changes or electronic effects. It is worth noting that the replacement of fluorine with chlorine drastically decreased the activity, which may be due to the lower electronegativity of the Cl atom [23].

The third pair reveals the significance of the CF<sub>3</sub> group, which is an often introduced substituent. In this case, fluorine was used for tuning the selectivity to dopamine D2/D3

receptors [24]. Fluorine has different properties depending on whether it is attached to the aliphatic or aromatic part of a compound.

In the last example, the fluorine drastically changed the ligand conformation due to changes in electron density fluctuations along the aliphatic chain [25].

The fluorine substitutions discussed above were employed as a standard strategy to increase biological activity, without a defined underlying rationale. Very often the place of fluorine substitution is dictated by synthetic considerations, as fluorination in many cases requires difficult and time-consuming synthetic procedures.

### 3.3. MMP Network

To further extend SAR analysis of FSAR sets, a newly designed variant of an MMP network with multiple information layers was generated. In a first step, 937 of the 1554 target-based FSAR sets were combined on the basis of shared non-F ligands into multi-target FSAR sets, as illustrated in Figure 3. The remaining 617 FSAR sets represented single-target sets. The 937 overlapping FSAR sets yielded 349 multi-target sets comprising two to 13 target-based sets. Each of the 349 multi-target sets was based upon a non-F compound with activity against multiple GPCRs and contained one to 37 fluorinated analogues with variable target annotations. As a consequence, the potency effects for different targets often varied. Therefore, the potency effects of the original target-based FSAR sets were compared and a final potency effect was assigned, as specified in Materials and Methods.

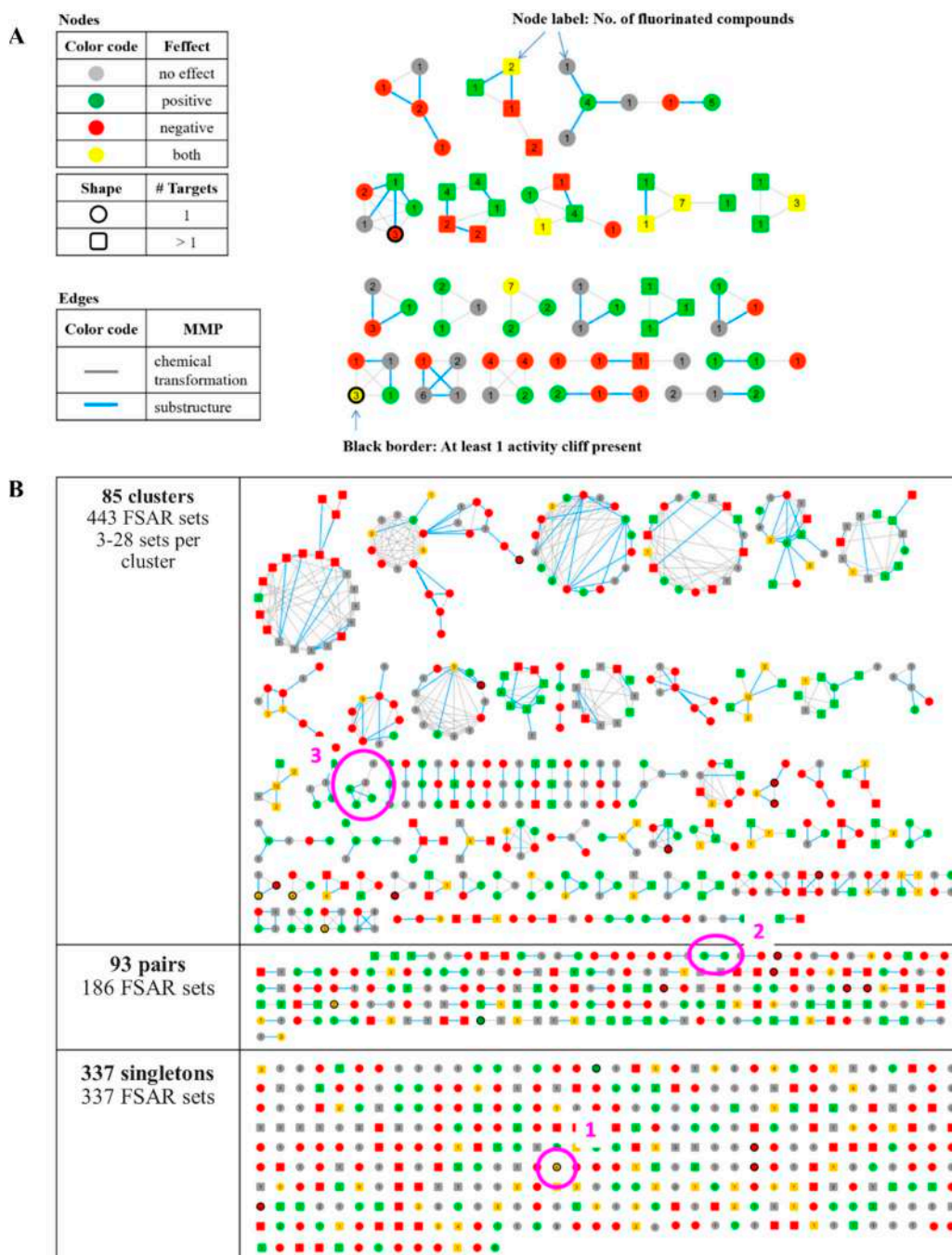
The resulting 966 FSAR sets (617 single- plus 349 multi-target sets) were used to generate the MMP network, in which single-target sets were represented as circles and multi-target sets as squares. In the network, FSAR sets formed distinct clusters with structurally similar compounds. Figure 5A illustrates the MMP network structure with its different information layers and Figure 5B shows the network for the 966 FSAR. It is divided into three parts depending on the formation of clusters. At the top, 85 clusters formed by 443 FSAR sets are shown. In these clusters, at least three FSAR sets were connected and hence structurally analogous. The maximum number of FSAR sets in one cluster was 28. In the middle, 93 pairs derived from 186 FSAR sets are shown. A pair was formed by two structurally analogous FSAR sets. At the bottom, the 337 FSAR sets that did not form any MMPs with another set (singletons) are shown. Around 65% of the FSAR sets had at least one structurally analogous FSAR set (clusters and pairs in the network). A systematic analysis of structurally similar FSAR sets might confirm already observed SAR trends formed by adding or deleting fluorine atoms or can complement SAR information for individual FSAR sets. From each subnetwork—singletons, pairs, and clusters—three examples are analysed in more detail below.

In the first series of 5-HT<sub>2a</sub> ligands (Figure 6A), the fluorination of an aromatic ring significantly influenced the affinity and selectivity for the 5-HT<sub>2a</sub> receptor (5-HT<sub>2c</sub> was an off-target) [26]. While a single substitution in *para* and *ortho* positions improved potency ( $\Delta pK_i = 0.58$  and  $1.28$ , respectively), an introduction of fluorine at both positions resulted in AC ( $\Delta pK_i = 1.79$ ), whereas the meta substituted derivative exhibited a strong negative effect ( $\Delta pK_i = -0.90$ ).

The next FSAR example in Figure 6B comprises sulfonamide 5-HT<sub>2a</sub> ligands with a difference in the piperazine fragment, in which fluorinated analogues showed the same trend of affinity changes in both sets. The substitution of fluorine at the 4- and 7-positions of the naphthalene moiety led to a slight increase in affinity ( $\Delta pK_i$  in the range of  $0.23$ – $0.59$ , respectively), whereas substitution at the 6-position caused a slight decrease ( $\Delta pK_i \sim -0.2$ ) [27].

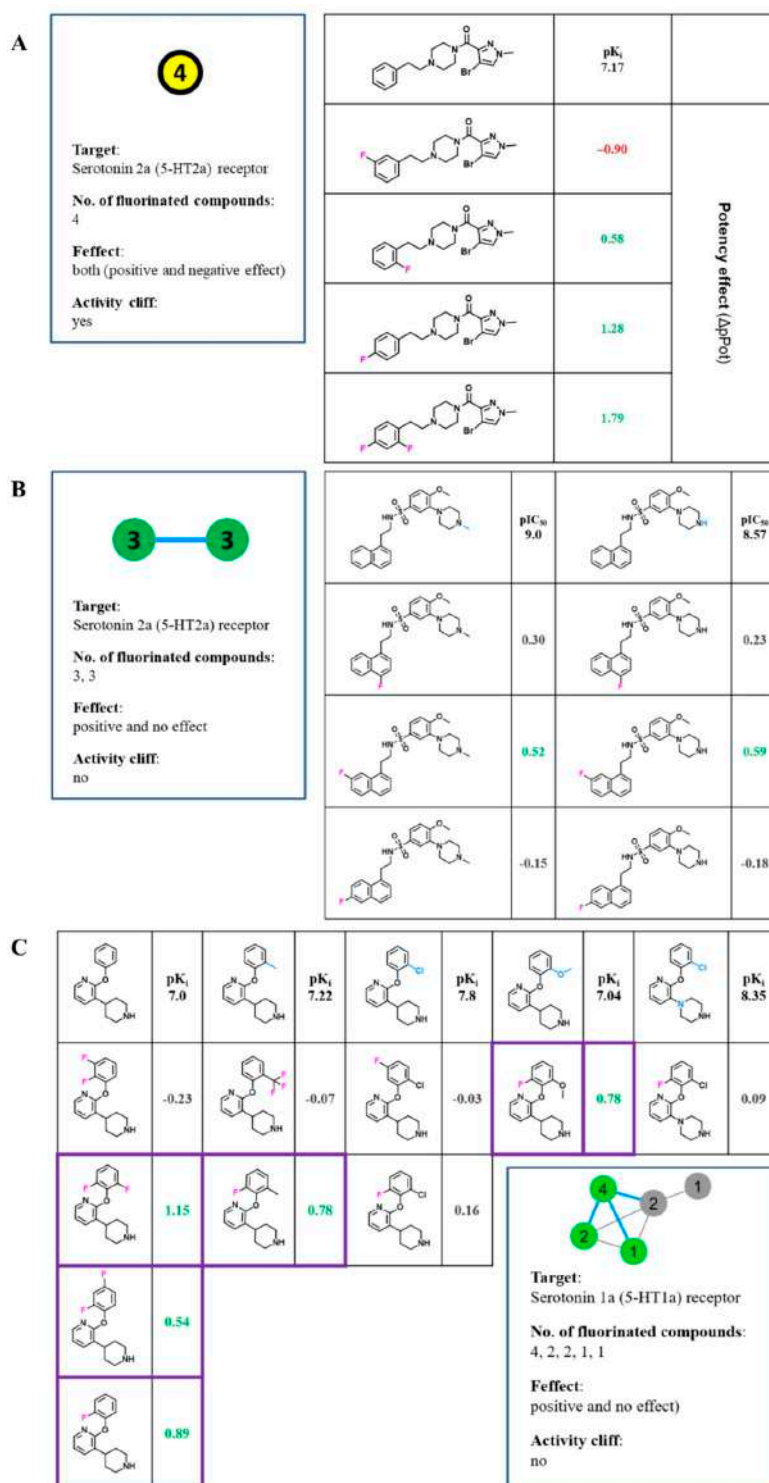
The last example (Figure 6C) shows MMPs with the largest combination of fluorinated analogues [28]. The analysis revealed that F atoms could serve as hydrogen bioisosteres, but at the same time, could dramatically change the selectivity of the analogues. While the set did not contain ACs, fluorination at *ortho* and *para* positions or their combination modulated the affinity. The compound with the highest  $\Delta pK_i$  values ( $1.15$ ) had two fluorine atoms in the *ortho* positions. When fluorine was found at the *meta* position the affinity

decreased, additionally, the  $\text{OCF}_3$  group in the *ortho* position was also unfavorable, which was likely due to the steric effect or conformational changes [28].



**Figure 5. MMP networks.** (A) The schematic depicts different information layers contained in the network. Nodes (non-F ligand and the corresponding FSAR set) and node shape account for single- (circle) or multi-target (square) activity. The color of the node represents the potency effect (green: positive, red: negative, yellow: both, and grey: no effect). Edges between nodes are drawn if the corresponding compounds form MMPs (grey). If one of the nodes is a substructure of the other, the edge is colored in blue. A thick black node border indicates the presence of at least one AC in the FSAR set. (B) The network for all 966 FSAR sets is shown. At the top, 85 complex clusters are formed between 3 to 28 FSAR sets. In the middle, FSAR set pairs, formed by two FSAR sets, and at the bottom 337 FSAR sets with no structural neighbors are shown. Exemplary clusters (1, 2, and 3) are encircled in pink and shown in detail in Figure 6 (A, B, and C, respectively).





**Figure 6. Exemplary FSAR sets from the network.** (A) The FSAR set consists of one non-F compound and four fluorinated analogues annotated against the serotonin 2a (5-HT2a) receptor. The fluorinated compounds show negative and positive potency effects and the set contains an AC depending on the position of the fluorine atom. (B) The pair of FSAR sets comprising a non-F compound and three fluorinated analogues in each case with activity against the 5-HT2a receptor. The FSAR sets differ only in a methyl group and show fluorine substitutions at identical sites with the same positive potency effects. (C) A more complex cluster is shown that combines five FSAR sets active against the serotonin 1a (5-HT1a) receptor. The number of fluorinated compounds differs from one to four analogues per set. Three of the five sets have a positive and two no potency effect, although the recurrent *ortho* position of the fluorine atom (highlighted in purple) always shows a significant positive effect.

### 3.4. SAR Rules

The example discussed above revealed frequent potency effects as a consequence of fluorination of closely related compounds. To derive the rules of thumb for fluorination of aminergic GPCR receptor ligands, a statistical analysis of the sites of fluorine substitution and the effects on biological activity was performed. The results indicated that the fluorination of the aromatic ring showed no clear trend towards a positive or negative effect on affinity (556/619 positive/negative fluorinated derivatives, respectively), as reported in Table 1.

**Table 1.** The number of fluorinated compounds in each  $\Delta pPot$  range.

The Type of Fluorine	Fluorine Attached to an Aromatic Carbon	Fluorine Attached to Aliphatic Carbon
no. of positive fluorinated compounds $\Delta pPot > 0.3$	556	21
no. of negative fluorinated compounds $\Delta pPot < -0.3$	619	97
no. of positive AC	16	1
no. of negative AC	22	15

However, analysis of the fluorine substitution site in the aromatic ring showed that fluorine in the ortho position was twice as likely to have a positive effect than a negative one; for the meta and para fluoro derivatives, no trend was observed (Table 2). Surprisingly, fluorine found in the aliphatic moiety of compounds had five times more often a negative influence on biological activity (Table 1). It is worth noting that among 16 aliphatic fluorination-dependent ACs, 15 were negative and only one positive.

**Table 2.** The number of fluorinated aromatic ring site of compounds in each  $\Delta pPot$  range.

The Site of Fluorine Substitution	No. of Positive Fluorinated CPDs $\Delta pPot > 0.3$	No. of Negative Fluorinated CPDs $\Delta pPot < -0.3$
ortho	54	21
meta	55	50
para	125	144

## 4. Conclusions

Herein, we have systematically explored the effects of fluorination on aminergic GPCR ligands. Nearly 1200 non-F ligands were identified for 35 aminergic GPCR targets that had at least one fluorinated analogue. Detailed analysis of newly derived FSAR sets revealed position-dependent effects of compound and identified a limited number of ACs. An overall favourable site for a positive potency effect of fluorination was the ortho position in an aromatic ring. Fluorination of aliphatic fragments more often led to a decrease in biological activity. Although fluorine is generally regarded as a bioisostere of the hydrogen atom, single fluorine substitutions can lead to significant changes in selectivity of bioactive compounds and also change of its biological function (e.g., from inverse agonist to antagonist).

The results presented herein provide insights into the role of fluorine substitutions in ligands of aminergic receptors of class A GPCRs and can be applied in rational drug design to guide modification improving pharmacodynamics.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom11111647/s1>, Table S1: The list of 33 GPCRs, which FSAR sets were identified in the ChEMBL database.

**Author Contributions:** W.P.: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing—original draft, Visualization; R.K.: Conceptualization, Resources, Writing—original draft, Supervision, Project administration; D.S.: Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing—original draft, Visualization; A.J.B.: Writing—original draft, Funding acquisition; J.B.: Conceptualization, Writing, Methodology, Project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was partly supported by the statutory funding from the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Poland.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data were obtained from the ChEMBL database (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>), (accessed on 10 October 2021)).

**Acknowledgments:** W.P. acknowledges the support of InterDokMed project no. POWR.03.02.00-00-I013.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Ursu, O.; Holmes, J.; Bologa, C.G.; Yang, J.J.; Mathias, S.L.; Stathias, V.; Nguyen, D.T.; Schürer, S.; Oprea, T. DrugCentral 2018: An update. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D963–D970. [[CrossRef](#)]
2. Santos, R.; Ursu, O.; Gaulton, A.; Bento, A.P.; Donadi, R.S.; Bologa, C.G.; Karlsson, A.; Al-Lazikani, B.; Hersey, A.; Oprea, T.I.; et al. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *16*, 19–34. [[CrossRef](#)]
3. Hauser, A.S.; Attwood, M.M.; Rask-Andersen, M.; Schiöth, H.B.; Gloriam, D.E. Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 829–842. [[CrossRef](#)]
4. Mohammad Nezhady, M.A.; Rivera, J.C.; Chemtob, S. Location Bias as Emerging Paradigm in GPCR Biology and Drug Discovery. *iScience* **2020**, *23*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wacker, D.; Stevens, R.C.; Roth, B.L. How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell* **2017**, *170*, 414–427. [[CrossRef](#)]
6. Oprea, T.I.; Bologa, C.G.; Brunak, S.; Campbell, A.; Gan, G.N.; Gaulton, A.; Gomez, S.M.; Guha, R.; Hersey, A.; Holmes, J.; et al. Unexplored therapeutic opportunities in the human genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 317–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Böhm, H.J.; Banner, D.; Bendels, S.; Kansy, M.; Kuhn, B.; Müller, K.; Obst-Sander, U.; Stahl, M. Fluorine in Medicinal Chemistry. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 637–643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Shah, P.; Westwell, A.D. The role of fluorine in medicinal chemistry. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 527–540. [[CrossRef](#)]
9. Swallow, S. Fluorine in Medicinal Chemistry. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Elsevier B.V.: Edinburgh, UK, 2015; Volume 54, pp. 65–133, ISBN 0306-0012.
10. Mei, H.; Han, J.; Fustero, S.; Medio-Simon, M.; Sedgwick, D.M.; Santi, C.; Ruzziconi, R.; Soloshonok, V.A. Fluorine-Containing Drugs Approved by the FDA in 2018. *Chem.–Eur. J.* **2019**, *25*, 11797–11819. [[CrossRef](#)]
11. Liang, T.; Neumann, C.N.; Ritter, T. Introduction of Fluorine and Fluorine-Containing Functional Groups. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8214–8264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Xing, L.; Blakemore, D.C.; Narayanan, A.; Unwalla, R.; Lovering, F.; Denny, R.A.; Zhou, H.; Bunnage, M.E. Fluorine in drug design: A case study with fluoroanisoles. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 715–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Gaulton, A.; Hersey, A.; Nowotka, M.; Bento, A.P.; Chambers, J.; Mendez, D.; Mutowo, P.; Atkinson, F.; Bellis, L.J.; Cibrián-Uhalte, E.; et al. The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D945–D954. [[CrossRef](#)]
14. Vass, M.; Podlewska, S.; De Esch, I.J.P.; Bojarski, A.J.; Leurs, R.; Kooistra, A.J.; De Graaf, C. Aminergic GPCR-Ligand Interactions: A Chemical and Structural Map of Receptor Mutation Data. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 3784–3839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hussain, J.; Rea, C. Computationally efficient algorithm to identify matched molecular pairs (MMPs) in large data sets. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 339–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kenny, P.W.; Sadowski, J. Structure Modification in Chemical Databases. In *Chemoinformatics in Drug Discovery*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2005; Volume 23, pp. 271–285.
17. Hu, X.; Hu, Y.; Vogt, M.; Stumpfe, D.; Bajorath, J. MMP-cliffs: Systematic identification of activity cliffs on the basis of matched molecular pairs. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1138–1145. [[CrossRef](#)]
18. Stumpfe, D.; Hu, Y.; Dimova, D.; Bajorath, J. Recent progress in understanding activity cliffs and their utility in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 18–28. [[CrossRef](#)]
19. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504. [[CrossRef](#)]

20. Bajorath, J.; Hu, Y.; Stumpfe, D. Advancing the activity cliff concept. *F1000Research* **2013**, *2*, 199. [[CrossRef](#)]
21. Pietruś, W.; Kurczab, R.; Kafel, R.; Machalska, E.; Kalinowska-Tłuścik, J.; Hogendorf, A.; Żylewski, M.; Baranska, M.; Bojarski, A.J. How can fluorine directly and indirectly affect the hydrogen bonding in molecular systems? – A case study for monofluoroanilines. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, *252*, 119536. [[CrossRef](#)]
22. Dubost, E.; Dumas, N.; Fossey, C.; Magnelli, R.; Butt-Gueulle, S.; Ballandonne, C.; Caignard, D.H.; Dulin, F.; Sopkova De-Oliveira Santos, J.; Millet, P.; et al. Synthesis and structure-affinity relationships of selective high-affinity 5-HT4 receptor antagonists: Application to the design of new potential single photon emission computed tomography tracers. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9693–9707. [[CrossRef](#)]
23. Moree, W.J.; Jovic, F.; Coon, T.; Yu, J.; Li, B.F.; Tucci, F.C.; Marinkovic, D.; Gross, R.S.; Malany, S.; Bradbury, M.J.; et al. Novel benzothiophene H1-antihistamines for the treatment of insomnia. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2316–2320. [[CrossRef](#)]
24. Micheli, F.; Holmes, I.; Arista, L.; Bonanomi, G.; Braggio, S.; Cardullo, F.; Di Fabio, R.; Donati, D.; Gentile, G.; Hamprecht, D.; et al. Dopamine D3 receptor antagonists: The quest for a potentially selective PET ligand. Part two: Lead optimization. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4011–4013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Grundt, P.; Prevatt, K.M.; Cao, J.; Taylor, M.; Floresca, C.Z.; Choi, J.K.; Jenkins, B.G.; Luedtke, R.R.; Newman, A.H. Heterocyclic analogues of N-(4-(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)butyl) arylcarboxamides with functionalized linking chains as novel dopamine D3 receptor ligands: Potential substance abuse therapeutic agents. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4135–4146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Xiong, Y.; Ullman, B.; Choi, J.S.K.; Cherrier, M.; Strah-Pleyne, S.; Decaire, M.; Dosa, P.I.; Feichtinger, K.; Teegarden, B.R.; Frazer, J.M.; et al. Synthesis and in vivo evaluation of phenethylpiperazine amides: Selective 5-hydroxytryptamine2A receptor antagonists for the treatment of insomnia. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5696–5706. [[CrossRef](#)]
27. Blass, B. Sulfonamide Derivatives and Pharmaceutical Applications Thereof. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 12–14. [[CrossRef](#)]
28. Dounay, A.B.; Barta, N.S.; Campbell, B.M.; Coleman, C.; Collantes, E.M.; Denny, L.; Dutta, S.; Gray, D.L.; Hou, D.; Iyer, R.; et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of phenoxy pyridyl derivatives as dual norepinephrine reuptake inhibitors and 5-HT1A partial agonists. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1114–1117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Contents lists available at ScienceDirect

## European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

## Tuning the activity of known drugs via the introduction of halogen atoms, a case study of SERT ligands – Fluoxetine and fluvoxamine

Jakub Staroń<sup>\*</sup>, Wojciech Pietruś, Ryszard Bugno, Rafał Kurczab, Grzegorz Satała, Dawid Warszyci, Tomasz Lenda, Anna Wantuch, Adam S. Hogendorf, Agata Hogendorf, Beata Duszyńska, Andrzej J. Bojarski

Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, 12 Smętna Street, 31-343, Kraków, Poland

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 December 2020

Received in revised form

22 April 2021

Accepted 27 April 2021

Available online 14 May 2021

## Keywords:

Serotonin

SERT

Halogen bond

XSAR

Halogen-hydrogen bond

## ABSTRACT

The selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), acting at the serotonin transporter (SERT), are one of the most widely prescribed antidepressant medications. All five approved SSRIs possess either fluorine or chlorine atoms, and there is a limited number of reports describing their analogs with heavier halogens, i.e., bromine and iodine. To elucidate the role of halogen atoms in the binding of SSRIs to SERT, we designed a series of 22 fluoxetine and fluvoxamine analogs substituted with fluorine, chlorine, bromine, and iodine atoms, differently arranged on the phenyl ring. The obtained biological activity data, supported by a thorough *in silico* binding mode analysis, allowed the identification of two partners for halogen bond interactions: the backbone carbonyl oxygen atoms of E493 and T497. Additionally, compounds with heavier halogen atoms were found to bind with the SERT via a distinctly different binding mode, a result not presented elsewhere. The subsequent analysis of the prepared XSAR sets showed that E493 and T497 participated in the largest number of formed halogen bonds. The XSAR library analysis led to the synthesis of two of the most active compounds (3,4-diCl-fluoxetine **42**, SERT  $K_i = 5$  nM and 3,4-diCl-fluvoxamine **46**, SERT  $K_i = 9$  nM, fluoxetine SERT  $K_i = 31$  nM, fluvoxamine SERT  $K_i = 458$  nM). We present an example of the successful use of a rational methodology to analyze binding and design more active compounds by halogen atom introduction. ‘XSAR library analysis’, a new tool in medicinal chemistry, was instrumental in identifying optimal halogen atom substitution.

© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Serotonin transporter (SERT) is a monoamine transporter-type protein composed of a 630 amino acid chain that forms 12 transmembrane domains [1,2]. It is located at the presynaptic axon terminal and somatodendritic end of neurons [3] and regulates serotonin transmission by removing serotonin from the extracellular space [2]. Extensive research has shown that patients with a functional polymorphism in the promoter region of the SERT gene exhibit more depressive behavior in response to life events, thus supporting the role of SERT in the regulation of mood disorders [4,5].

Halogen atoms are among the most popular substituents utilized for the optimization of the properties of biologically active

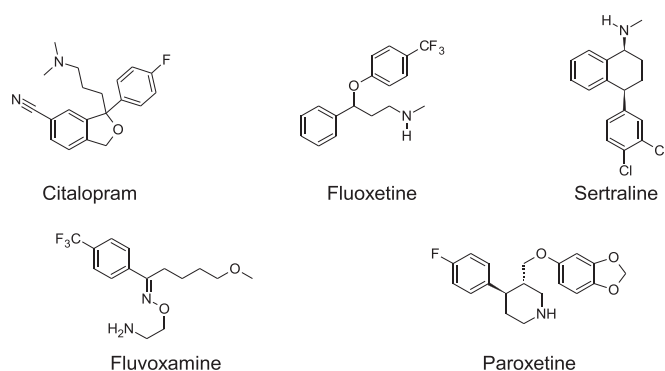
compounds. They can form both hydrophobic and electrostatic interactions with biological targets. The latter are mainly represented by the halogen bond, which according to IUPAC definition is “a net attractive interaction between an electrophilic region associated with a halogen atom in a molecular entity and a nucleophilic region in another, or the same, molecular entity” [6]. In particular, the halogen bond is formed between the electron deficiency region, called the  $\sigma$ -hole, on top of the halogen atom and a Lewis base, most often oxygen from the carbonyl group of the peptide chain [7,8]. The size of the  $\sigma$ -hole strictly determines the strength of the halogen bond. It is greatest for iodine and smallest for chlorine. Moreover, its size can be modified by the introduction of neighboring electron-withdrawing groups. Several studies have shown that additional fluorine atoms in halobenzenes greatly increase the size of the  $\sigma$ -hole [9–11]. The construction of a halogen bond strictly defines its geometry. The optimal interaction is of near linear nature, where the angle donor (D)-halogen (X)···acceptor (A) is 160–180° and the distance between halogen and acceptor is

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: [jakubstaron@gmail.com](mailto:jakubstaron@gmail.com) (J. Staroń).

much shorter than the sum of atomic van der Waals radii (80%) and is equal to 3.06 Å for chlorine, 3.15 Å for bromine and 3.24 Å for iodine [12].

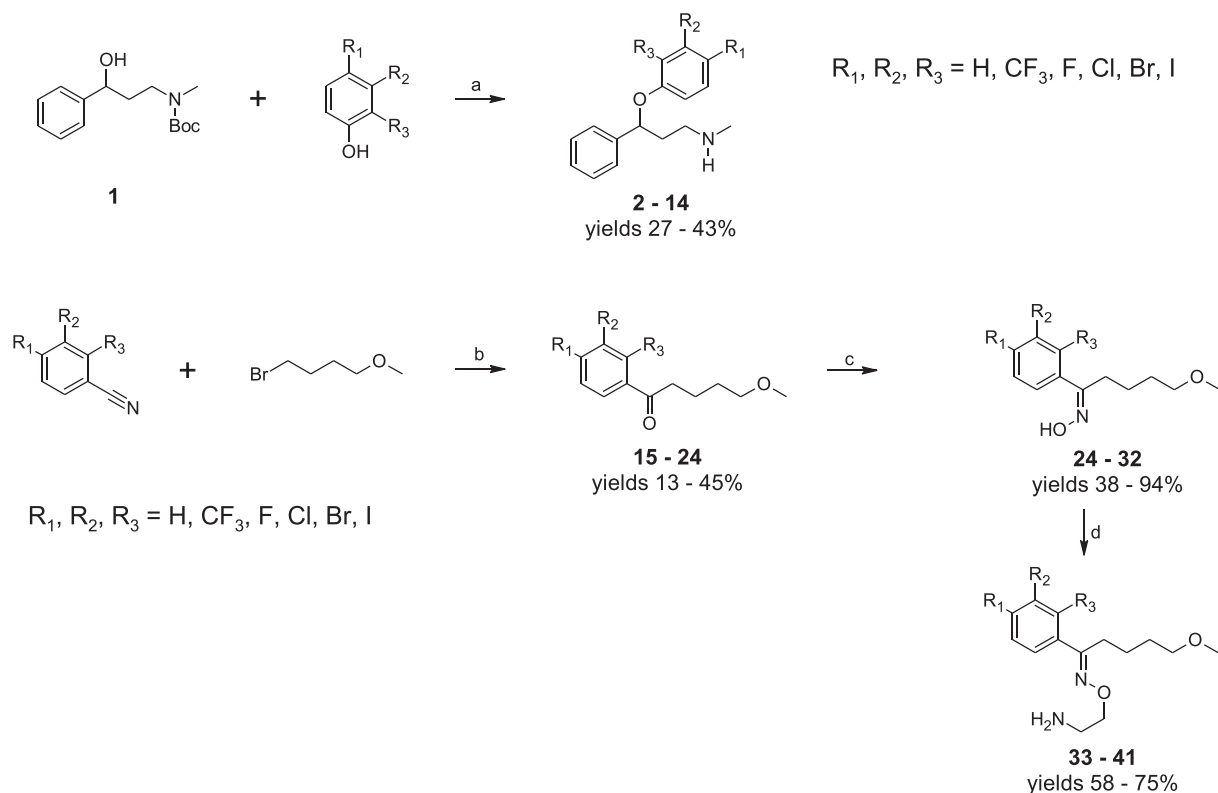
All five approved selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) possess halogen atom(s) in their structure (Fig. 1); four possess fluorine and one a chlorine atom. A limited number of biological activity data of SSRI analogs with heavier halogens can be found, and no consistent conclusion on the significance of halogen(s) can be derived. Substitution of fluorine for chlorine in citalopram caused a slight increase in binding affinity ( $IC_{50} = 59$  nM [13] to  $IC_{50} = 49$  nM [13], respectively), whereas introduction of a bromine decreased it ( $IC_{50} = 121$  nM [13]). In the case of fluoxetine (SERT  $K_i = 17$  nM [14]), replacement of the trifluoromethyl group with fluorine and chlorine caused a decrease in binding affinity ( $K_i = 142$  nM [14] and 638 nM [14], respectively), while an iodine



**Fig. 1.** Structures of FDA-approved selective serotonin reuptake inhibitors (data from <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/InformationbyDrugClass/ucm283587.htm>).

derivative exhibited a slight increase in binding affinity ( $K_i = 14.4$  nM [15]). Fluvoxamine substitutions with fluorine, chlorine, and bromine can be found in the patent literature, but no complimentary biological data allowing comparison are available [16]. In turn, the SAR of the different halogenated modafinil analogs can be found in a study by Okunola-Bakare et al., where substitution of chlorine with bromine slightly increased the binding affinity to SERT (29.8 nM for chlorine derivative and 26.1 nM for bromine derivative) [17]. Additionally, biological data for bromo-paroxetine were also reported. Substitution of fluorine to bromine decreased the binding affinity 13-fold (from  $K_i = 0.08$  nM, for paroxetine to  $K_i = 1.07$  nM for Br-paroxetine); however, the new compound maintained high activity [18]. A survey of the ChEMBL database (release 25) revealed that out of 3529 stored SERT ligands (with activity < 1000 nM), 145 contain the  $CF_3$  group, 768 contain fluorine, 1207 contain chlorine, 101 contain bromine, and 48 contain iodine. It is apparent that there are significantly fewer derivatives with heavier halogens – bromine and iodine – than with fluorine, despite their often greater affinity for SERT. The small number of heavier halogens can be explained by a general tendency in the pharmaceutical industry to avoid these atoms in drug chemical structures.

Even less information can be found regarding the analysis of the role of halogen atoms in binding to SERT. The only remark about a halogen binding pocket in SERT was published in 2009 by Zhou et al. in a study investigating the specificity of serotonin transporter inhibitors: sertraline and both isomers of fluoxetine [19]. Zhou et al. found that SSRIs bind to the extracellular vestibule in the LeuT protein (a bacterial leucine transporter) in a manner in which halogen atoms from all compounds align in a pocket formed by L25, G26, L29, R30, Y108, I111, and F253, which was called the halogen binding pocket (HBP). Moreover, the HBP sequence homology



**Scheme 1.** Synthesis of fluoxetine and fluvoxamine analogs. (a)  $PPH_3$ , DIAD, THF, conc.  $H_3PO_4$ , rt; (b) Mg,  $Et_2O$ , reflux; (c)  $NH_2OH \cdot HCl$ , NaOAc, EtOH, rt; (d) 2-chloroethylamine hydrochloride, KOH, DMF, rt.

between LeuT, SERT, NET, and DAT is high. The only difference between NET (norepinephrine transporter), DAT (dopamine transporter), and SERT is one amino acid, i.e., A77, A81, and G100, respectively. This suggested that in human SERT, these SSRIs might bind similarly. To test their hypothesis, Zhou et al. analyzed the binding of SSRIs to SERT mutants with, among others, mutated amino acids forming or neighboring the HBP. All reported mutations caused a decrease in affinity.

In this study, we performed an analysis of halogen substitution on two of the FDA-approved (Food and Drug Administration) SSRIs, fluoxetine and fluvoxamine, to investigate the role of halogen atoms in SERT ligand binding. In the synthesized fluoxetine and fluvoxamine analogs, the trifluoromethyl group was substituted with fluorine, chlorine, bromine, and iodine. Moreover, for chlorine, bromine, and iodine derivatives, an additional fluorine atom was introduced to alter the electron density distribution on the halogen atom. Here, the results of a radioligand displacement binding experiment performed for SERT and an analysis of the binding mode based on induced fit docking and molecular dynamics are presented.

## 2. Chemistry

Fluoxetine, together with its analogs, was synthesized using a two-step, one-pot procedure involving a Mitsunobu reaction of *tert*-butyl *N*-(3-hydroxy-3-phenylpropyl)-*N*-methylcarbamate with appropriate phenol and subsequent deprotection (Scheme 1). In turn, the synthesis of fluvoxamine analogs consisted of three steps: Grignard reaction of 1-bromo-4-methoxybutane with appropriate nitrile, condensation with hydroxylamine, and finally, substitution with 2-chloroethylamine (Scheme 1).

## 3. Results

### 3.1. Biological activity

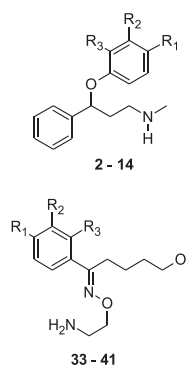
Binding affinity constants for SERT were measured using a radioligand displacement experiment (Table 1). Among the synthesized analogs, the exchange of trifluoromethyl groups into heavier halogens (chlorine, bromine, and iodine) generally causes an increase in binding affinity (Fig. 2). Additionally, the simultaneous introduction of a fluorine atom results in more active compounds (13, 14, 38–41). This is true for all compounds except the 2,4-substitution of fluoxetine, where the fluorine atom decreases the binding affinity 1.6- and 1.3-fold (compounds 10 and 11, respectively). Changing the CF<sub>3</sub> group into a fluorine atom in both cases (compounds 4 and 34) lowers the binding affinity 17- and 3.5-fold, respectively. In turn, shifting the fluorine to the C-3 position in fluoxetine analog 5 slightly increases (1.9-fold) the binding affinity. A similar effect can be observed in the case of 3-chloro fluoxetine analog 7, with a 1.2-fold increase.

### 3.2. Molecular modeling

An induced fit docking protocol (IFD) was used to investigate the phenomenon behind the observed structure-activity relationship. The protocol utilized the SERT model based on the SERT crystal structure (PDB ID: 5I6X). Among all of the ligand poses that were returned, each of the docked analogs was found in two different binding modes (Fig. 3). In the first mode, the compound is located analogously, as can be found in the published crystal structures of SERT-SSRI complexes [20,21]. The trifluoromethyl/halogen moiety is located in a lipophilic pocket between helices TM3 and TM8, surrounded by residues I172, A173, Y176, and L443, and the basic nitrogen atom forms a hydrogen bond with aspartic acid D98. In the

**Table 1**

Binding affinity values for synthesized fluoxetine and fluvoxamine analogs.



Cmpd	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	SERT K <sub>i</sub> [nM]
<b>2 (ST-213)</b>	H	H	H	<b>1458</b>
<b>3<sup>a</sup> (ST-129)</b>	CF <sub>3</sub>	H	H	<b>31</b>
<b>4 (ST-143)</b>	F	H	H	<b>543</b>
<b>5 (ST-215)</b>	H	F	H	<b>349</b>
<b>6 (ST-141)</b>	Cl	H	H	<b>55</b>
<b>7 (ST-214)</b>	H	Cl	H	<b>66</b>
<b>8 (ST-132)</b>	Br	H	H	<b>24</b>
<b>9 (ST-137)</b>	I	H	H	<b>14</b>
<b>10 (ST-130)</b>	Cl	H	F	<b>52</b>
<b>11 (ST-133)</b>	Br	H	F	<b>41</b>
<b>12 (ST-138)</b>	I	H	F	<b>23</b>
<b>13 (ST-131)</b>	Cl	F	H	<b>31</b>
<b>14 (ST-134)</b>	Br	F	H	<b>19</b>
<b>33<sup>b</sup> (ST-110)</b>	CF <sub>3</sub>	H	H	<b>458</b>
<b>34 (ST-111)</b>	F	H	H	<b>1617</b>
<b>35 (ST-112)</b>	Cl	H	H	<b>61</b>
<b>36 (ST-113)</b>	Br	H	H	<b>23</b>
<b>37 (ST-201)</b>	I	H	H	<b>15</b>
<b>38 (ST-118)</b>	Cl	H	F	<b>202</b>
<b>39 (ST-121)</b>	Br	H	F	<b>137</b>
<b>40 (ST-119)</b>	Cl	F	H	<b>62</b>
<b>41 (ST-120)</b>	Br	F	H	<b>21</b>

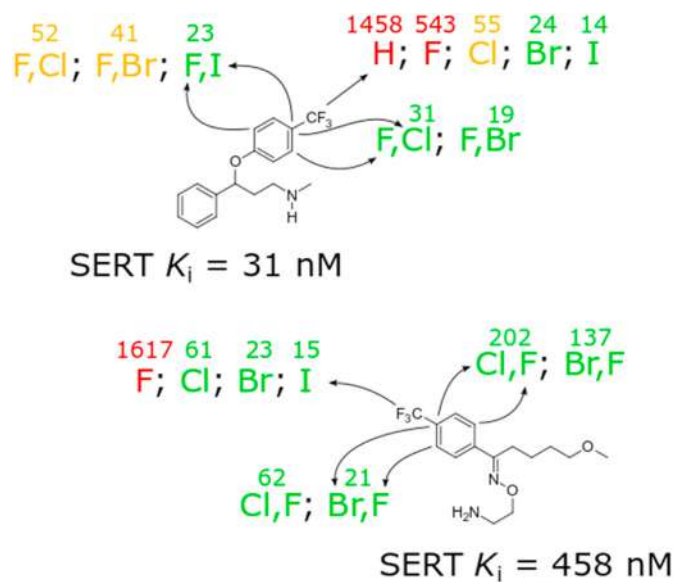
Binding affinity, K<sub>i</sub>, expressed as the average of at least two independent experiments; the maximum S.D. did not exceed 10% (see Supplementary Information, page 20, Table 4).

<sup>a</sup> Fluoxetine.

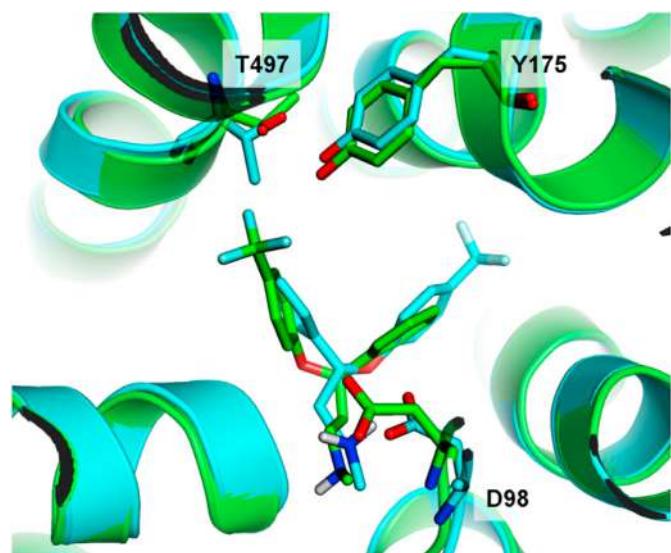
<sup>b</sup> Fluvoxamine.

case of the fluoxetine complex, the phenyl ring lies in proximity to F335 and F341. In turn, the oxygen atom of the fluvoxamines' methoxybutyl chain forms a hydrogen bond with the hydroxyl group of Y175. In the second mode, the compound is flipped, and now the trifluoromethyl/halogen moiety is directed towards helix TM10, pointing into residues E493 or T497. In this position, the halogen atom (chlorine, bromine) was found to be engaged in a halogen bond with the backbone oxygen of these residues. In turn, the iodine atom of 9 positioned itself between helices TM10 and TM3, where it is surrounded by a net of interactions with three residues: hydroxyl of T497, guanidine of R104, and hydroxyl of T176. In most cases, the geometrical parameters of the formed halogen bonds fit into the optimal boundaries (Fig. 4, Table 3). The basic nitrogen atom still maintains a hydrogen bond with D98.

To further analyze the observed SAR, extensive molecular dynamics simulations were carried out for the most active derivatives (8, 9, 35, 36, 37, 41). The starting poses were picked only from a group representing the second mode of binding, because only there halogen atoms may find a partner for interaction. For every investigated analog, the halogen atom quickly forms and maintains a directed interaction (numerical analysis of the geometrical parameters of halogen bonds is presented in Supplementary Information). For chlorine and bromine derivatives (8, 35, 36, 41), the



**Fig. 2.** Structure-activity relationship for the synthesized fluoxetine and fluvoxamine analogs. Binding affinity ( $K_i$  [nM]) is given above substituent symbols. Color codes represent general binding affinity change relative to trifluoromethyl reference compounds: red – large decrease, orange – moderate decrease, and green – no change or increase.



**Fig. 3.** Two ligand poses were obtained through IFD (compound **3** – fluoxetine as an example). A cyan structure marks a pose found in the SERT crystal structures. In this position, the trifluoromethyl group is located between helices TM3 and TM8 and is surrounded by residues I172, A173, Y176, and L443. A green structure marks a pose that was a result of induced fit docking. Here, the trifluoromethyl group faces towards helix TM10.

interaction is formed with the backbone oxygen of G493 or T497. In the case of iodine derivative **37**, the halogen bond is also formed with the backbone oxygen of G493. In turn, the iodine derivative of fluoxetine **9** forms a halogen bond with the backbone oxygen of T497 and guanidine nitrogen of R104. To further investigate the correlation between the type of halogen atom and the strength of ligand-receptor interactions, the magnitude of the  $\sigma$ -hole was calculated (Table 2). The highest value is represented by compound **12** (45.7 kcal/mol), and the lowest value is represented by compound **6** (23.5 kcal/mol). Four analogs **9**, **12**, **37**, and **39** exhibit high

values (41.8, 45.7, 45.3, and 42.8, respectively), five analogs **11**, **14**, **36**, **38**, and **41** moderate values (37.3, 36.7, 37.10, 39.5, and 37.6, respectively) and another five analogs **8**, **10**, **13**, **35** and **40** low values (33.3, 33.4, 32.3, 33.5 and 33.4, respectively) of the  $\sigma$ -hole magnitude (a table with all of the data is shown in Supplementary Information).

### 3.3. Using XSAR sets to evaluate the role of halogens in Ligand-Protein complexes

Most of the identified halogen bonds are formed either with the T497 or E493 of SERT. The QPLD/GBSA (quantum-polarized ligand docking/generalized Born and surface area solvation) docking procedure and XSAR data were used to probe the SERT binding site to determine the amino acids most frequently targeted by halogen bonding. This particular methodology was previously used for a case study of the 5-HT<sub>7</sub> and D<sub>4</sub>R receptors [22,23]. It is based on docking of a library of ligands to receptor proteins (either homology models or crystal structures) and subsequent analysis of ligand-receptor complexes with QPLD and GBSA. The obtained XSAR library for SERT was clustered into 79 sets and used to create an XSAR matrix showing positive changes in SERT activity upon exchange of hydrogen to halogen (simplified, representative data shown in Table 4, full matrix shown in Supplementary Information). We found one primary (E493) and three secondary (T497, S438, and S439) halogen bonding hot spots (a representative binding mode of two selected sets of compounds is presented in Fig. 5). The average increase in activity caused by the halogen bonds is equal to 95.52, whereas the median activity increase is equal to 8.3. A remarkable 1885-fold change in activity was recorded for set177, where two vicinal chlorine atoms formed two halogen bonds with E493 and T497. Similarly, two chlorine atoms in set124 yielded a 1760-fold increase in activity.

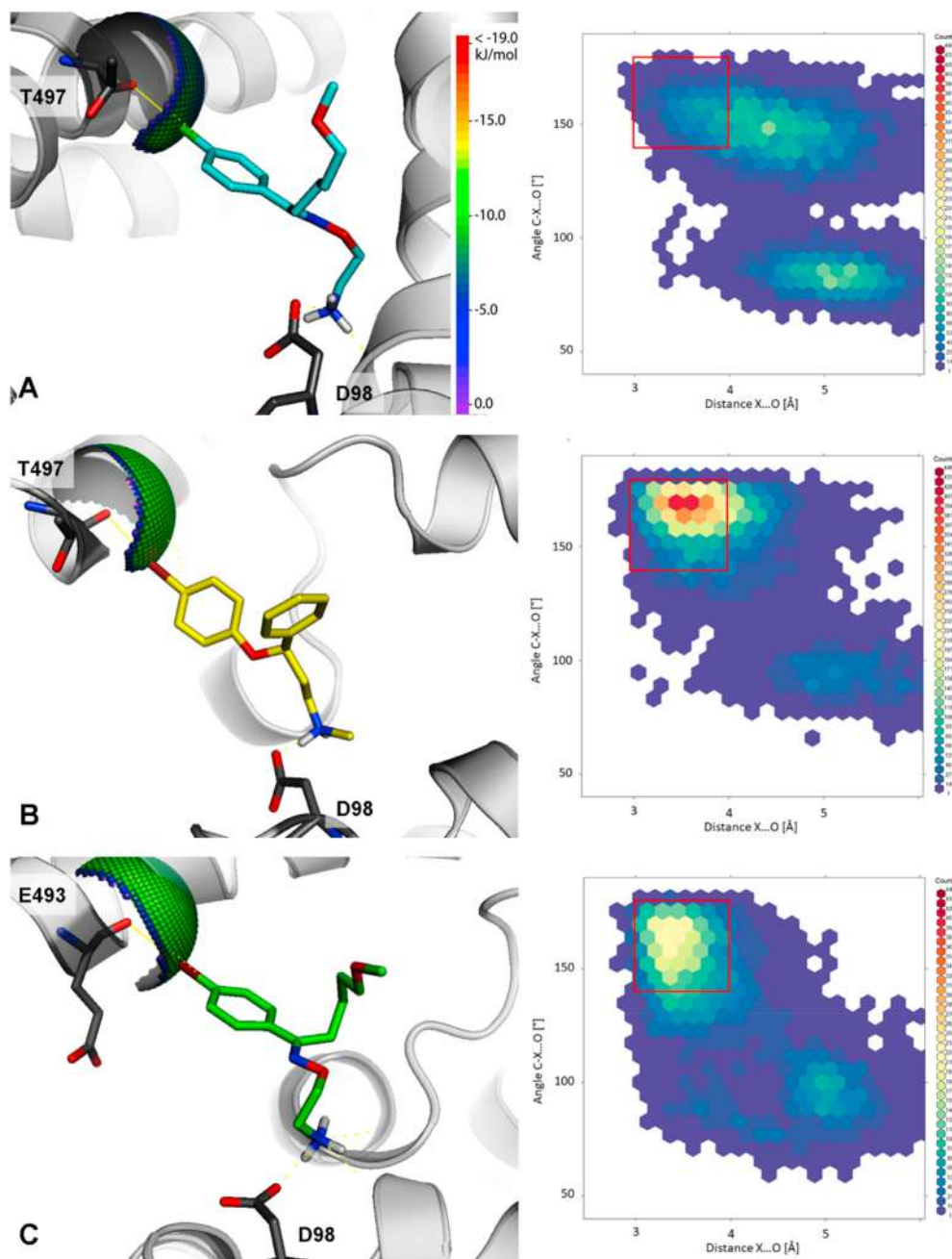
### 3.4. Synthesis of 3,4-dichloro analogs of fluoxetine and fluvoxamine

The outstanding activity reported for compounds with two vicinal chlorine atoms prompted us to synthesize 3,4-dichloro analogs of fluoxetine and fluvoxamine. The synthesis of both compounds was performed according to Scheme 1 (see Supplementary Information). To our great surprise, both derivatives were found to be more active than the best binding 4-iodo analog (Table 5). The Xeffect of compound **42** is equal to 291 (compared to compound **2**). Compound **46** is 51-fold more active than the parent fluvoxamine (compound **33**). To visualize the halogen bond interactions responsible for the increase in activity, induced fit docking was performed (Fig. 6).

### 3.5. Quantum mechanics calculations

The intriguing binding affinity changes, observed in the synthesized series of compounds, prompted us to perform a thorough analysis of the nature of interactions formed by halogen atoms with the transporter residues. Because of the extensiveness of the calculations, only a series of mono-substituted fluoxetine analogs (compounds **4**, **6**, **8**, **9**), supplemented by the dichloro analog (compound **42**), were selected for this task. First, the refined poses obtained from the IFD were again refined using quantum mechanics methods. The obtained poses were subjected to the extended transition state-natural orbitals for chemical valence (ETS-NOCV) and Bader's quantum theory of atoms in molecules (QTAIM) analyses [24–26]. As a result, decomposition of halogen interaction energy was obtained (Table S5, Supplementary Information). The QTAIM analysis allowed us to identify that, in addition to halogen bonds, hydrogen bonds are also a large contributor to





**Fig. 4.** Halogen bonds that were identified through the induced fit docking experiment. Next, to each figure, a 2D heat map representation of a halogen interaction is given, and the red rectangle marks the best geometric parameters of the interaction, i.e.,  $140^\circ < \text{angle} < 180^\circ$  and  $3 \text{ \AA} < \text{distance} < 4 \text{ \AA}$ . (A) The chlorine atom of **35** forms a halogen bond with a backbone oxygen of T497, the distance  $X \dots O = 3.12 \text{ \AA}$ , the angle  $C-\text{Cl} \dots O = 172.3^\circ$ ; (B) the bromine atom of **8** forms a halogen bond with a backbone oxygen of G493, the distance  $X \dots O = 3.09 \text{ \AA}$ , the angle  $C-\text{Br} \dots O = 172.3^\circ$ ; (C) the bromine atom of **36** forms a halogen bond with a backbone oxygen of G493, the distance  $X \dots O = 3.15 \text{ \AA}$ , the angle  $C-\text{Br} \dots O = 172.3^\circ$ . The chlorine(bromine)–oxygen theoretical interaction sphere illustrates the projected qualities of the formed L–R halogen bonds.

**Table 2**

Calculated values of the magnitude of  $\sigma$ -hole [kcal/mol] ( $\sigma$ -hole mgnd).

Fluoxetine analogs								
Cmpd	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>12</b>
Halogen substitution pattern	4Cl	4Cl2F	4Cl3F	4Br	4Br2F	4Br3F	4I	4I2F
$\sigma$ -hole mgnd [kcal/mol]	29.7	33.4	32.3	33.5	37.3	36.7	41.8	45.7
Fluvoxamine analogs								
Cmpd	<b>35</b>	<b>38</b>	<b>40</b>	<b>36</b>	<b>39</b>	<b>41</b>	<b>37</b>	
Halogen substitution pattern	4Cl	4Cl2F	4Cl3F	4Br	4Br2F	4Br3F	4I	
$\sigma$ -hole mgnd [kcal/mol]	33.5	39.5	33.4	37.1	42.8	37.6	45.3	

**Table 3**

Average geometric (distance and angle) parameters of halogen bonds formed between halogens of investigated structures and amino acids of the SERT, measured during 100 ns of performed molecular dynamics. The most optimal parameters of halogen bonds were described as distance <4.25 Å and angle >135° for iodine; distance <3.75 Å and angle >145° for bromine; distance <3.75 Å and angle >150° for chlorine [11].

Compound	X atom	Amino acid	Distance X ... A [Å]	Angle C-X ... A [°]
<b>8</b>	Br	T497	3.74 ± 0.41	161.78 ± 12.88
		R104	3.76 ± 0.37	87.34 ± 9.19
<b>9</b>	I	T497	4.14 ± 0.38	137.88 ± 9.62
		E493	4.95 ± 0.97	121.70 ± 11.33
<b>35</b>	Cl	T497	4.43 ± 0.64	148.08 ± 12.03
<b>36</b>	Br	T497	3.97 ± 0.75	136.34 ± 30.24
<b>37</b>	I	E493	4.95 ± 0.97	121.70 ± 11.33
<b>41</b>	Br	E493	4.17 ± 0.87	134.63 ± 28.08

the interaction with the transporter (a representative data for compound **42**, shown in Fig. 7, full results in Supplementary

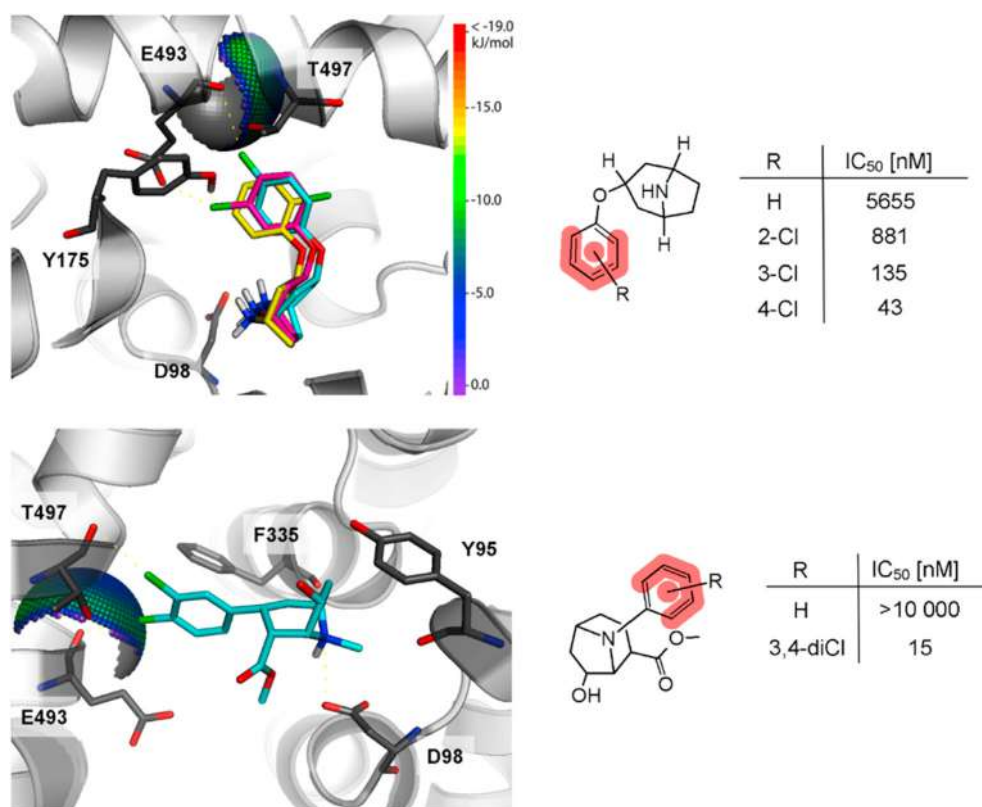
Information pages 20–24). For the mono-chlorine derivative **6**, halogen bonds share 40% of the total interaction energy. This contribution increases slightly with the size of the halogen atom, reaching 43% and 54% for the bromine **8** and iodine **9** analogs, respectively. In turn, for the most active vicinal di-Cl analog **42**, the hydrogen bonds are responsible for 61% of the total interaction energy. Apart from the above, we also observed the presence of X-HBD (halogen – hydrogen bond donor interaction, expressed also as HBeXB – HB enhanced XB [27]), formed between halogen atoms and hydroxyl group of threonine T497 or tyrosine Y175. Such interactions have already been recognized as being highly favorable to the ligand-protein interactions, through the enhancement of halogen bonds energies [28,29]. In our study, for the most active compound **42**, this interaction has the highest overall contribution to the binding energy (–5.0 and –1.7 kcal/mol, formed with a side chain of T497, simultaneously). Meanwhile, in the case of an iodine analog **9**, XB and X-HBD interactions have equal contribution in the

**Table 4**

A representative simplified XSAR matrix (full matrix shown in Supplementary Information) generated for 79 sets showing positive changes in SERT activity upon exchange of hydrogen with halogens: chlorine, bromine or iodine. Values depicted under aa. represent scoring functions that rate the quality of interaction; a value equal to 1 correlates with the most favorable and 0.25 for the least favorable interaction. Orange color states for a halogen bond formed with a backbone carbonyl oxygen, green for a halogen bond formed with a heteroatom at side chain of an amino acid and blue for a hybrid halogen-hydrogen bond formed either with a backbone or side chain. The sum of all scoring values is equal to 104.5. At the bottom of the table, this value is used to rate the frequency of interactions with particular amino acids. Most frequently, halogen bonds are formed with E493 (primary halogen bonds). The average activity increase for hydrophobic interactions is 4.81, for the halogen bond interaction is 95.52, whereas for halogen-hydrogen bonds, it is 141.45.

set_ID	n-fold change in activity upon introduction of halogen (Xeffect)				Amino acid that is an acceptor of the halogen bond							comments		
	H	Cl	Br	I	E493	T497	S438	S439	S336	T175	T176			
set484	1	158.8	0	0	0.75			0.5		0.75		two XB <sup>a</sup>		
set1534	1	132.5	0	0	1		0.75					CB <sup>b</sup>		
set1683	1	31.3	0	0	0.75			0.5				CB <sup>b</sup>		
set117	1	36.7	55	0	0.75									
	1	165	0	0	0.75		0.5							
	1	1885.7	0	0	1	0.75	0.5					two XB <sup>a</sup>		
	1	2.3	0	0								HBI <sup>c</sup>		
set124	1	2.8	0	0								HBI <sup>c</sup>		
	1	106.9	381.3	0			0.75							
set211	1	1760	0	0	1	0.75						two XB <sup>a</sup>		
	1	41.8	41.6	0	0.5					1				
	1	131.5	0	0	1		0.5							
set141	1	6.4	0	0								HBI <sup>c</sup>		
	1	1.5	2.5	0				0.75						
set204	1	5	0	0			0.75							
	1	258.4	256.4	0	1					1				
set561	1	21.7	0	0	1		0.5							
	1	33.2	0	0						1		HBI <sup>c</sup>		
	1	945	0	0	0.75	0.5				0.75		two XB <sup>a</sup>		
set937	1	700	0	0	0.75									
set937	1	666.7	0	0	1	0.5	1					two XB <sup>a</sup>		
set1047	1	91.8	0	0	1									
					...									
					sum									
					46	7.75	8.25	11.25	14	1.25	16	0		
total score <sup>d</sup>					104.5	0.44	0.07	0.08	0.11	0.13	0.01	0.15	0.00	

<sup>a</sup>XB – halogen bond; <sup>b</sup>CB – competitive binding, the halogen bond is formed alternatively with different partners; <sup>c</sup>HBI – hydrophobic interaction, <sup>d</sup> values given for complete data (Supplementary Information, page 11).



**Fig. 5.** The binding modes of the two selected major increases in the biological activity of SERT ligands upon the introduction of a halogen atom. In the upper example, walking the chlorine around the phenyl ring (XSAR set211) increased the IC<sub>50</sub> value 131-fold (compared with the derivative with no substituents) through the formation of a halogen bond with backbone oxygen of E493. The lower part of the figure represents a compound possessing two chlorine atoms in the meta and para positions (XSAR set937) that form two halogen bonds, with E493 and T497. This halogen arrangement causes a 666-fold increase in activity at SERT.

**Table 5**  
Binding affinity values for synthesized 3,4-dichloro analogs of fluoxetine and fluvoxamine.

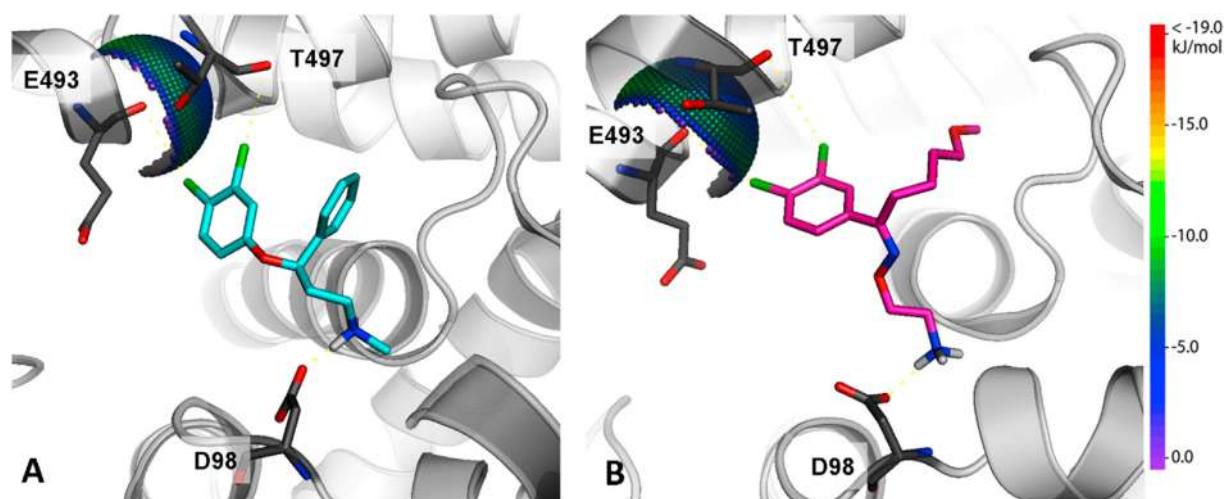
Cmpd	Structure	SERT K <sub>i</sub> [nM]
42		5
46		9

Binding affinity, K<sub>i</sub>, expressed as the average of at least two independent experiments; the maximum S.D. did not exceed 10% (see Supplementary Information, page 20, Table 4).

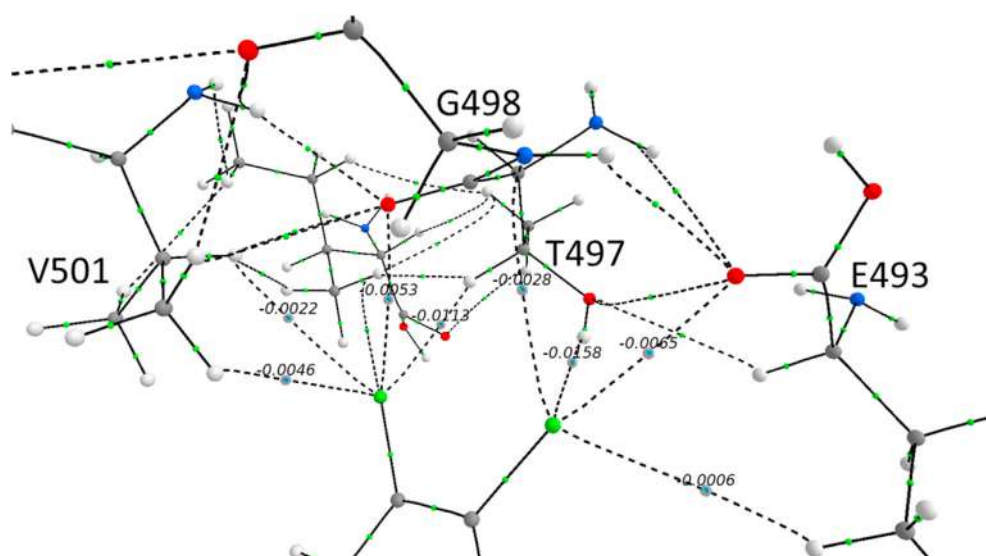
L-P complex stabilization (−1.4, −1.3 kcal/mol, respectively). The HBs with methyl group also seem to significantly impact the binding because their energy ranges from −0.31 to −3.54 kcal/mol (the highest value is observed for dichloro analog). In turn, ETS-NOCV analysis showed that dispersion energy takes a high share of the total stabilization energy (Table S5, Supplementary Information), especially when HB is observed (X–HC HB takes approximately 30% of the total attractive energy for Br analog **8**). Compared to that, the halogen bonds have a very low dispersion energy component (~3%), while for X–HBD, this energy oscillates between XB and HB (from 9% to 26%).

#### 4. Discussion

The analysis of the data collected for the synthesized compounds shows a strong correlation between the type of introduced halogen atom and SERT binding affinity. Chlorine analogs are among the least active compounds, while iodine analogs are the most active ones (Fig. 2). The influence of an additional fluorine atom placed in the 2- or 3- position relative to the halogen atom is more complex. From these two positions, only the ortho mutual orientation is favorable. In the case of fluoxetine chlorine analog **6** (SERT K<sub>i</sub> = 55 nM), additional fluorine in the meta position (compound **10**, SERT K<sub>i</sub> = 52 nM) has a negligible influence on the binding affinity. However, switching the fluorine to the 2-position (compound **13**) increases the binding affinity 1.77-fold. A different relationship was observed in the series of fluvoxamine analogs. Here, all chlorine derivatives are more active than the parent compound, with the 3-fluorine analog **38** the least active out of three (SERT K<sub>i</sub> = 202 nM). The other two compounds, monochlorine and ortho-fluorine analogs, exhibit identical binding affinity and are 7.4-fold more active (SERT K<sub>i</sub> = 61 nM and 62 nM, respectively) than fluvoxamine (SERT K<sub>i</sub> = 458 nM). Interestingly, the introduction of bromine brings both fluoxetine and fluvoxamine analogs to an identical level of activity (average K<sub>i</sub> = 21.75 ± 1.92 nM). Similar to the chlorine analogs, the only difference can be observed among the meta-fluorine derivatives (**11** and **39**); in both sets of derivatives, they are the least active (fluoxetine analog **11** SERT K<sub>i</sub> = 41 nM, fluvoxamine analog **39** SERT K<sub>i</sub> = 137 nM). Additionally, the incorporation of iodine into the structure of these SSRIs produces identically active compounds (fluoxetine analog **9** SERT K<sub>i</sub> = 14 nM, fluvoxamine analog **37** SERT



**Fig. 6.** Ligand-receptor complexes obtained through an induced fit docking of two 3,4-dichloro analogs of fluoxetine (compounds **42**, left, cyan) and fluvoxamine (compound **46**, right, magenta). Both compounds interact with the receptor via double halogen bonds formed with backbone carbonyl oxygen atoms of glutamic acid E492 and threonine T497. Such interactions caused a substantial increase in binding affinity for the receptor. Compound **42** is 291-fold more active than the analog without any substituent (compound **3**), and it is the most active SERT ligand presented in this manuscript. Compound **46** is 51-fold more active than the parent  $\text{CF}_3$ -containing fluvoxamine (compound **33**), and it is the second most active compound in this manuscript.



**Fig. 7.** The identified interactions of the halogen atom with the transporter residues, calculated using the QTAIM analysis, exemplified by compound **42**. On the image, individual interactions between halogen and the transporter are depicted as dotted lines. Next to each line, a value representing the share of total interaction energy is presented. The hydrogen bonds account for 70% of total interaction energy, while the halogen bonds for 30%.

$K_i = 15 \text{ nM}$ ). As with the previous examples, 3-fluorine in **12** slightly lowers (1.64-fold) the binding affinity compared to a mono-iodine analog **9**. The average geometrical parameters (Table 3) of the halogen bonds during molecular dynamics do not fit precisely into the boundaries of the optimum values. Instead, they oscillate on the borders of the estimated optimum range. These results do not mean that above this range this interaction is not present, rather its strength is lowered by the unfavorable geometries. The increased affinity of compounds with heavier halogens leads to the conclusion that the size of the  $\sigma$ -hole may be the factor responsible for the affinity changes. Indeed, calculated values of the magnitude of the  $\sigma$ -hole correlate well with the activity of mono-substituted derivatives. The introduction of a fluorine atom increases this value in most cases, which surprisingly does not translate to a higher binding affinity. For example, compound **39** with a  $\sigma$ -hole

magnitude equal to 42.8 kcal/mol, similar to the most active iodine derivatives, is 9.8-fold less active. The additional fluorine atom, despite increasing the magnitude of the  $\sigma$ -hole, must be involved in other interactions that impair the binding of a ligand to the receptor.

The performed QTAIM analysis showed that the most important interaction in the analyzed complexes is represented by the X-HBD interactions. Those interactions seem to be a hybrid of XB and HB which results in a stronger interaction than the individual ones. The most optimum geometrical orientation for X-HBD is found for the C-X ... HBD angle equal to  $90^\circ$  [30]. A query of the PDB repository allowed us to identify examples that incorporate non-halogenated compounds (2Q6H, 2QU3, 2WHO), for which it has been experimentally shown that adding a Cl or Br atom to the ligand significantly improves the binding affinity (even 200-fold), by creating X-

HBD [28]. The QTAIM analysis showed that X-HBD interaction between Cl and hydroxyl group of T497 has the highest values of energy stabilization ( $-1.7$ ,  $-5.0$  kcal/mol, for **7** and **42**, respectively). This feature of the chlorine atom translate to the formation of a very strong X-HBD interactions, which were found to be responsible for the high binding affinity of 3,4-diCl analogs. In spite of the complex nature of X-HBD, pure HB and XB can also be observed in the analyzed L-P complexes. In that case, importance of XBs increase along with the halogen atom size, with simultaneous decreased contribution of HBs (only 6% for iodine analog **9**) (Table S5, Supplementary Information). For all of the discussed interactions the dispersion energy is a vital component, however its share is strongly related to the type of the interaction. It is worth to note at this point, that the obtained QM refined poses constitute of the most optimum ligand-receptor mutual orientation and are probably poorly populated in the real time ligand-receptor interactions. Despite that, this type of analysis still allows to deeply investigate the binding of a ligand to the receptor.

All of the above observations lead to the hypothesis that starting from bromine, the halogen-receptor interaction becomes a dominant factor influencing the activity of these two SSRIs. Chlorine analogs **6** and **35** also possess similar binding affinity (SERT  $K_i = 55$  nM and  $K_i = 61$  nM, respectively), but the effect is less profound. The trifluoromethyl group interactions with the protein are weak and indirect; thus, structural differences of fluoxetine and fluvoxamine produce a very distinct binding affinity (SERT  $K_i = 31$  nM and  $K_i = 458$  nM, respectively). The ability of heavier halogen atoms to form a direct interaction causes different chemical scaffolds of these compounds to lose their decisive impact on the activity. The molecular modeling experiments showed two distinct binding modes (Fig. 3). Here, the increase in activity brought by the introduction of a halogen atom can be explained on the ground of the formed halogen atom interactions, which are possible only in the alternative binding mode (Fig. 3). Most frequently, these interactions were formed with either T497 or E493. To date, only one halogen bond in the SERT complex has been reported. In 2019, Abramyan et al. showed a complex of bromo paroxetine with SERT, where the bromine atom pointed in the direction of the E493 and T497 backbone oxygens. However, no further analysis was performed [31]. Therefore, we performed an XSAR analysis, which showed explicitly that E493 was the most frequently targeted amino acid in terms of halogen bonding with SERT. Moreover, the proximity of T497 and E493 allowed for the formation of two strong interactions with two vicinal halogen atoms. Such an optimal arrangement in some cases resulted in a spectacular thousand-fold increase in biological activity (Table 4). This finding supported our hypothesis for the alternative binding mode of SERT ligands bearing heavier halogen atoms. Finally, two synthesized 3,4-dichloro analogs of fluoxetine and fluvoxamine confirmed the theoretical assumption and showed a marked increase in activity. Fluoxetine analog **42** was 3-fold more active and fluvoxamine analog **46** was 1.7-fold more active than the best-binding 4-iodo analogs.

## 5. Conclusions

In the present study, a series of fluoxetine and fluvoxamine analogs with varying patterns of halogen substitution were synthesized, and their biological activities were measured. Among the synthesized initial series of compounds, a classical order of increasing activity from chlorine to iodine was observed. Introduced additional fluorine atoms did not have a substantial influence on the affinity for the receptor. Subsequent thorough *in silico* analysis of the binding modes indicated the possibility of the formation favorable X-HBD interactions with the residues E493 and

T497. This type of interaction was found to be a hybrid of XB and HB interactions, with the latter accounting for a higher share of the interaction energy. Subsequently, the use of an XSAR analysis allowed to translate this to a general rule governing the binding of SERT ligands. Especially interesting was the observation that SERT ligands with heavier halogens bind via a markedly different, “switched” binding mode than the parent trifluoromethyl analogs. To the best of our knowledge, no paper to date has exclusively reported two distinct binding modes for SERT ligands. Finally, the given hypothesis of halogen bond type interactions with the receptor was confirmed by the experimental measurement of the affinity constant for 3,4-dichloro analogs of fluoxetine and fluvoxamine, which were the most active among all of the synthesized compounds. The presented manuscript states as an example of the successful use of molecular modeling for the analysis and optimization of compound activity. The utilized tool, XSAR analysis, previously used for the 5-HT<sub>7</sub>R [22] and D<sub>4</sub>R ligands [22,23], proved to be universal and applicable for a broader type of biological target. We anticipate that such a methodology could be successfully utilized for the structure optimization of any halogen-containing biologically active compound.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgments

The study was partially supported by grant SONATA UMO-2016/21/D/NZ7/00620 from the Polish National Science Centre and POWR.03.02.00–00-I013/16 from the European Union. The study was performed with the use of PLGrid infrastructure. WP acknowledges the support of InterDokMed project no. POWR.03.02.00–00-I013.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113533>.

## Methodology

### Structure–activity relationship datasets for halogenated analogs

An algorithm to find all pairs containing halogenated and corresponding unsubstituted structures (called the XSAR library) was developed and used for the 5-HT<sub>7</sub> and D<sub>4</sub> targets in our previous studies [22]. To describe the influence of halogenation on the biological activity of the unsubstituted (parent) molecule, the Xeffect parameter was calculated as an activity (extracted from the ChEMBL database during the generation of the XSAR library) ratio of the parent compound to its halogenated derivative (an Xeffect between 0 and 1 denotes a decrease in the activity upon halogenation, and an Xeffect greater than 1 means the fold of activity increased after halogen substitution).

### Identification of halogen bonding hot spots for SERT

Privileged amino acids (i.e., hot spots) for halogen bonding were identified using a procedure including the following steps: clustering the halogenated analogs representing each XSAR set, using the centroids of the clusters to tune the SERT binding site by an induced-fit docking procedure, QPLD docking of the XSAR library to

SERT conformations, and determination of the number of halogen bonding interactions with the side chains and carbonyl oxygen atoms of amino acids in the docking poses.

#### Induced fit docking

The structure of the ts3 human serotonin transporter in complex with paroxetine (PDB code 5I6X) was retrieved from the Protein Data Bank [20]. Wild-type human SERT is unstable in detergent solutions during crystallization, so all crystal structures in PDB repositories consist of thermostable mutants. The ts3 mutant of the human serotonin transporter contains three thermostabilizing mutations, namely, I291A, T439S, and Y110A. To obtain reliable results from docking and molecular dynamics, the native amino acid sequence was restored using Schrodinger software.

The three-dimensional structures of ligands were prepared using LigPrep v3.6 [32] and the appropriate ionization states at  $\text{pH} = 7.0 \pm 0.5$  were assigned using Epik v3.4 [33]. The Protein Preparation Wizard was used to assign the bond orders and appropriate amino acid ionization states and to check for steric clashes. All ligands were docked using the induced fit docking (IFD) [34,35] protocol with XP with an OPLS3e force field. The L–R complexes selected in the IFD procedure were next optimized using the QM/MM approach with QSite [34,36]. The QM area containing ligand and the conserved amino acid side chain was described by a combination of DFT hybrid functional B3LYP and LACVP\* basis set, while the rest of the system was optimized using the OPLS2005 force field.

#### Molecular dynamics

Molecular dynamics (MD) simulations were performed using Schrödinger Desmond software [37]. Each ligand–receptor complex, optimized in the QM/MM procedure, was immersed into a POPC (300 K) membrane bilayer, whose position was calculated using the System Builder interface. The system was solvated by water molecules described by the TIP4P potential, and the OPLS3e [38] force field parameters were used for all atoms. NaCl (0.15 M) was added to mimic the ionic strength inside the cell. Molecular simulations for 100 ns (recording frames 10 ps and step of 2 fs) using the NPAT ensemble class (constant normal pressure, temperature, and lateral surface area of membranes) and OPLS3e [39] force field were calculated for each system. Based on the obtained trajectories, the mean geometrical distances between amino acids and ligands were calculated using Simulation Event Analysis tools in Maestro Schrödinger Suit.

#### Magnitude of $\sigma$ -hole

MultiWFN [40,41] software was used to calculate the size of the sigma hole for selected fluvoxamine and fluoxetine derivatives. First, DFT [42] structure optimization was performed with the Gaussian 16 package at the M06-2X [43]/def2-qzvp [44] level of theory with the polarizable continuum model (PCM) [45,46] (solvent = water). The obtained wave functions were used to calculate the values of maximum electrostatic potential over the isodensity surface with MultiWFN as an approach to quantifying the  $\sigma$ -holes.

#### QTAIM analysis

For chosen complexes, the ligands and all residues in the range of 4 Å from halogen atom were extracted and the QTAIM [47] calculations (Quantum Theory of Atoms in Molecule) were performed. The electron density topological analysis was carried out with the AIMAll [48] program, based on electron density calculated with

Gaussian G16 at the M06-2X/def2-tzvp [43,49] level of theory. The energy of non-covalent bonds detected in crystal structures was calculated with the Espinosa equation [50]:

$$E_{\text{int}} = \frac{1}{2} v(r)$$

where  $E_{\text{int}}$  is the energy of interatomic interaction (a.u.) and  $v(r)$  is kinetic energy in the bond critical point (BCP).

#### ETS-NOCV

To fully characterize obtained interactions we used an approach for energy decomposition analysis. The bonding analysis was performed using the ETS-NOCV approach the extended transition state (ETS) method [51] with the natural orbitals for the chemical valence (NOCV) scheme [52–54]. In this approach the total energy of bonding between the interacting molecules ( $\Delta E_{\text{int}}$ ) is divided into following contributions:

$$\Delta E_{\text{int}} = \Delta E_{\text{dist}} + \Delta E_{\text{el}} + \Delta E_{\text{Pauli}} + \Delta E_{\text{orb}}$$

where  $\Delta E_{\text{dist}}$  is energy required to promote the separated fragments from their equilibrium geometry to the structure they will take up in the complex,  $\Delta E_{\text{el}}$  is corresponding to the electrostatic interaction between the two fragments in the supermolecule geometry,  $\Delta E_{\text{Pauli}}$  is the repulsive interaction between occupied orbitals of the two fragments, and the orbital interaction term and  $\Delta E_{\text{orb}}$  is representation of the stabilizing component due to the final orbital relaxation. All calculations were performed using the using the Amsterdam Density Functional (ADF) program [55–58], implementing the ETS-NOCV scheme. The BLYP-D3 [59] [16] functional and a standard double- $\zeta$  STO basis containing one set of polarization functions was adopted for all the electrons (TZP), were used in calculations.

#### Plotting interaction spheres for halogen bonding

To visualize (plotting interaction spheres) the possible contribution of halogen bonding to L–R complexes, the halogen bonding Web server was used (accessed June 20, 2020, <http://www.halogenbonding.com/>) [60].

#### Radioligand binding replacement experiment

##### Cell culture and preparation of cell membranes for radioligand binding assays

The HEK293 human serotonin transporter cell line (PerkinElmer) was maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 10% dialyzed fetal bovine serum and 500 µg/mL G418 sulfate. For membrane preparation, cells were subcultured in 150 cm<sup>2</sup> flasks, grown to 90% confluence, washed twice with phosphate buffered saline (PBS) prewarmed to 37 °C and pelleted by centrifugation (200×g) in PBS containing 0.1 mM EDTA and 1 mM dithiothreitol. Prior to membrane preparation, pellets were stored at –80 °C.

##### Radioligand binding assays

Cell pellets were thawed and homogenized in 10 vol of assay buffer using an Ultra Turrax tissue homogenizer and centrifuged twice at 35,000×g for 20 min at 4 °C. The composition of the assay buffer was as follows: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 120 mM NaCl, and 5 mM KCl. The assay was incubated in a total volume of 200 µl in 96-well microtiter plates for 0.5 h at 27 °C. The process of equilibration was terminated by rapid filtration through GF/C Unifilter plates (PerkinElmer) with a FilterMate Unifilter 96-Harvester

(PerkinElmer). The radioactivity bound to the filters was quantified on a Microbeta TopCount instrument (PerkinElmer). For competitive inhibition studies, the assay samples contained 3 nM [<sup>3</sup>H]-citalopram (74.5 Ci/mmol). Non-specific binding was determined with 10 μM imipramine. Each compound was tested in triplicate at 7 concentrations (10<sup>-10</sup>-10<sup>-4</sup> M). The inhibition constants (K<sub>i</sub>) were calculated from the Cheng-Prusoff equation [61]. For all binding assays, the results were expressed as the means of at least two separate experiments.

### Synthesis

#### A general procedure for the synthesis of compounds 2–14

*Tert*-butyl *N*-(3-hydroxy-3-phenylpropyl)-*N*-methylcarbamate (0.0026 mol), appropriate phenol (1 eq.), Ph<sub>3</sub>P (1.2 eq.) were added to a round bottom flask and dissolved in anhydrous THF (50 mL, distilled over LiAlH<sub>4</sub>) and cooled on ice. Next, DIAD (1.2 eq.) was added dropwise. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. The solvent was evaporated, and conc. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (5 mL) was added; an evolution of gases was observed. The mixture was stirred for 3 h at room temperature, after which water was added (100 mL), and the mixture was extracted with EtOAc (3 × 50 mL). The aqueous layer was basified with 15% NaOH and extracted with EtOAc (3 × 50 mL). Combined organic extracts were washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>. The product was purified using column chromatography on silica gel with EtOAc:MeOH (9:1).

#### A general procedure for the synthesis of compounds 15–24

Magnesium turnings (1.1 eq., 0.47 g) were grated in a mortar and placed in a round bottom flask under an Ar atmosphere. Anhydrous Et<sub>2</sub>O (30 mL, distilled over LiAlH<sub>4</sub>) was added with subsequent addition of ethylene bromide (0.1 eq., 0.155 mL). After 15 min at room temperature, 1-bromo-4-methoxybutane (3 g, 0.018 mol) was added portionwise. After all the alcohol reacted with the magnesium, the reaction mixture was cooled on ice, and a solution of appropriate benzonitrile (0.6 eq., 0.0107 mol) in anhydrous Et<sub>2</sub>O (50 mL) was added portionwise. The reaction mixture was refluxed for 8 h. The reaction was quenched with ice-water and acidified with 6 N HCl. The organic layer was separated, and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated. The crude product was purified by column chromatography on silica gel hexane:EtOAc (6:1) to give the title compound as an oil or solid.

#### A general procedure for the synthesis of compounds 24–32

To a solution of ketone (1 eq.) in EtOH (5 mL) hydroxylamine hydrochloride (2 eq.) and NaOAc (2 eq.) were added. After stirring at room temperature for 3 h, the reaction mixture was quenched with water (10 mL) and extracted with DCM (3 × 30 mL). The combined organic phases were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography on silica gel with hexane:EtOAc (5:1) to give the title compound.

#### A general procedure for the synthesis of compounds 33–41

An appropriate oxime (1 mmol), 2-chloroethanamine hydrochloride (0.7 mmol), and KOH (1.5 mmol) were added to dry DMF (6 mL) at 10 °C. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Next, the reaction mixture was concentrated to remove DMF, and then water was added (50 mL). The mixture was extracted with EtOAc (3 × 30 mL). The combined organic phases were washed with brine (20 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated to produce the target compound.

### References

- [1] K.P. Lesch, B.L. Wolozin, D.L. Murphy, P. Riederer, Isolation of a cDNA encoding the human brain serotonin transporter, *J. Neurochem.* 60 (1993) 2319–2322.
- [2] S. Montanez, L.C. Daws, G.G. Gould, A. Frazer, Serotonin (5-HT) transporter (SERT) function after graded destruction of serotonergic neurons, *J. Neurochem.* 87 (2003) 861–867.
- [3] S.M. Stahl, C. Lee-Zimmerman, S. Cartwright, D.A. Morrisette, Serotonergic drugs for depression and beyond, *Curr. Drug Targets* 14 (2013) 578–585.
- [4] A. Caspi, K. Sugden, T.E. Moffitt, A. Taylor, I.W. Craig, H. Harrington, Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene, *Science* 301 (2003) 386–389 (80-).
- [5] T.C. Eley, K. Sugden, A. Corsico, A.M. Gregory, P. Sham, P. McGuffin, Gene-environment interaction analysis of serotonin system with adolescent depression, *Mol. Psychiatr.* 9 (2004) 908–915.
- [6] G.R. Desiraju, P.S. Ho, L. Kloo, A.C. Legon, R. Marquardt, P. Metrangolo, P. Politzer, C. Resnati, K. Rissanen, Definition of the halogen bond (IUPAC recommendations 2013), *Pure Appl. Chem.* 85 (8) (2013) 1711–1713.
- [7] V. Andrea, H. P. The role of halogen bonding in inhibitor recognition and binding by protein kinases, *Curr. Top. Med. Chem.* 7 (14) (2007) 1336–1348.
- [8] L.A. Hardegger, B. Kuhn, B. Spinnler, L. Anselm, R. Ecabert, M. Stihle, B. Gsell, R. Thoma, J. Diez, J. Benz, et al., Systematic investigation of halogen bonding in protein-ligand interactions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (1) (2011) 314–318.
- [9] K.E. Riley, J.S. Murray, R. Jan, R.J. Solá, M.C. Concha, F.M. Ramos, P. Politzer, J. Fanfrlík, J. Rezáč, R.J. Solá, et al., Halogen bond tunability II: the varying roles of electrostatic and dispersion contributions to attraction in halogen bonds, *J. Mol. Model.* 19 (11) (2013) 4651–4659.
- [10] J. Fanfrlík, M. Kolar, M. Kamlar, D. Hurny, F.X. Ruiz, A. Cousido-Siah, A. Mitschler, J. Rezac, E. Munusamy, M. Lepsik, et al., Modulation of aldose reductase inhibition by halogen bond tuning, *ACS Chem. Biol.* 8 (2013) 2484–2492.
- [11] R. Wilcken, M.O. Zimmermann, A. Lange, A.C. Joergel, F.M. Boeckler, Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 1363–1388.
- [12] P. Auffinger, F.A. Hays, E. Westhof, P.S. Ho, Halogen bonds in biological molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (48) (2004) 16789–16794.
- [13] J. Andersen, L. Olsen, K.B. Hansen, O. Taboureau, F.S. Jørgensen, A. Marie, B. Bang-andersen, J. Egebjerg, K. Strømgaard, A.S. Kristensen, Mutational mapping and modeling of the binding site for (S)-citalopram in the human serotonin transporter, *J. Biol. Chem.* 285 (3) (2010) 2051–2063.
- [14] D.T. Wong, F.P. Bymaster, E.A. Engleman, Prozac (fluoxetine, lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and antidepressant drug: twenty years since its first publication, *Life Sci.* 57 (5) (1995) 411–441.
- [15] S. Chumpradit, M.P. Kung, C. Panyachotipun, V. Prapansiri, C. Foulon, B.P. Brooks, S.A. Szabo, S. Tejani-Butt, A. Frazer, H.F. Kung, Iodinated tomozetine derivatives as selective ligands for serotonin and norepinephrine uptake sites, *J. Med. Chem.* 35 (23) (1992) 4492–4497.
- [16] H.B.A. Welle, V. Claassen, Aminoethyl Oximes Having Anti-depressive Activity, Patent US4086361A, 1978.
- [17] O.M. Okunola-Bakare, J. Cao, T. Kopajtic, J.L. Katz, C.J. Loland, L. Shi, A.H. Newman, Elucidation of structural elements for selectivity across monoamine transporters: novel 2-[(Diphenylmethyl)Sulfinyl]Acetamide (modafinil) analogues, *J. Med. Chem.* 57 (3) (2014) 1000–1013.
- [18] R.D. Slack, A.M. Abramyan, H. Tang, S. Meena, B.A. Davis, A. Bonifazi, J.B. Giancola, J.R. Deschamps, S. Naing, H. Yano, et al., A novel bromine-containing paroxetine analogue provides mechanistic clues for binding ambiguity at the central primary binding site of the serotonin transporter, *ACS Chem. Neurosci.* 10 (9) (2019) 3946–3952.
- [19] Z. Zhou, J. Zhen, N.K. Karpowich, C.J. Law, M.E.A. Reith, D. Wang, Antidepressant specificity of serotonin transporter suggested by three LeuT – SSRI structures, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (6) (2009) 652–658.
- [20] J.A. Coleman, E.M. Green, E. Gouaux, X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter, *Nature* 532 (7599) (2016) 334–339.
- [21] J.A. Coleman, E. Gouaux, Structural basis for recognition of diverse antidepressants by the human serotonin transporter, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25 (2) (2018) 170–175.
- [22] R. Kurczab, V. Canale, G. Satala, P. Zajdel, A.J. Bojarski, Amino acid hot spots of halogen bonding: a combined theoretical and experimental case study of the 5-HT<sub>7</sub> receptor, *J. Med. Chem.* 61 (19) (2018) 8717–8733.
- [23] R. Kurczab, K. Kucwaj-Brysz, P. Sliwa, The significance of halogen bonding in ligand–receptor interactions: the lesson learned from molecular dynamic simulations of the D<sub>4</sub> receptor, *Molecules* 25 (1) (2019) 91.
- [24] R.F.W. Bader, Atoms in molecules, *Acc. Chem. Res.* 18 (1) (1985) 9–15.
- [25] R.F.W. Bader, Atoms in Molecules. A Quantum Theory, Clarendon Press, Oxford, UK, 1990.
- [26] K. Dyduch, M.P. Mitoraj, A. Michalak, ETS-NOCV description of σ-hole bonding, *J. Mol. Model.* 19 (7) (2013) 2747–2758.
- [27] A.M.S. Riel, R.K. Rowe, E.N. Ho, A.-C.C. Carlsson, A.K. Rappé, O.B. Berryman, P.S. Ho, Hydrogen bond enhanced halogen bonds: a synergistic interaction in chemistry and biochemistry, *Acc. Chem. Res.* 52 (10) (2019) 2870–2880.
- [28] F.-Y. Lin, A.D. MacKerell, Do halogen–hydrogen bond donor interactions dominate the favorable contribution of halogens to ligand–protein binding? *J. Phys. Chem. B* 121 (28) (2017) 6813–6821.
- [29] A.-C.C. Carlsson, M.R. Scholfield, R.K. Rowe, M.C. Ford, A.T. Alexander,

- R.A. Mehl, P.S. Ho, Increasing enzyme stability and activity through hydrogen bond-enhanced halogen bonds, *Biochemistry* 57 (28) (2018) 4135–4147.
- [30] R.K. Rowe, P.S. Ho, Relationships between hydrogen bonds and halogen bonds in biological systems, *Acta Crystallogr. B* 73 (2) (2017) 255–264.
- [31] A.M. Abramyan, R.D. Slack, S. Meena, B.A. Davis, A.H. Newman, S.K. Singh, L. Shi, Computation-guided analysis of paroxetine binding to HSERT reveals functionally important structural elements and dynamics, *Neuropharmacology* 161 (2019) 107411.
- [32] Schrödinger LigPrep, Release 2017-3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
- [33] Schrödinger Epik, Release 2017-3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
- [34] Schrödinger QSite, Release 2017-3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
- [35] W. Sherman, T. Day, M.P. Jacobson, R.A. Friesner, R. Farid, Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects, *J. Med. Chem.* 49 (2) (2006) 534–553.
- [36] R.B. Murphy, D.M. Philipp, R.A. Friesner, A mixed quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) method for large-scale modeling of chemistry in protein environments, *J. Comb. Chem.* 21 (16) (2000) 1442–1457.
- [37] K.J. Bowers, F.D. Sacerdoti, J.K. Salmon, Y. Shan, D.E. Shaw, E. Chow, H. Xu, R.O. Dror, M.P. Eastwood, B.A. Gregersen, et al., Molecular dynamics—scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters, in: *In Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing – SC '06*, ACM Press, New York, New York, USA, 2006, p. 84.
- [38] E. Harder, W. Damm, J. Maple, C. Wu, M. Reboul, J.Y. Xiang, L. Wang, D. Lupyan, M.K. Dahlgren, J.L. Knight, et al., OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins, *J. Chem. Theor. Comput.* 12 (1) (2016) 281–296.
- [39] K. Roos, C. Wu, W. Damm, M. Reboul, J.M. Stevenson, C. Lu, M.K. Dahlgren, S. Mondal, W. Chen, L. Wang, et al., OPLS3e: extending force field coverage for drug-like small molecules, *J. Chem. Theor. Comput.* 15 (3) (2019) 1863–1874.
- [40] T. Lu, F. Chen, Quantitative analysis of molecular surface based on improved marching tetrahedra algorithm, *J. Mol. Graph. Model.* 38 (2012) 314–323.
- [41] T. Lu, F. Chen, Multiwfn: a multifunctional wavefunction analyzer, *J. Comput. Chem.* 33 (5) (2012) 580–592.
- [42] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A.V. Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, D.J. Hratch, Gaussian 16, Revision A.03, Gaussian 16, Revis. A.03, 2016.
- [43] Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function, *Theor. Chem. Acc.* 120 (1–3) (2008) 215–241.
- [44] F. Weigend, R. Ahlrichs, Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: design and assessment of accuracy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7 (18) (2005) 3297.
- [45] B. Mennucci, R. Cammi, J. Tomasi, Analytical free energy second derivatives with respect to nuclear coordinates: complete formulation for electrostatic continuum solvation models, *J. Chem. Phys.* 110 (14) (1999) 6858–6870.
- [46] S. Miertuš, E. Scrocco, J. Tomasi, Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects, *Chem. Phys.* 55 (1) (1981) 117–129.
- [47] W.A. Waters, *Vistas of organic chemistry*, Nature 173 (4413) (1954) 1012–1013.
- [48] A. Todd, T.G.S. Keith, AIMAll. Overland Park KS: USA, 2019.
- [49] M.K. Kesharwani, B. Brauer, J.M.L. Martin, Frequency and zero-point vibrational energy scale factors for double-hybrid density functionals (and other selected methods): can anharmonic force fields be avoided? *J. Phys. Chem.* 119 (9) (2015) 1701–1714.
- [50] E. Espinosa, E. Molins, C. Lecomte, Hydrogen bond strengths revealed by topological analyses of experimentally observed electron densities, *Chem. Phys. Lett.* 285 (3–4) (1998) 170–173.
- [51] T. Ziegler, A. Rauk, On the calculation of bonding energies by the Hartree Fock Slater method, *Theor. Chim. Acta* 46 (1) (1977) 1–10.
- [52] A. Michalak, M. Mitoraj, T. Ziegler, Bond orbitals from chemical valence theory, *J. Phys. Chem.* 112 (9) (2008) 1933–1939.
- [53] M. Mitoraj, A. Michalak, Applications of natural orbitals for chemical valence in a description of bonding in conjugated molecules, *J. Mol. Model.* 14 (8) (2008) 681–687.
- [54] M. Mitoraj, A. Michalak, Natural orbitals for chemical valence as descriptors of chemical bonding in transition metal complexes, *J. Mol. Model.* 13 (2) (2007) 347–355.
- [55] G. te Velde, F.M. Bickelhaupt, E.J. Baerends, C. Fonseca Guerra, S.J.A. van Gisbergen, J.G. Snijders, T. Ziegler, Chemistry with ADF, *J. Comput. Chem.* 22 (9) (2001) 931–967.
- [56] E.J. Baerends, P. Ros, Self-consistent molecular Hartree—Fock—Slater calculations II. The effect of exchange scaling in some small molecules, *Chem. Phys.* 2 (1) (1973) 52–59.
- [57] E.J. Baerends, D.E. Ellis, P. Ros, Self-consistent molecular Hartree—Fock—Slater calculations I. The computational procedure, *Chem. Phys.* 2 (1) (1973) 41–51.
- [58] G. te Velde, E.J. Baerends, Numerical integration for polyatomic systems, *J. Comput. Phys.* 99 (1) (1992) 84–98.
- [59] J.P. Finley, Using the local density approximation and the LYP, BLYP and B3LYP functionals within reference-state one-particle density-matrix theory, *Mol. Phys.* 102 (7) (2004) 627–639.
- [60] R. Wilcken, M.O. Zimmermann, A. Lange, S. Zahn, F.M. Boeckler, Using halogen bonds to address the protein backbone: a systematic evaluation, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 26 (8) (2012) 935–945.
- [61] Y.-C. Cheng, W.H. Prusoff, Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction, *Biochem. Pharmacol.* 22 (23) (1973) 3099–3108.



## **10. Oświadczenie współautorów**

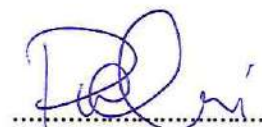
Kraków, dnia 17.05.2022r.

Mgr Wojciech Pietruś

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy **W. Pietruś**, R. Kurczab, R. Kafel, E. Machalska, J. Kalinowska-Tłuścik, A. Hogendorf, M. Żylewski, M. Barańska, A. J. Bojarski, 2021, *How can fluorine directly and indirectly affect the hydrogen bonding in molecular systems? – A case study for monofluoroanilines*, Spec. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 252, 119536) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: wykonanie obliczeń kwantowo-mechanicznych w postaci optymalizacji struktur, obliczenia i wizualizowania map potencjału elektrostatycznego oraz analizy wibracyjnej widm teoretycznych przy użyciu oprogramowania Gaussian i GaussView; przeprowadzenie symulacji dynamiki molekularnej *ab initio*, analiza wyników oraz zaproponowanie sposobu działania skryptu służącego do analizy ilości wiązań wodorowych w trakcie symulacji; szczegółowa analiza widm w podczerwieni oraz analiza widm ramanowskich; analiza struktur krystalicznych zdeponowanych z bazy CSD oraz obliczenie energii oddziaływań przy użyciu oprogramowania AIMAll; wizualizacja otrzymanych wyników z przeprowadzonych obliczeń, symulacji, widm w podczerwieni i analizy struktur krystalicznych oraz przygotowanie manuskryptu.



Podpis

Kraków, dnia 18.05.2022r.

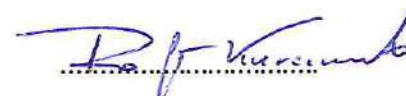
Dr hab. Rafał Kurczab

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, **R. Kurczab**, R. Kafel, E. Machalska, J. Kalinowska-Tłuścik, A. Hogendorf, M. Żylewski, M. Barańska, A. J. Bojarski, 2021, *How can fluorine directly and indirectly affect the hydrogen bonding in molecular systems? – A case study for monofluoroanilines*, Spec. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 252, 119536) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pomiar widm w podczerwieni, analiza i walidacja wyników, współudział w redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Kraków, dnia 16.V.2022

Mgr inż. Rafał Kafel

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kurczab, R. Kafel, E. Machalska, J. Kalinowska-Tłuścik, A. Hogendorf, M. Żylewski, M. Barańska, A. J. Bojarski, 2021, *How can fluorine directly and indirectly affect the hydrogen bonding in molecular systems? – A case study for monofluoroanilines*, Spec. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 252, 119536) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

*implementacja skryptów w języku Python umożliwiających detekcję wiązań wodorowych oraz ich podział w zależności od typów donorów i akceptorów.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Rafał Kafel

Podpis

Kraków, dnia 16.05.22

Dr Ewa Machalska

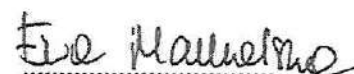
Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński  
Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET)

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kurczab, R. Kafel, E. Machalska, J. Kalinowska-Tłuścik, A. Hogendorf, M. Żylewski, M. Barańska, A. J. Bojarski, 2021, *How can fluorine directly and indirectly affect the hydrogen bonding in molecular systems? – A case study for monofluoroanilines*, Spec. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 252, 119536) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

wykonanie pomiarów ramanowskich z wykorzystaniem linii wzbudzenia lasera 1064 nm, wykonanie rysunków obrazujących widma ramanowskie, analiza wyników, edycja treści manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Kraków, dnia 23.05.2022

Dr hab. Justyna Kalinowska-Tłuścik

Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kurczab, R. Kafel, E. Machalska, J. Kalinowska-Tłuścik, A. Hogendorf, M. Żylewski, M. Barańska, A. J. Bojarski, 2021, *How can fluorine directly and indirectly affect the hydrogen bonding in molecular systems? – A case study for monofluoroanilines*, Spec. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 252, 119536) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

- 1) Analiza struktur krystalicznych aniliny i jej monofluoro-pochodnych,
- 2) Przygotowanie fragmentu publikacji, związanego z opracowanymi danymi strukturalnymi

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Kraków, dnia 13 maja 2022

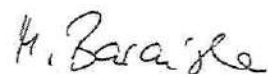
Prof. dr hab. Małgorzata Barańska

Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński  
Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków JCET

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kurczab, R. Kafel, E. Machalska, J. Kalinowska-Tłuścik, A. Hogendorf, M. Żylewski, **M. Barańska**, A. J. Bojarski, 2021, *How can fluorine directly and indirectly affect the hydrogen bonding in molecular systems? – A case study for monofluoroanilines*, Spec. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 252, 119536) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: współudział w dyskusji wyników ramanowskich i końcowej redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



.....  
Podpis

Kraków, dnia 17.05.2022r.

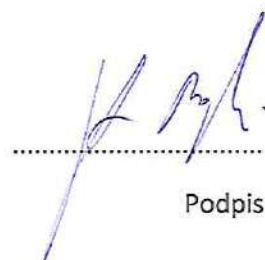
Prof. dr hab. Andrzej J. Bojarski

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kurczab, R. Kafel, E. Machalska, J. Kalinowska-Tłuścik, A. Hogendorf, M. Żylewski, M. Barańska, **A. J. Bojarski**, 2021, *How can fluorine directly and indirectly affect the hydrogen bonding in molecular systems? – A case study for monofluoroanilines*, Spec. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 252, 119536, mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: współudział w dyskusji wyników oraz redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis



Kraków, dnia 17.05.2022r.

**Mgr Wojciech Pietruś**

**Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja,  
Polskiej Akademii Nauk**

### **OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA**

Oświadczam, że w pracy **W. Pietruś**, R. Kurczab, J. Kalinowska-Tłuścik, E. Machalska, D. Golonka, M. Barańska, A. J. Bojarski, 2021, *Influence of fluorine substitution on nonbonding interactions in selected para-halogeno anilines*, ChemPhysChem, 20, 2115-2157) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: wykonanie obliczeń kwantowo-mechanicznych w postaci optymalizacji struktur, obliczenia i wizualizacja map potencjału elektrostatycznego przy użyciu oprogramowania Gaussian i GaussView; przygotowanie oraz przeprowadzenie krystalizacji niefluorowanych, mono- i di-fluoropochodnych *para*-halogenoanilin; analiza otrzymanych struktur krystalicznych oraz zdeponowanych z bazy CSD, jak również obliczenie energii oddziaływań przy użyciu oprogramowania AIMAll, jak również obliczenie wielkości sigma dziury; szczegółowa analiza widm w podczerwieni; wizualizacja wykonanych obliczeń i symulacji oraz widm w podczerwieni; przygotowanie manuskryptu.



.....  
Podpis

Kraków, dnia 23.05.2022

Dr hab. Justyna Kalinowska-Tłuścik

Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kurczab, J. Kalinowska-Tłuścik, E. Machalska, D. Golonka, M. Barańska, A. J. Bojarski, 2021, *Influence of fluorine substitution on nonbonding interactions in selected para-halogeno anilines*, ChemPhysChem, 20, 2115-2157) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

- 1) Wykonanie pomiarów dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na monokryształach, opracowanie danych rentgenostrukturalnych nowych struktur
- 2) Analiza struktur krystalicznych, w tym również powierzchni Hirshfelda i odpowiadających im fingerprintów
- 3) Analiza statystyczna bazy CSD dla niewiążących kontaktów F...F
- 4) Współpraca z Doktorantem nad tekstem publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowych.



Podpis

Kraków, dnia 18.05.2022r.

Dr hab. Rafał Kurczab

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja,  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kurczab, J. Kalinowska-Tłuścik, E. Machalska, D. Golonka, M. Barańska, A. J. Bojarski, 2021, *Influence of fluorine substitution on nonbonding interactions in selected para-halogeno anilines*, ChemPhysChem, 20, 2115-2157) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: analiza i walidacja wyników, współudział w redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Kraków, dnia 16.05.22

Dr Ewa Machalska

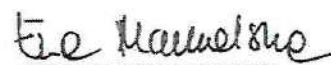
Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński  
Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET)

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kurczab, J. Kalinowska-Tłuścik, E. Machalska, D. Golonka, M. Barańska, A. J. Bojarski, 2021, *Influence of fluorine substitution on nonbonding interactions in selected para-halogeno anilines*, ChemPhysChem, 20, 2115-2157) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

wykonanie pomiarów ramanowskich z wykorzystaniem linii wzbudzenia lasera 1064 nm, wykonanie rysunków obrazujących widma ramanowskie, analiza wyników, edycja treści manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Kraków, dnia 13 maja 2022

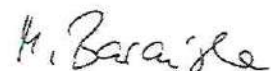
Prof. dr hab. Małgorzata Barańska

Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński  
Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków JCET

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kurczab, J. Kalinowska-Tłuścik, E. Machalska, D. Golonka, **M. Barańska**, A. J. Bojarski, 2021, *Influence of fluorine substitution on nonbonding interactions in selected para-halogeno anilines*, ChemPhysChem, 20, 2115-2157) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: współudział w dyskusji wyników ramanowskich i końcowej redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



.....  
Podpis

Kraków, dnia 17.05.2022r.

Prof. dr hab. Andrzej J. Bojarski

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kurczab, J. Kalinowska-Tłuścik, E. Machalska, D. Golonka, M. Barańska, A. J. Bojarski, 2021, *Influence of fluorine substitution on nonbonding interactions in selected para-halogeno anilines*, ChemPhysChem, 20, 2115-2157, mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: współudział w dyskusji wyników oraz końcowej redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



.....

Podpis

Kraków, dnia 17.05.2022r.

Mgr Wojciech Pietruś

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja,  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy **W. Pietruś**, R. Kafel, A. J. Bojarski, R. Kurczab, 2022, *Hydrogen Bonds with Fluorine in Ligand–Protein Complexes-the PDB Analysis and Energy Calculations*, *Molecules*, 27, 1005) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: przygotowanie algorytmu prowadzonych badań, przygotowanie struktur ligandów z bazy LigandExpo wraz z podziałem na fluorowane związki w fragmencie alifatycznym oraz aromatycznym; ekstrakcja odpowiednich struktur krystalicznych z bazy PDB; przeprowadzenie analizy statystycznej zebranych struktur pod względem ilości wiązań wodorowych z fluorem (z podziałem na typy donorów); zastosowanie przygotowanych skryptów pozwalających na wyodrębnienie oddziałujących fragmentów oraz nadanie odpowiednich stanów protonacyjnych układu; przygotowanie plików wsadowych dla oprogramowania Gaussian, ADF oraz AIMAll; przeprowadzenie obliczeń z wykorzystaniem klastra Prometheus (ACK, Cyfronet AGH), szczegółowa analiza zebranych danych, przygotowanie figur oraz manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Kraków, dnia 16.V.2022

Mgr inż. Rafał Kafel

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kafel, A. J. Bojarski, R. Kurczab, 2022, *Hydrogen Bonds with Fluorine in Ligand-Protein Complexes-the PDB Analysis and Energy Calculations, Molecules*, 27, 1005) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

*implementacja skryptów w języku Python pozwalających na analizę struktur krystalicznych zdeponowanych w bazie PDB, detekcję wiązań wodorowych z fluorem pomiędzy wykrytym fluorowanym ligandem, a biomolekułą oraz wyznaczenie ich parametrów geometrycznych.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Rafał Kafel

Podpis



Kraków, dnia 17.05.2022r.

Prof. dr hab. Andrzej J. Bojarski

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kafel, A. J. Bojarski, R. Kurczab, 2022, *Hydrogen Bonds with Fluorine in Ligand-Protein Complexes-the PDB Analysis and Energy Calculations*, *Molecules*, 27, 1005, mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: współudział w dyskusji wyników oraz końcowej redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Kraków, dnia 18.05.2022r.

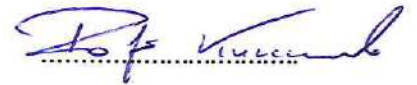
**Dr hab. Rafał Kurczab**

**Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja,  
Polskiej Akademii Nauk**

### **OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA**

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kafel, A. J. Bojarski, **R. Kurczab**, 2022, *Hydrogen Bonds with Fluorine in Ligand–Protein Complexes-the PDB Analysis and Energy Calculations*, *Molecules*, 27, 1005) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: analiza i walidacja wyników, współudział w redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Kraków, dnia 17.05.2022r.

**Mgr Wojciech Pietruś**

**Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja,  
Polskiej Akademii Nauk**

### **OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA**

Oświadczam, że w pracy **W. Pietruś**, R. Kurczab, D. Stumpfe, A. J. Bojarski, J. Bajorath, 2021, *Data-Driven Analysis of Fluorination of Ligands of Aminergic G Protein Coupled Receptors*, ChemPhysChem, 11, 1647) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: przygotowanie danych z bazy ChEMBL oraz ich analiza, implementacja standardowego podejścia klifów aktywności (AC) do zebranych danych oraz wprowadzenie jego modyfikacji w kierunku wykrywania negatywnych AC; przeprowadzenie analizy dopasowanych par molekularnych dla przygotowanych zestawów oraz przeprowadzenie ich szczegółowej inspekcji; przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Kraków, dnia 18.05.2022r.

Dr hab. Rafał Kurczab

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja,  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kurczab, D. Stumpfe, A. J. Bojarski, J. Bajorath, 2021, *Data-Driven Analysis of Fluorination of Ligands of Aminergic G Protein Coupled Receptors*, *Biomolecules*, 11, 1647) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: walidacja wyników, współudział w redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

## Zaświadczenie

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kurczab, **D. Stumpfe**, A. J. Bojarski, J. Bajorath, 2021, Data-Driven Analysis of Fluorination of Ligands of Aminergic G Protein Coupled Receptors, ChemPhysChem, 11, 1647) wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji Dagmar Stumpfe to: współpraca przy tworzeniu koncepcji oraz planu wykonania eksperymentów, analiza danych, przygotowanie ilustracji przedstawiające uzyskane wyniki oraz przygotowanie części manuskryptu.

Podjąłem wszelkie próby kontaktu z Dagmar Stumpfe, jednak ze względu na zmianę miejsca jej pracy nie doszły one do skutku.



**Wojciech Pietruś**

Kraków, dnia 17.05.2022r.

**Prof. dr hab. Andrzej J. Bojarski**

**Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk**

### **OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA**

Oświadczam, że w pracy W. Pietruś, R. Kurczab, D. Stumpfe, **A. J. Bojarski**, J. Bajorath, 2021, *Data-Driven Analysis of Fluorination of Ligands of Aminergic G Protein Coupled Receptors*, *Biomolecules*, 11, 1647, mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: współudział w końcowej redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



.....  
Podpis

Bonn, 26.05.2022

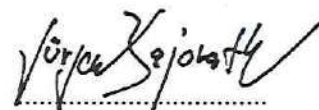
Prof. Jürgen Bajorath  
Department of Life Science Informatics,  
LIMES Program Unit Chemical Biology and Medicinal Chemistry  
B-IT, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität

#### STATEMENTS OF THE CO-AUTHOR

I declare that in the work W. Pietruś, R. Kurczab, Dagmar Stumpfe, A. J. Bojarski, **Jürgen Bajorath**, 2021, *Data-Driven Analysis of Fluorination of Ligands of Aminergic G Protein Coupled Receptors*, *Biomolecules*, 11, 1647) my substantive contribution to the preparation, conduct and development of research and presentation of the work in the form of a publication was:

**Study design, supervision, analysis of results, manuscript review and revision.**

At the same time, I consent to the submission of the above-mentioned thesis by Wojciech Pietruś as part of the doctoral dissertation in the form of a thematically coherent collection of scientific articles published in scientific journals.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jürgen Bajorath', written over a horizontal dotted line.

Signature

Kraków, dnia 13.05.2022

Dr Jakub Staroń

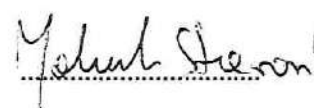
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja,  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy J. Staroń, W. Pietruś, R. Bugno, R. Kurczab, G. Satała, D. Warszycki, T. Lenda, A. Wantuch, A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, 2021, *Tuning the activity of known drugs via the introduction of halogen atoms, a case study of SERT ligands - Fluoxetine and fluvoxamine*, Eur. J. Med. Chem, 220, 113533) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

Zaprojektowanie struktury prowadzonych badań, synteza badanych związków chemicznych, analiza danych eksperymentalnych, przygotowanie publikacji do druku.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis



Kraków, dnia 17.05.2022r.

**Mgr Wojciech Pietruś**

**Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja,  
Polskiej Akademii Nauk**

### **OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA**

Oświadczam, że w pracy J. Staroń, **W. Pietruś**, R. Bugno, R. Kurczab, G. Satała, D. Warszycki, T. Lenda, A. Wantuch, A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, 2021, *Tuning the activity of known drugs via the introduction of halogen atoms, a case study of SERT ligands e Fluoxetine and fluvoxamine*, Eur. J. Med. Chem., 220, 113533) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: przywrócenie natywnej sekwencji transporterów serotoniny (odwrócenie punktowych mutacji), przeprowadzeń obliczeń modelowania molekularnego m.in. dokowania, dokowania z indukowanym dopasowaniem oraz przeprowadzanie dynamiki molekularnej oraz szczegółowa analiza oddziaływań powstających w trakcie dynamiki; wykonanie obliczeń kwantowo-mechanicznych przy użyciu oprogramowania ADF oraz AIMAll, jak również obliczenie wielkości sigma dziury w układach modelowych; przygotowanie ilustracji podsumowujących przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów oraz współudział w końcowej redakcji manuskryptu.



Podpis

Kraków, dnia 18.05.2022r.

Dr Ryszard Bugno

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja,  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy J. Staroń, W. Pietruś, **R. Bugno**, R. Kurczab, G. Satała, D. Warszycki, T. Lenda, A. Wantuch, A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, 2021, *Tuning the activity of known drugs via the introduction of halogen atoms, a case study of SERT ligands e Fluoxetine and fluvoxamine*, Eur. J. Med. Chem, 220, 113533) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: synteza związków, analiza wyników i współudział w redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Kraków, dnia 18.05.2022r.

**Dr hab. Rafał Kurczab**

**Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja,  
Polskiej Akademii Nauk**

### **OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA**

Oświadczam, że w pracy J. Staroń, W. Pietruś, R. Bugno, **R. Kurczab**, G. Satała, D. Warszycki, T. Lenda, A. Wantuch, A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, 2021, *Tuning the activity of known drugs via the introduction of halogen atoms, a case study of SERT ligands - Fluoxetine and fluvoxamine*, Eur. J. Med. Chem, 220, 113533) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: analiza i wizualizacja wiązań halogenowych, współudział w redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Kraków, dnia 18.05.2022r.

**Dr Grzegorz Satała**

**Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja,  
Polskiej Akademii Nauk**

### **OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA**

Oświadczam, że w pracy J. Staroń, W. Pietruś, R. Bugno, R. Kurczab, **G. Satała**, D. Warszycki, T. Lenda, A. Wantuch, A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, 2021, *Tuning the activity of known drugs via the introduction of halogen atoms, a case study of SERT ligands - Fluoxetine and fluvoxamine*, Eur. J. Med. Chem., 220, 113533) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: wykonanie pomiarów powinnowactwa SSRI do SERT oraz analiza danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

.....

Podpis

Kraków, dnia 13.05.2022

Mgr Tomasz Lenda

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja,  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy J. Staroń, W. Pietruś, R. Bugno, R. Kurczab, G. Satała, D. Warszycki, T. Lenda, A. Wantuch, A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, 2021, *Tuning the activity of known drugs via the introduction of halogen atoms, a case study of SERT ligands e Fluoxetine and fluvoxamine*, *Molecules*, 220, 113533) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: prowadzenie hodowli komórkowej i przygotowanie materiału do badań powinowactwa związków.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Kraków, dnia 17.05.2022r.

Prof. dr hab. Andrzej J. Bojarski

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk

### OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy J. Staroń, W. Pietruś, R. Bugno, R. Kurczab, G. Satała, D. Warszycki, T. Lenda, A. Wantuch, A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, B. Duszyńska, **A. J. Bojarski**, 2021, *Tuning the activity of known drugs via the introduction of halogen atoms, a case study of SERT ligands – Fluoxetine and fluvoxamine*, European Journal of Medicinal Chemistry, 220, 113533, mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: współudział w końcowej redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



.....

Podpis

Kraków, dnia 19.05.2022r.

**Dr Beata Duszyńska**

**Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja,  
Polskiej Akademii Nauk**

### **OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA**

Oświadczam, że w pracy J. Staroń, W. Pietruś, R. Bugno, R. Kurczab, G. Satała, D. Warszycki, T. Lenda, A. Wantuch, A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, **B. Duszyńska**, A. J. Bojarski, 2021, *Tuning the activity of known drugs via the introduction of halogen atoms, a case study of SERT ligands - Fluoxetine and fluvoxamine*, Eur. J. Med. Chem, 220, 113533) mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: współudział w redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Wojciecha Pietruś jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis