

**Mgr Wojciech Pietruś**

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

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

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja, Polskiej Akademii Nauk

oraz

Zakładzie Krystalochemii i Krystalofizyki, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Jagiellońskiego

Promotorzy:

Dyscyplina: nauki farmaceutyczne: Dr hab. Rafał Kurczab

nauki chemiczne: Dr hab. Justyna Kalinowska-Tłuścik

**Streszczenie w języku polskim**

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 oraz aktywność biologiczną. To sprawia, że fluorowanie projektowanych leków stało się standardową strategią, mającą na celu zwiększenie biodostępności związku oraz optymalizacji aktywności biologicznej. Tylko w ostatniej dekadzie niemal 30% leków zatwierdzonych przez FDA zawierało fluor, a fluorowane farmaceutyki stanowią ponad 50% najbardziej dochodowych preparatów

lecniczych. Pomimo szerokiego zastosowania, istotnym problemem jest ustalenie zasad racjonalnego projektowania odpowiednich fluorowanych pochodnych, pozwalających na uzyskanie cząsteczek o pożądanymi właściwościami fizykochemicznymi oraz biologicznymi.

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano teoretyczne układy modelowe, w fazie skondensowanej i ciekłej, analizę struktury krystalicznej małych cząsteczek i układów ligand–receptor (L-R) oraz dane dotyczące aktywności biologicznej. Realizując postawione cele badawcze przeprowadzono obliczenia kwantowo-mechaniczne m.in. za pomocą oprogramowania Gaussian, AIMAll, ADF czy MultiWFN, symulację dynamiki molekularnej opartej na polach siłowych i dynamiki *ab initio* (AIMD) oraz metody modelowania molekularnego (m.in. dokowania molekularnego, czy dokowanie z indukowanym dopasowaniem). W pracy wykorzystano również analizę chemoinformatyczną klifów aktywności i dopasowanych par molekularnych, wykorzystując do tego celu dane zawarte w bazie ChEMBL. Badania te zostały przeprowadzone podczas stażu naukowego w grupie prof. Jürgena Bajoratha na Uniwersytecie w Bonn. Znaczną część eksperymentów realizowanych w ramach przedstawionej pracy stanowiły również metody spektroskopii oscylacyjnej (w podczerwieni i ramanowskiej), krystalizacja oraz analiza struktur krystalicznych.

Początkowe badania miały na celu określenie bezpośredniego i pośredniego wpływu miejsca podstawienia fluoru w układach aromatycznych na powstające międzycząsteczkowe wiązania wodorowe (HB) w układzie modelowym, który stanowiła anilina i jej pochodne [Pietruś i wsp., *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2021]. Wykazano, że pozycja podstawienia fluorem istotnie zmienia zasadowość grupy aminowej oraz kwasowość protonów znajdujących się w pierścieniu aromatycznym, jednocześnie zmniejszając dostępność wolnej pary elektronowej atomu azotu (szczególnie w meta-fluoro pochodnej). Otrzymane wyniki wskazują na osłabienie HB dla grupy aminowej oraz zmniejszenie częstotliwości ich powstania, poprzez wzrost znaczenia słabych wiązań wodorowych z grupą CH w charakterze donora. Następnie rozszerzono układ o dodatkowy atom halogenu (Cl, Br, J) w pozycji *para* względem grupy aminowej, w celu zbadania wpływu fluoru na tworzenie wiązań halogenowych (XB) i wodorowych [Pietruś i wsp., *ChemPhysChem*, 2021]. Podczas realizacji badań przeprowadzono krystalizację mono- i difluorowanych (w pozycji *orto*) pochodnych para-halogenoanilin oraz niefluorowanych pochodnych. Analiza uzyskanych struktur wykazała, że sąsiedztwo fluoru z grupą aminową w 4-halogenoanilinach nie wywołuje efektu indukcyjnego, ale zwiększa dostępność wolnej pary elektronowej atomu

azotu. W difluorowanych pochodnych, fluor staje się konkurencyjnym i atrakcyjnym akceptorem HB i XB 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 podstawniku halogenowym. Warto podkreślić, że otrzymane wyniki sugerują, że HB z fluorem powodują przesunięcie pasm rozciągających grup donorowych w kierunku wyższych liczb falowych w spektroskopii oscylacyjnej.

Kolejnym elementem pracy było określenie roli HB z fluorem w układach biologicznych, bazując na wynikach analizy struktur krystalicznych kompleksów ligand-białko zdeponowanych w bazie PDB [Pietruś i wsp., *Molecules*, 2022]. Uzyskane wyniki sugerują, że fluor preferuje hydrofobowe otoczenie w układach biologicznych, a dzięki trzem wolnym parom elektronowym fluoru, na energię obserwowanych HB wpływa głównie odległość donor-akceptor, a nie kąt tych oddziaływań. Wszystkie wyniki sugerują, że fluor nie tworzy silnych, stabilizujących oddziaływań międzycząsteczkowych w układach biologicznych, 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 makromolekuły z fluorem. W celu znalezienia racjonalnych zasad projektowania nowych, fluorowanych związków biologicznie aktywnych, działających na aminergiczne receptory klasy A GPCR, przeprowadzono analizę chemoinformatyczną klifów aktywności (AC) i dopasowanych par molekularnych (MMP) [Pietruś i wsp., *Biomolecules*, 2021]. Uzyskane wyniki wskazują na to, że korzystnym miejscem fluorowania związków w pierścieniu aromatycznym jest pozycja *orto* względem pojedynczego wiązania, natomiast fluorowanie fragmentów alifatycznych najczęściej prowadzi do spadku aktywności biologicznej. Ostatnia praca dotyczyła wyjaśnienia wpływu i roli fluoru obecnego w inhibitorach wychwyty zwrotnego serotoniny (SRRI) na aktywność transportera serotoniny (SERT) [Staroń, Pietruś i wsp., *Eur. J. Med. Chem*, 2021]. Przeprowadzone badania wykazały, że fluor istotnie zwiększa rozmiar  $\sigma$ -dziury sąsiadujących halogenowców, a jego wpływ jest zależny od pozycji podstawienia w pierścieniu aromatycznym. Przeprowadzona teoretyczna analiza modelu wiązania otrzymanych pochodnych SSRI do SERT wykazała możliwość powstania korzystnych oddziaływań X-HBD (hybrydowe oddziaływanie XB i HB), jednak ze względu na dualny charakter oddziaływań X-HBD, sumaryczny wpływ fluoru na atom halogenu był niekorzystny i jego wpływ na aktywność biologiczną był zaniedbywalny.

**Podsumowując, wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej opublikowane w postaci cyklu 5 oryginalnych prac wskazują, że fluor wpływa na wiele właściwości fizykochemicznych cząsteczek, dlatego tak problematycznym jest znalezienie uniwersalnych reguł zastosowania tego pierwiastka w chemii medycznej. Wyniki wskazują również, że międzycząsteczkowe oddziaływania z fluorem mają niewielkie znaczenie w układach biologicznych. Wśród ligandów aminergicznym receptorów klasy A GPCR najbardziej korzystnym miejscem fluorowania w pierścieniu aromatycznym wydają się pozycja *orto* względem pojedynczego wiązania, natomiast dla fragmentów alifatycznych fluorowanie ma raczej negatywny wpływ na aktywność biologiczną.**

### **Streszczenie w języku angielskim**

Currently, fluorine is a commonly used element in all spheres of everyday life, such as in the pharmaceutical, military, or electromechanical industries. Due to its highest electronegativity among 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. Nowadays, 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 FDA-approved drugs contained fluorine and fluorinated pharmaceuticals account for over 50% of the most profitable drugs. However, an important problem is to establish the rules of thumb for the rational design of fluorinated derivatives, allowing to obtain molecules with the desired physicochemical and biological properties.

The theoretical model systems, in condensed and liquidphase, crystal structures of small molecules and ligand-receptor complexes (L-R) as well as biological activity data were applied in the conducted research work. During the implementation of the set research goals, quantum-mechanical calculations were carried out, i.a. using Gaussian, AIMAll, ADF or MultiWFN software, molecular dynamics based on force fields and *ab initio* dynamics (AIMD), molecular modeling methods (including molecular docking, induced fit docking). In this work also the chemoinformatic analysis of activity cliffs and matched molecular pairs algorithm were used. This stage of the project was carried out during the internship in the group of prof. Jürgen Bajorath at the University of Bonn. A significant part of the presented

research focuses on application of the vibrational spectroscopy (infrared and Raman) methods, crystallization and crystal structure analysis.

The initial research aimed at determining the direct and indirect influence of the fluorine substitution and its location in aromatic systems on intermolecular hydrogen bonds (HB) formation, using aniline and its fluorinated derivatives as a model system [Pietruś et al., *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2021]. It has been shown that the position of fluorine substitution significantly modifies the acidity of the amine group and protons in the aromatic ring while reducing the availability of a free electron pair of the nitrogen atom (especially in the metafluoro derivative). The obtained results indicate a weakening and reduction of the frequency of HBs formation for the amino group and the increase of weak hydrogen bonds importance with the CH groups as donors. Then the model system was extended by the presence of an additional halogen atom (Cl, Br, J) in the *para* position to study the influence of fluorine on the formation of halogen (XB) and hydrogen bonds [Pietruś et al., *ChemPhysChem*, 2021]. For this purpose, the crystal structure analysis of mono- and difluorinated *ortho*-derivatives of para-halogenoanilines and non-fluorinated derivatives were carried out. The proximity of fluorine to the amino group in 4-halogenoanilines does not cause an induction effect but increases the availability of the electron lone pair of nitrogen instead. In difluorinated derivatives, fluorine becomes a competitive and attractive acceptor for HB and XB and increases the likelihood of halogen-halogen interactions formation (Cl $\cdots$ F, Br $\cdots$ F, F $\cdots$ F). It is worth noting that the obtained results suggest that HB with fluorine causes a shift of the donor group stretching bands towards higher wavenumbers in vibrational spectroscopy.

Another aspect of the conducted research was to determine the role of HB with fluorine in biological systems, based on the analysis of the ligand-protein crystal structures deposited in the PDB [Pietruś et al., *Molecules*, 2022]. The results suggest that fluorine prefers a hydrophobic environment in biological systems, and due to the three free electron pairs of fluorine, the energy of the observed HBs formed with fluorine is dependent on the donor-acceptor distance rather than the angle of this interaction. All the results suggest that fluorine does not form strong, stabilizing intermolecular interactions in biological systems, and thus it seems that the indirect influence of this element on the ligand's electronic structure (electrostatic, inductive, and resonance effects) has a stronger impact on the biological activity of compounds than the stabilizing interaction with a macromolecule. To find the rules of thumb for designing new, fluorinated biologically active compounds acting on the

aminergic A GPCRs, chemoinformatic analysis of activity cliffs (AC) and matched molecular pair analysis (MMP) were performed [Pietruś et al., *Biomolecules*, 2021]. The obtained data indicates that the *ortho* position to single bond is the preferred site for fluorination of the aromatic ring, while fluorination of aliphatic fragments usually leads to a decrease in biological activity. The last of the presented work focuses on elucidating the influence and role of fluorine in serotonin reuptake inhibitors (SRRI) on the activity of the serotonin transporter (SERT) [Staroń, Pietruś et al., *Eur. J. Med. Chem.*, 2021]. The conducted research showed that fluorine significantly increases the magnitude of the  $\sigma$ -hole of the closely located halogen and its influence depends on the position of the substitution in the aromatic ring. The analysis of the binding mode of the obtained SSRI derivatives to SERT (based on docking results) showed the possibility of beneficial X-HBD interactions (hybrid XB and HB interactions) formation, but due to the dual nature of X-HBD interaction, the total effect of fluorine on the involved halogen atoms was unfavorable and its influence on biological activity is negligible.

**In summarizing, the results of this doctoral dissertation published in 5 original papers indicate that fluorine affects a wide spectrum of physicochemical properties of molecules, which is why finding universal rules for its application in medicinal chemistry is so problematic. The results also indicate that intermolecular interactions with fluorine are of negligible importance in biological systems. Among the ligands of aminergic receptors of class A GPCRs, the *ortho* position to single bond in the aromatic ring seems to be the most advantageous site of fluorination, while the aliphatic fragments fluorination shows a negative effect on the biological activity.**