



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTA' DI INGEGNERIA

Corso di Laurea triennale in Ingegneria Biomedica

**Utilizzo di polimeri biodegradabili per il rilascio controllato
di farmaci nelle terapie per il trattamento del virus
Sars-Cov2**

**The use of biodegradable polymers in controlled drug
delivery system in therapies for the treatment of
Sars-Cov2**

Relatore:

Prof. **Emiliano Laudadio**

Tesi di Laurea di:

Veronica Avi

Correlatore:

Prof. **Pierluigi Stipa**

A.A. 2019/2020

Sommario

CAPITOLO 1. Introduzione	2
CAPITOLO 2. Il virus: Sars-Cov2	4
2.1. Sars-Cov2 descrizione e sintomatologia	4
2.2. Modalità di trasmissione	7
2.3. Problemi e complicanze	8
2.4. Alcaloide efficace contro il COVID19	9
CAPITOLO 3. MATERIALI: i polimeri	12
3.1 I polimeri: che cosa sono, origini e differenze	12
3.2 Polimeri biodegradabili	15
3.2.1 PLA: acido polilattico	16
3.2.2 PGA: acido poliglicolico	17
3.2.3 PLGA: acido polilattico-co-glicolico	18
3.3 Processi di biodegradazione	19
3.4 I dispositivi a rilascio controllato del farmaco	21
CAPITOLO 4. METODI	25
4.1 Meccanica classica	25
4.2 Analisi conformazionale e minimizzazione dell'energia	32
4.3 Dinamica molecolare	34
4.3.1 Basi teoriche della dinamica molecolare: L'equazione del moto di Newton	35
4.3.2 Ensembles	35
4.3.3 Condizioni periodiche di contorno	36
4.3.4 Coupling della temperatura e della pressione	36
4.3.5 Modelli di solvente	37
4.3.6 Lo scoring	38
4.3.7 Settaggio del sistema	38
CAPITOLO 5. RISULTATI	40
5.1 Sistemi polimerici senza farmaco	40
5.2 Sistemi polimerici con il farmaco	43
5.2.1 PLA Chinino	43
5.2.2 PGA Chinino	45
5.2.3 PLGA Chinino	46
CAPITOLO 6. CONCLUSIONI	47
BIBLIOGRAFIA	49

CAPITOLO 1. Introduzione

I drug delivery systems (DDS), meglio conosciuti come sistemi a rilascio controllato del farmaco, sono strumenti molto innovativi in campo biomedico. In generale quando parliamo di assunzione di farmaci non pensiamo a molti possibili inconvenienti che si possono verificare, come ad esempio, i livelli ematici, che rientrano nel range terapeutico della molecola somministrata, rischiando di essere efficaci in tempi relativamente brevi. Si incorre quindi nel rischio che il farmaco abbia un'azione di breve durata. Per questo motivo i sistemi a rilascio controllato del farmaco possono essere un'ottima alternativa ai normali metodi di somministrazione. Essi, infatti, attraverso metodiche che verranno spiegate successivamente nella trattazione regolano il rilascio del farmaco per rispondere a due scopi fondamentali:

- Controllo della velocità di rilascio del principio attivo o della molecola che può essere aumentata o diminuita
- Controllo del rilascio del farmaco in siti specifici, dando quindi la possibilità al principio attivo di agire nelle zone mirate. Aumentandone così l'efficacia e diminuendone la tossicità per i tessuti circostanti.

Per le caratteristiche sopra elencate, è molto intuitivo capire che un possibile utilizzo di tali approcci può riguardare terapie antitumorali più efficaci e meno distruttive rispetto alla chemioterapia.

Ciò che ho analizzato e studiato in questo progetto di tesi è un ulteriore utilizzo che si può fare di questi DDS. La scelta del mio argomento di tesi è stata certamente influenzata dal virus ormai a noi tutti tristemente noto, e protagonista di questo ultimo anno. IL mio lavoro di tesi si è focalizzato allo sviluppo di sistemi in grado di limitare il contagio da Sars-Cov2, anche noto con il nome di Covid19. La ricerca scientifica è in generale molto sottovalutata e pochissimi fondi vengono spesi a favore di questo settore, il quale invece rappresenta il pilastro fondamentale dell'innovazione e dello sviluppo di tutte le aree e settori scientifico-disciplinari.

L'attenzione dei ricercatori, provenienti da tutte le parti del mondo, si è focalizzata sullo sviluppo e la sintesi di un possibile vaccino che potesse essere efficace contro questo feroce virus.

Allo stesso tempo si è cercato di trovare molecole che aiutassero a prevenire o anche curare patologie legate al virus Sars-Cov2, ad esempio rallentandone la diffusione e/o diminuirne il tasso di contagiosità. Nel corso dell'ultimo anno piccole molecole sintetiche e naturali, già usate per curare altre patologie, e materiali di diverse caratteristiche sono stati oggetto di interesse per la ricerca, l'innovazione e lo sviluppo scientifico finalizzato alla limitazione del grado di contagiosità del virus Sars-Cov2. Per tutti questi motivi ho deciso di incentrare il mio lavoro di tesi sulla ricerca e in

particolare concentrarmi sullo studio di una possibile soluzione alla propagazione dell'ormai più che noto virus denominato Sars-Cov2.

In questa ottica, lo scopo di questa tesi è lo studio *in silico* della cinetica di rilascio di molecole alcaloidi da utilizzare come inibitori della propagazione virale. Il progetto di tesi si prefigge di veicolare tali piccole molecole con opportuni vettori polimerici biocompatibili e facilmente assimilabili dall'organismo umano senza l'innesco di processi infiammatori.

CAPITOLO 2. Il virus: Sars-Cov2

2.1 Sars-Cov2 descrizione e sintomatologia

Negli ultimi due decenni, i coronavirus (CoV) sono stati associati a significativi focolai di malattie in Asia orientale e Medio Oriente. Nel corso del 2002 e del 2012 si sono manifestate la sindrome respiratoria acuta grave (SARS) e la sindrome respiratoria del Medio Oriente (MERS) rispettivamente. In entrambi i casi i portatori di questi virus si sono rivelati essere animali non domestici, in particolare pipistrelli. Nel corso del tempo i virus hanno operato l'ormai noto salto di specie, con trasmissioni agli umani per mezzo di altri animali "intermediari" (figura 1) [1].

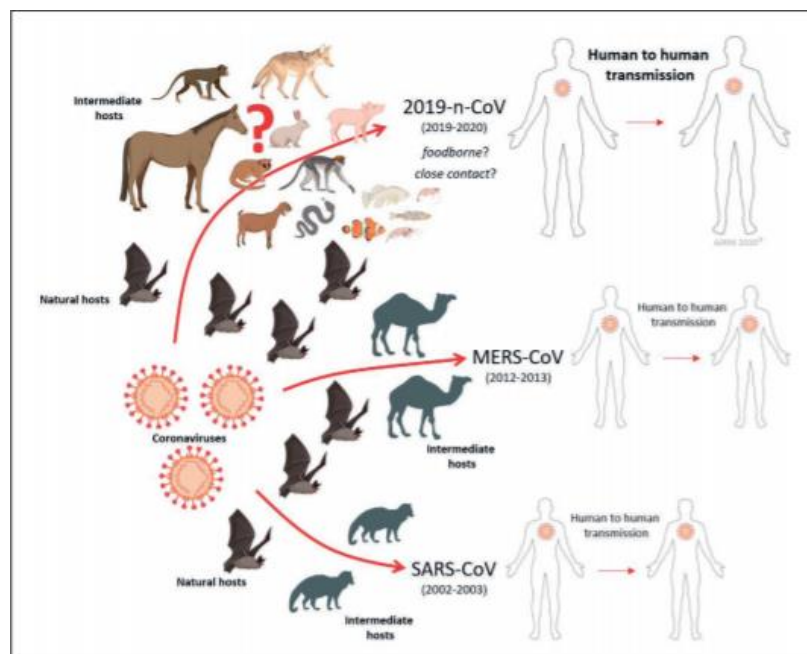


Figura 1. Potenziale origine animale dei coronavirus

Recentemente, un nuovo coronavirus, il SARS-CoV-2 (figura 2), isolato e caratterizzato per la prima volta alla fine del 2019 in Cina, sta terrorizzando l'intera popolazione mondiale a causa soprattutto dell'alto numero di morti che sta causando. Non è tuttavia ancora chiaro come sia avvenuta la trasmissione dal mondo animale all'uomo. Sappiamo per certo, però, che questo virus è il responsabile della pandemia attuale e rappresenta una minaccia per la salute globale, causando un elevato numero di contagi e di morti [1].

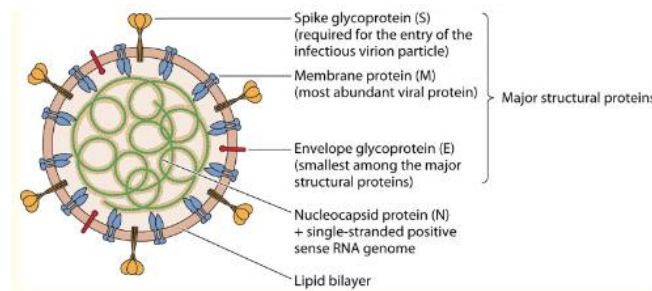


Figura 2. Struttura del Sars-Cov2

I coronavirus sono virus a RNA a singolo filamento positivo ed hanno un range di ospiti molto elevato, potendo nuocere a diversi sistemi. Possiamo analizzare la struttura del virus riferendoci alle immagini trovate in letteratura. Esso è circondato da un involucro che contiene il genoma virale [3]. Inoltre, ha delle protuberanze che sporgono dall'involucro; queste rappresentano le ormai famose proteine "Spike" e hanno un ruolo molto importante nella vita del virus.

Il materiale genetico dei coronavirus contengono le informazioni di quattro tipi di proteine strutturali:

- Spike (S), è la proteina responsabile della forma "a corona" del virus. È possibile suddividerla in due subunità, S₁ e S₂; la prima subunità la ritroviamo nel legame con il recettore della cellula ospite, mentre la seconda è la responsabile del processo di fusione e quindi del conseguente ingresso del virus all'interno della cellula ospite.
- Membrane (M) è la tipologia di proteina responsabile della forma del virus stesso
- Nucleocapside (N) rappresenta un tipo di proteina che ha molteplici funzioni, come ad esempio, la formazione del genoma virale.
- Envelope (E): alcuni studi suggeriscono che questo tipo di proteina, che funge da involucro, giochi un ruolo fondamentale per la vita del virus, nella patogenesi, nell'assemblaggio e nel rilascio del virus stesso [4].

La proteina S rappresenta il principale oggetto di ricerca, poiché è proprio la diversità di quest'ultima rispetto a quella presente nel virus legato alla malattia SARS a creare il problema più importante legato all'altissimo livello di trasmissibilità del virus Covid19.

Per capire le differenze di questa proteina è importante capire in che modo il virus entra nella cellula ospite (figura 3) e quali sono le modalità di propagazione [4].

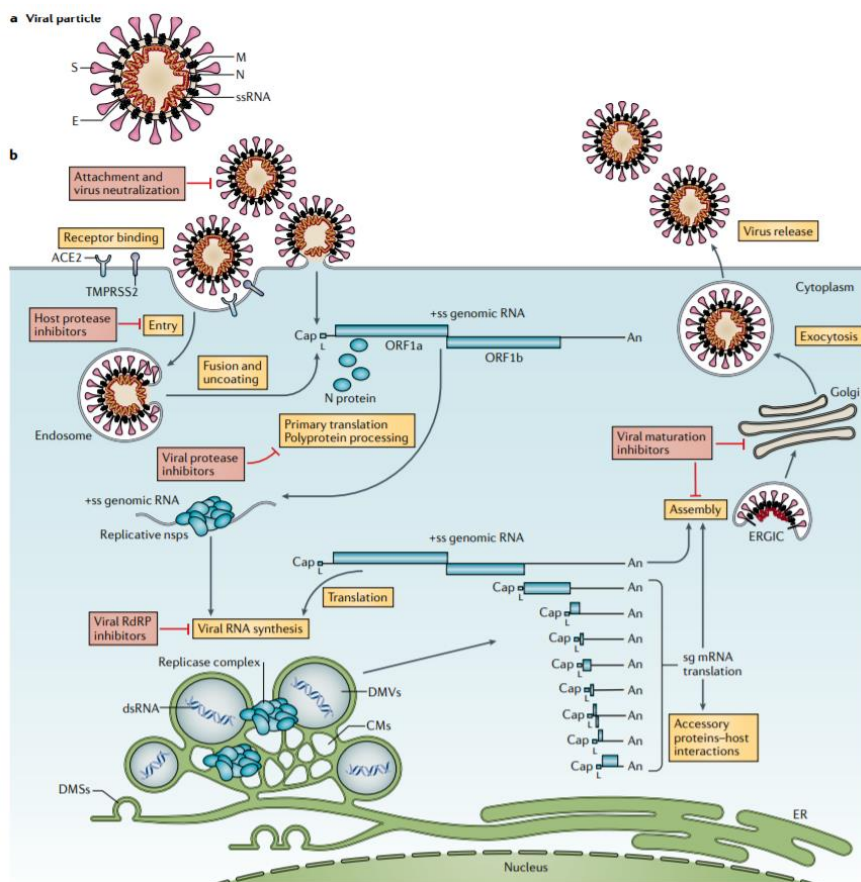


Figura 3 Il coronavirus: la struttura e il ciclo vitale

Le particelle di virus entrano nella cellula attraverso specifici legami tra le proteine virali Spike e recettori di membrana cellulare, come l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) e la serina proteasi (TMPRSS2) [4]. Una volta entrato, il virus procede con il rilascio del suo genoma infetto, che attraverso opportune trascrizioni e traduzioni andrà a modificare le normali attività cellulari promuovendo la sintesi di componenti virali [2]. La cellula, quindi, replica il genoma virale, e dopo opportuni passaggi, e attraverso l'apparato del Golgi, le proteine virali neotratte si propagano nell'organismo.

I seguenti sintomi sono considerati di primaria importanza nell'individuazione di un eventuale contagio dal virus in esame:

1. difficoltà acute avvertite nelle vie respiratorie (mal di gola, tosse perlopiù secca, affanno, dolori al petto);
2. febbre;
3. perdita improvvisa dell'olfatto e/o del gusto.

Possono inoltre comparire altri sintomi, di più difficile specifica associazione con il virus, come:

- mal di testa;

- malessere, debolezza generale;
- dolori muscolari;
- raffreddore;
- sintomi gastrointestinali (nausea, vomito, diarrea, mal di pancia);
- eruzioni cutanee.

Guardando alla poca specificità dei sintomi, e considerando l'elevata analogia con i più canonici sintomi influenzali, è evidente che risalire all' effettivo contagio da Covid19 è abbastanza complicato, a meno che non si conosca l'esito di un eventuale test clinico. Questo è infatti uno dei grandi problemi legati a questo virus, oltre ovviamente al grado di contagiosità.

Inoltre, è importante anche ricordare che sono noti moltissimi casi di asintomatologia [5], ovvero moltissimi individui affetti da Covid19 che non presentano il minimo sintomo, non sapendo quindi di essere infetti. La pericolosità di questi individui sta nel fatto che pensando di essere in salute possono venire a contatto con altre persone, e questo può causare il contagio soprattutto per individui più deboli a livello immunitario, come ad esempio le persone anziane.

2.2 Modalità di trasmissione

La trasmissione di Sars-Cov2 è un grave problema, poiché le modalità attraverso le quali si verifica possono essere molteplici e poco controllabili. Riferendoci ai dati del ministero della salute possiamo apprendere che il Covid-19 può essere trasmesso (figura 4):

- in modo diretto
- in modo indiretto (attraverso oggetti o superfici contaminati)
- per contatto stretto con persone infette attraverso secrezioni della bocca e del naso (saliva, secrezioni respiratorie o goccioline droplets).

Quando una persona malata tossisce, starnutisce, parla o canta, queste secrezioni vengono rilasciate dalla bocca o dal naso.

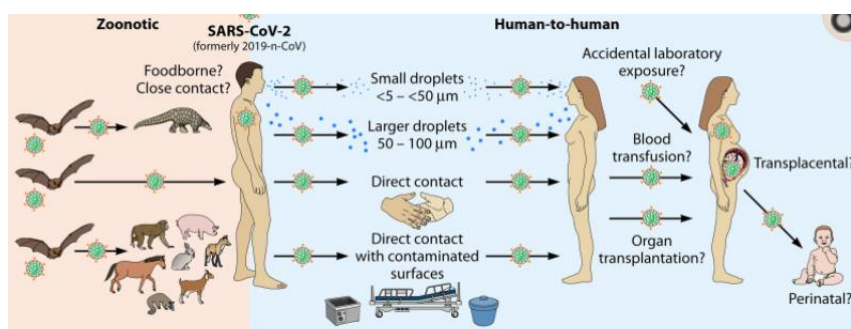


Figura 4. Potenziali canali di trasmissione del SARS-CoV-2

Le persone che sono a stretto contatto (distanza inferiore di 1 metro) con una persona infetta possono contagiarsi se le goccioline (droplet) emanate entrano nella bocca, nel naso o negli occhi. Detto ciò, le misure preventive che possono essere prese affinché si possa in qualche modo controllare il contagio sono quelle di mantenere una distanza fisica di almeno un metro, lavarsi frequentemente le mani e indossare la mascherina [2]. Le persone malate possono rilasciare goccioline (droplets) infette su oggetti e superfici (chiamati fomite) quando starnutiscono, tossiscono o toccano superfici (tavoli, maniglie, corrimano). Toccando questi oggetti o superfici, altre persone possono contagiarsi toccandosi occhi, naso o bocca con le mani contaminate (non ancora lavate). Questo è il motivo per cui è essenziale lavarsi correttamente e regolarmente le mani con acqua e sapone o con un prodotto a base alcolica e pulire frequentemente le superfici, con prodotti specifici sempre a base alcolica.

2.3 Problemi e complicanze

Nei casi più gravi l'infezione può causare polmonite, sindrome respiratoria acuta grave, insufficienza renale e persino la morte. Si possono quindi verificare malattie del tratto respiratorio inferiore, e ciò avviene più comunemente nelle persone con preesistenti patologie croniche dell'apparato cardiovascolare e/o respiratorio, e soggetti con un sistema immunitario indebolito, nei neonati e negli anziani. [1]

Un altro problema, più di tipo logistico, riguarda il sovraffollamento delle strutture ospedaliere. Infatti, è ben noto che nel momento in cui un paziente presenta una sintomatologia più grave deve necessariamente essere intubato ed accedere ai reparti ospedalieri di terapia intensiva. All'interno di tali strutture si andrà incontro all'utilizzo di strumentazioni adeguate e sofisticate allo stesso tempo, per combattere la malattia e poi per garantire la ripresa del paziente.

Chiaramente i numeri sono limitati, in Italia il numero totale di posti letto nelle terapie intensive è di 30.000, quindi è chiaro che questo numero è irrisorio rispetto al numero di persone contagiate.

Una efficace soluzione per mettere fine alla pandemia in corso è certamente quella di sintetizzare un vaccino efficace contro questo virus. Fortunatamente sono molte le aziende che stanno lavorando per una veloce e sicura produzione dello stesso, e già alcune dosi sono arrivate anche in Italia. Tuttavia, pensare di poter vaccinare l'intera popolazione in poco tempo rimane una prospettiva lontana, e a tal proposito la ricerca si sta focalizzando anche sulla possibilità di sintetizzare farmaci che possano provare a prevenire la diffusione del virus, oltre che, parallelamente, sulla sperimentazione per il vaccino. [2]

2.4. Alcaloide efficace contro il COVID19

Focalizzando l'attenzione sull'obiettivo della trattazione, attingendo dallo stato dell'arte relativo all'utilizzo di piccole molecole utilizzate per il trattamento del virus Sars-Cov2, nelle prime fasi del lavoro di tesi mi sono focalizzata nell'individuazione della molecola che potrebbe essere efficace contro questo feroce virus. In particolare, la mia attenzione è stata rivolta all'utilizzo di sostanze naturali, in particolare alcaloidi. Un alcaloide è una molecola organica costituita da carbonio, ossigeno, idrogeno e azoto; proprio a causa della presenza di quest'ultimo, l'alcaloide si comporta da base di Brønsted-Lowry reagendo con specie chimiche a carattere acido per formare specie saline.

Queste molecole sono contenute in numerose piante, in particolare nelle Dicotiledoni (apocinacee, papaveracee, papilionacee, solanacee ecc.), spesso localizzate nei semi, nelle foglie, nei rizomi e nella corteccia (Enciclopedia Treccani). Ciò che emerge dalla letteratura scientifica è che, in generale, l'utilizzo di estratti naturali dalle piante ha accompagnato la storia dell'uomo in ogni suo periodo storico nel trattamento di varie patologie. Ciò vuol dire che ci sono molti esempi di molecole naturali note per essere efficaci contro le più svariate patologie.

Tra le innumerevoli strutture chimiche relative ai differenti principi attivi noti, la mia attenzione è stata catturata dal chinino. Esso venne utilizzato contro la malaria [6], ed oggi recenti e importanti ricerche hanno permesso di rivalutare questa molecola in relazioni ad effetti antivirali che questa potrebbe avere. Alcuni studi, quindi, hanno aperto ad un suo possibile utilizzo per un trattamento contro il virus Sars-CoV2.

Il chinino è un alcaloide presente nella *Cinchona officinalis* (figura 5), circa 40 specie di questa pianta crescono in Sud America. Durante la coltura, i rami inferiori della pianta vengono potati in modo che la corona dell'albero cresca e il tronco si trovi all'ombra. In essa sono presenti vari tipi di alcaloidi.

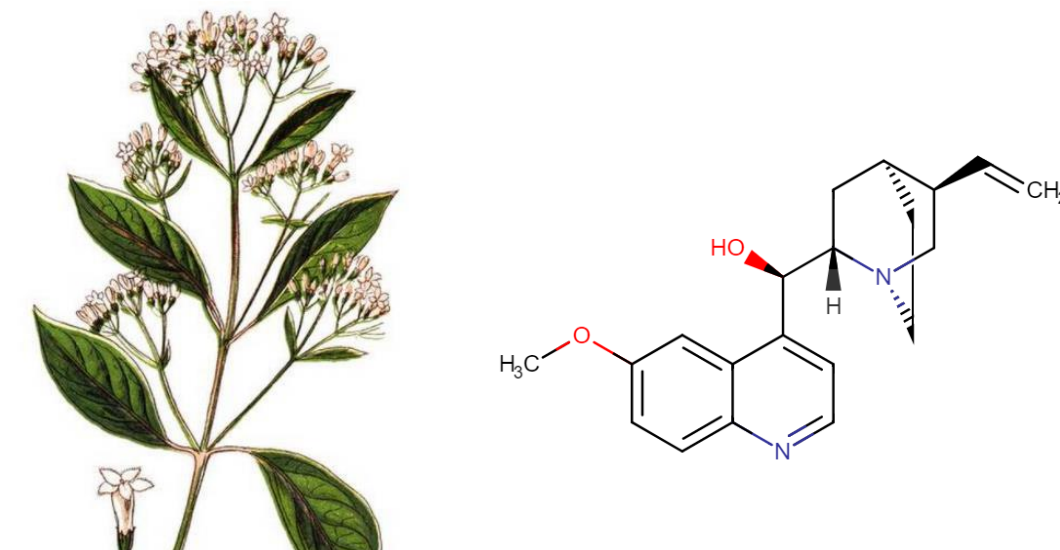


Figura 5. *Cinchona officinalis* e struttura chimica del chinino

Il 60% di essi possono hanno i seguenti nomi: chinino, chinidina, kinkonina e kinkonidina. I 2/3 di questo tasso è alcaloide "chinino".

Effetti antivirali del chinino sono già stati osservati nei confronti del virus *Herpes Simplex* e del virus influenzale. Le ricerche mostrano che l'effetto combinato legato alla somministrazione di più di venti alcaloidi, piuttosto che di una singola specie chimica, costituisce fonte chiave della loro proprietà, poiché si innesca un effetto sinergico molto efficace. [6]

Per quanto riguarda il Covid19 sono state spesso citate, da diversi esperti, le sostanze cloroquina e idrossicloroquina (figura 6), le quali costituiscono derivati sintetici del chinino, e gli stessi sono già stati utilizzati per il trattamento della malaria e di malattie autoimmuni come il lupus e l'artrite reumatoide. [12]

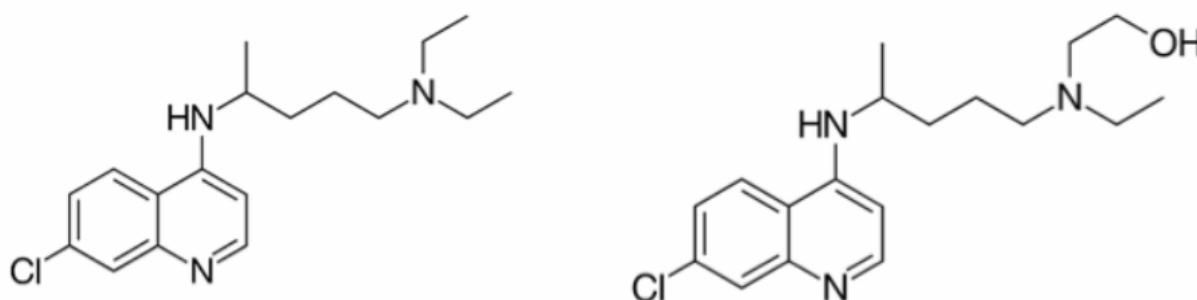


Figura 6. Strutture chimiche della Cloroquina (sinistra) e dell'Idrossicloroquina (destra)

Ad oggi però bisogna ricordare che, se fino a qualche mese fa la Cina e gli USA erano molto interessati allo studio e allo sviluppo di questi farmaci, oggi la situazione è leggermente cambiata. Ciò è dovuto al fatto che in letteratura è possibile trovare lavori discordanti circa l'utilizzo di questi

due farmaci; in particolare la potenziale inefficacia di questi trattamenti può essere individuata in due punti fondamentali:

1. Essendo i due farmaci capaci di contrastare l'ingresso del virus nella cellula, essi dovrebbero essere utilizzati quanto prima; ciò significa che chi ha contratto il Sars-CoV2 ed è in fase avanzata della malattia, non trarrebbe alcun giovamento dall'utilizzo dei suddetti farmaci. Ci sono infatti solo pochi studi ad oggi che dimostrano l'efficacia di un basso dosaggio di idrossiclorochina nella fase avanzata della malattia; tuttavia, il problema permane e non può essere ignorato. [12]
2. Un secondo punto circa l'inefficacia dei precedenti farmaci di sintesi, forse il più importante, riguarda la presenza di possibili effetti collaterali, come ad esempio problemi gastro intestinali [13] e cardiovascolari. Quest'ultimi, anche se rari, a volte possono essere pericolosi ed irreversibili. Per il momento sono stati verificati due casi di trapianto di organi in letteratura [14].

Per questi motivi il 25 maggio del 2020 l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha raccomandato di non utilizzare i due farmaci su pazienti ospedalizzati a seguito della pubblicazione di uno studio nel quale si afferma che non si è in grado di poter garantire l'efficacia dei due farmaci contro il virus. [15]

Per questo motivo diversi studi si sono focalizzati sull'indagare un possibile utilizzo del chinino, il quale risulta il predecessore dei due farmaci, e soprattutto naturale.

Ci sono diversi studi riguardo l'efficacia di questa molecola nel trattamento del Covid19, in essi possiamo trovare la conferma di un possibile nuovo agente per combattere il Sars-CoV2.

Partendo ad esempio da uno studio clinico condotto da un gruppo di ricercatori tra cui, Janina Auth dell'istituto di virologia FAU in Germania, il chinino è stato testato in due versioni:

- Chinino-solfato come materiale solido (commercializzato dal fornitore "Q-Sigma")
- Chinino-solfato estratto da una compressa commercializzata con il nome di "Q-Limptar".

Allo scopo di testare e valutare l'efficacia di questo farmaco composto da chinino sono state utilizzate cellule VeroB4 che sono state infettate con il virus e successivamente trattate con i vari farmaci. Dalla figura 7 tratta dal lavoro di ricerca svolto dai ricercatori Pia Rauch e Janina Auth provenienti dall'istituto di virologia dell'università FAU (Friedrich-Alexander University Erlangen-Nurnberg), possiamo apprendere che il chinino, in particolare nella forma Q-Sigma mostra un'attività antivirale molto più elevata rispetto alla clorochina e all'idrossiclorochina.

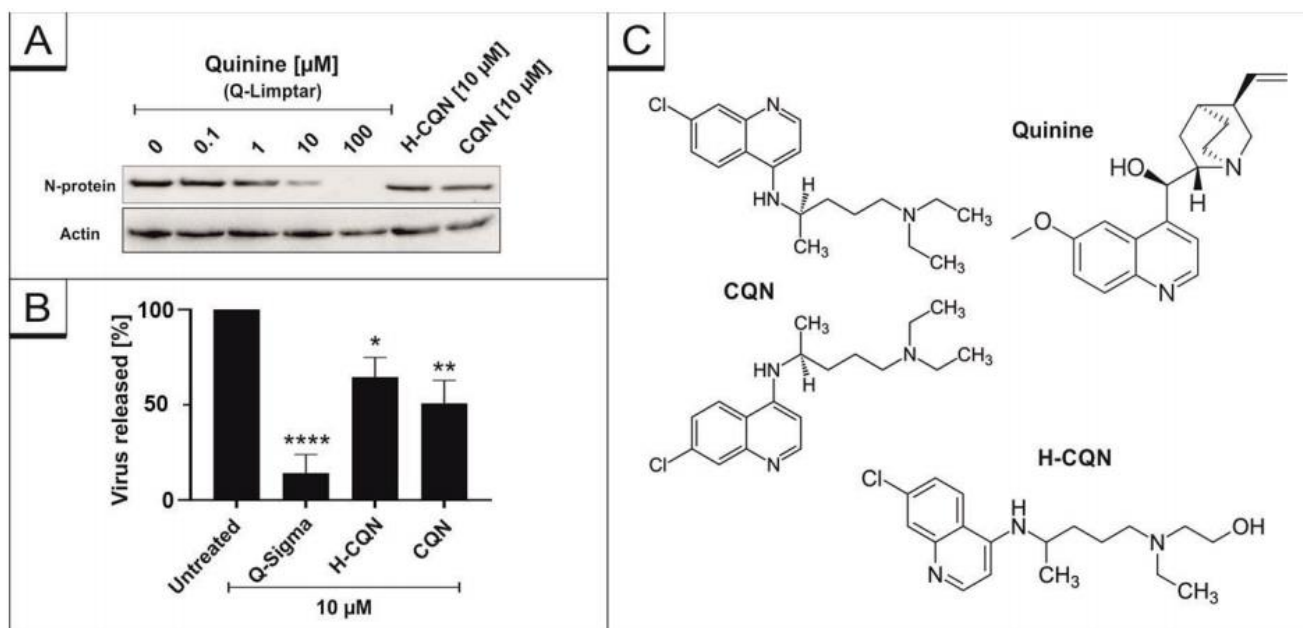


Figura 7. Influenza del chinino, CQN e H-CQN nella replicazione del Sars-CoV-2 nelle cellule vero B4

CAPITOLO 3. MATERIALI: i polimeri

3.1 I polimeri: che cosa sono, origini e differenze

I polimeri sono ormai molto utilizzati in tutti i campi, da quello industriale fino a quello biomedico. La fortuna di questi materiali è dovuta al fatto che sono molto economici e facilmente lavorabili, inoltre le proprietà fisico-meccaniche possono essere modulate in partenza in laboratorio, modificando la concentrazione di un monomero o aggiungendo cariche o additivi, sulla base dell'utilizzo che poi se ne andrà a fare [7].

In particolare, in ambito biomedico i polimeri sono molto utilizzati; grazie soprattutto al fatto che è possibile generare sistemi nano o micro-particellari con proprietà di biocompatibilità e basso livello di tossicità, soprattutto se comparati a sistemi metallici [8]. Con il termine “polimero” si intende una macromolecola ad elevato peso molecolare che è costituita dalla ripetizione di unità dette “unità ripetitive” o monomeri, che sono legate tra loro da legami covalenti. Sulla base della successione dei monomeri e dei legami che si formano tra le diverse unità monomeriche otteniamo le così dette catene polimeriche, le quali avranno proprietà chimico/fisiche differenti in base alla composizione.

I polimeri possono essere distinti in base all'origine in naturali o sintetici:

- a) i polimeri naturali possono essere carboidrati (amido glicogeno e cellulosa)

- b) i polimeri sintetici sono prodotti attraverso una serie di reazioni di sintesi organica in laboratorio.

La cosa importante da sottolineare è che in base alle proprietà e alle varie classi a cui appartengono i polimeri, questi avranno un certo comportamento chimico/fisico a livello macroscopico. I polimeri su cui ci concentreremo in questa trattazione sono i polimeri sintetici, più avanti nel testo verranno meglio spiegati quali sono gli enormi vantaggi di questi rispetto a quelli naturali.

Sono molte le caratteristiche che ci permettono di distinguere un polimero da un altro, in particolare, possiamo capire le differenze sulla base delle diverse classificazioni che possiamo fare degli stessi.

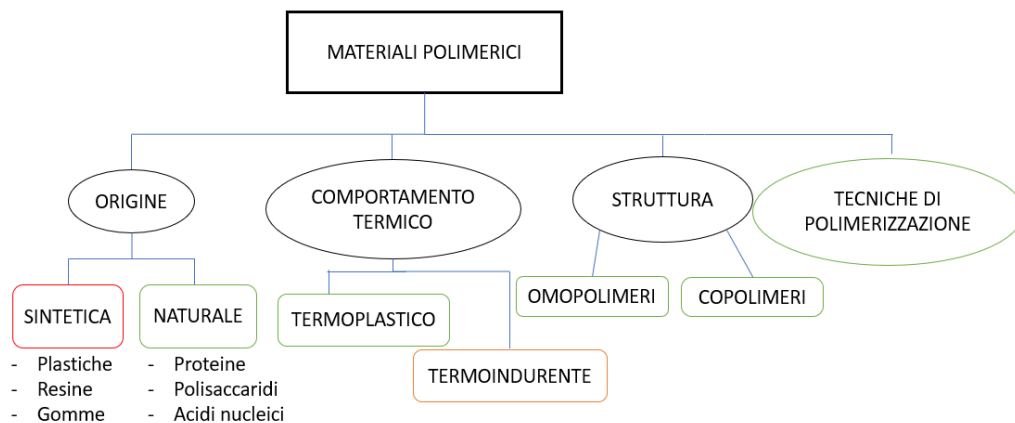


Figura 8. classificazione schematica dei materiali polimerici

Possiamo quindi classificarli sulla base della struttura e quindi dividerli come in figura 8 in omopolimeri, se formati tutti da un solo tipo di monomero, o copolimeri se invece si alternano diverse specie di monomero. Un'altra caratteristica importante che influenza le proprietà meccaniche dei polimeri stessi è la conformazione spaziale che le catene possono assumere.

Si possono distinguere principalmente tre tipi di conformazioni spaziali:

- Un polimero si dice RAMIFICATO, nel momento in cui alla normale catena lineare sono collegate altre ramificazioni laterali. Le singole macromolecole risultano comunque distinguibili fra loro.
- Un polimero si dice LINEARE quando sono presenti lunghe macromolecole filiformi poste in successione, possono esserci legami tra le rispettive macromolecole ma risulteranno essere legami deboli come forze di Van der Waals, legami a idrogeno ed interazioni dipolo-dipolo.
- Un polimero si dice RETICOLATO quando le macromolecole non sono più distinguibili come unità individuali ma sono legate le une alle altre per mezzo di legami forti, solitamente di tipo covalente.

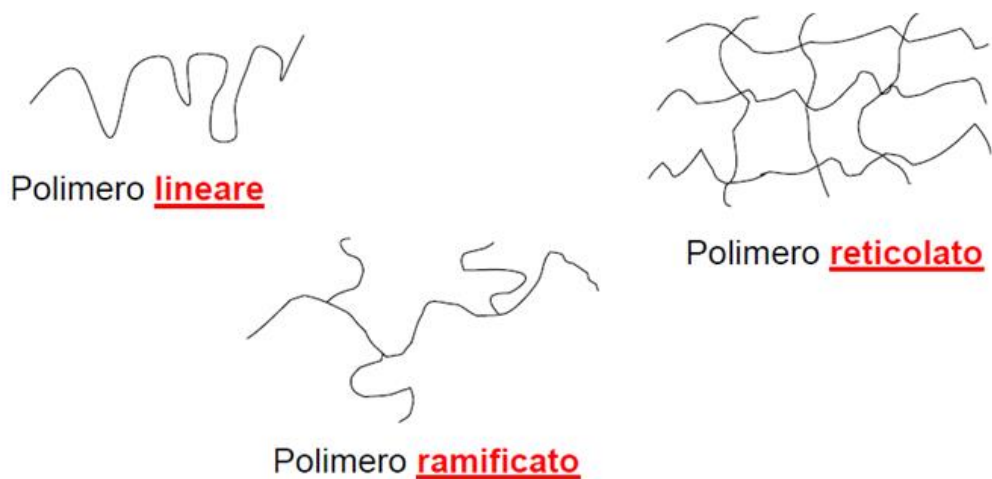


Figura 9. Strutture molecolari dei polimeri

Possiamo distinguere i polimeri in base al tipo di struttura a livello microscopico ovvero come sono organizzate nello specifico le catene. Parliamo di solidi cristallini se i polimeri presentano una struttura ordinata a livello macroscopico, mentre parliamo di polimeri amorfi se presentano una struttura completamente disordinata. (Figura 9)

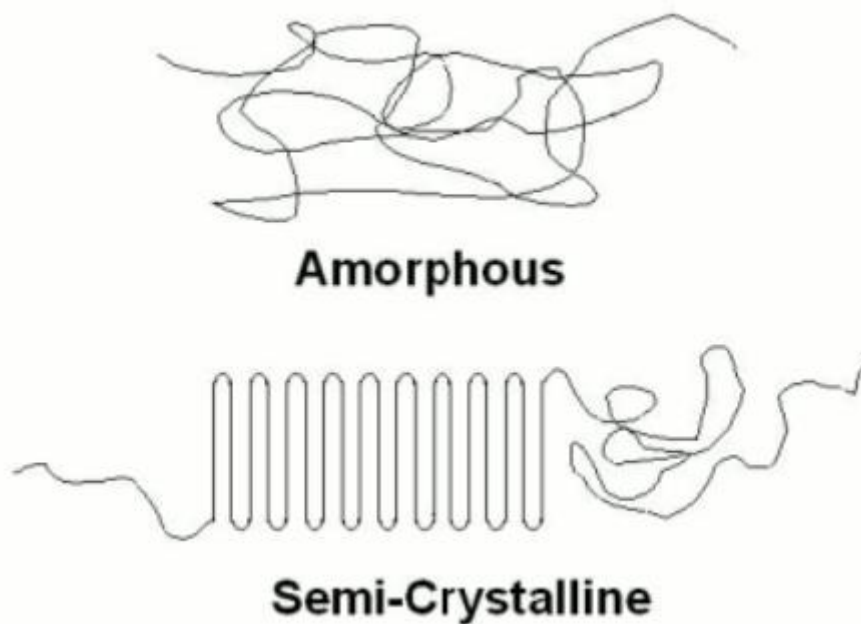


Figura 10. rappresentazione schematica della struttura amorfa e semicristallina di un polimero

Tipicamente un polimero cristallino ha proprietà meccaniche più avanzate rispetto ad un polimero amorfo; in ogni caso in natura non esiste un polimero che sia perfettamente cristallino quindi è più corretto parlare di solido semi-cristallino. Per la nostra trattazione è importante tenere a mente che un

polimero che sia in parte amorfo è per noi fondamentale, poiché le zone amorfe sono più permeabili all'acqua rispetto a quelle cristalline e pertanto permettono la degradazione dei polimeri.

Un'altra possibile classificazione dei polimeri riguarda il comportamento termico di essi; sulla base di questo possiamo distinguere tra polimero termoplastico o polimero termoindurente. Nel primo caso siamo in presenza di un polimero generalmente a struttura lineare o ramificata, il quale all'aumentare della temperatura, avendo solo legami deboli tra gli individui distinti, permette di tornare agli individui iniziali; infatti, un materiale termoplastico solitamente è anche riciclabile. Un materiale termoindurente invece è spesso un materiale che non è riciclabile. In questo caso, all'aumentare della temperatura, i polimeri vanno incontro a reticolazione, ovvero il riscaldamento porta ad ottenere un materiale più forte in termini di resistenza meccanica, e se si aumenta ulteriormente la temperatura non otteniamo l'effetto ottenuto in precedenza, bensì l'effetto opposto, per questo motivo questi materiali sono lavorabili in maniera limitata.

3.2 Polimeri biodegradabili

In ambito biomedico i polimeri più utilizzati sono quelli biodegradabili. Un materiale definito riassorbibile (o biodegradabile) è un materiale che segue un processo di degradazione o dissoluzione della catena molecolare stessa ad opera di meccanismi enzimatici o basati sulla presenza di acqua. [9] In questo modo si hanno processi di idrolisi dei legami che uniscono le diverse componenti di polimero, portando ad ottenere sistemi polimerici più piccoli; successivamente queste molecole più piccole entrano a far parte del normale metabolismo umano e vengono definitivamente riassorbite dal corpo senza innescare processi di tossicità sistemica.

Anche i polimeri biodegradabili possono essere di origine naturale o sintetica, in particolare:

- Quelli di origine naturale (come, ad esempio, il collagene l'albumina ecc) hanno una ottima biocompatibilità
- Quelli di origine sintetica invece possono essere progettati in laboratorio con determinate caratteristiche fisiche meccaniche e anche specifici processi di degradazione.

I principali vantaggi di questi ultimi sono:

- Il tempo di degradazione, che può coincidere con il processo terapeutico o rigenerativo. Il polimero ha proprietà meccaniche appropriate che variano gradualmente in linea con il processo di guarigione.
- I prodotti di degradazione non sono tossici, e possono essere assorbiti o eliminati dal corpo umano.

- Il materiale non provoca una risposta infiammatoria o tossica dopo essere stato somministrato, iniettato o impiantato nel corpo umano [10].

I polimeri di origine naturale possono essere considerati come i primi polimeri utilizzati clinicamente, tuttavia questi presentano dei limiti significativi; il tasso di degradazione varia significativamente a seconda del sito in cui si trovano, in particolare a seconda della presenza degli enzimi. Per questo motivo i polimeri sintetici sono preferiti nell'utilizzo in campo biomedico, in quanto biologicamente inerti e più prevedibili nel loro comportamento *in vivo*. Questo è un fattore chiave se pensiamo all'utilizzo di questi sistemi su larga scala. Quindi i sistemi polimerici sintetici biodegradabili possono essere uniformati e soprattutto vanno incontro a degradazione di tipo idrolitico piuttosto che enzimatico [10].

I sistemi più comuni sono i polimeri di acido poliglicolico (PLG) e di acido polilattico (PLA). Anche il copolimero dei due citati, chiamato PLGA, rappresenta un sistema molto studiato ultimamente.

I principali polimeri che vengono utilizzati e che utilizzeremo in questa trattazione sono appunto:

- il PLA (acido polilattico)
- il PGA (l'acido poliglicolico)
- il PLGA (acido polilattico-co-glicolico)

Andiamo ora a studiare nel dettaglio ciascuna tipologia di polimero andando a sottolinearne le proprietà principali e quelle soprattutto che ci torneranno utili nel corso della trattazione.

3.2.1 PLA: acido polilattico

Il PLA è un poliestere alifatico idrofobo (figura 11), ed è una molecola che ha un centro chirale, quindi esistono due forme ottiche di PLA: D-lattide e L-lattide. [6]. Essendo un polimero di sintesi, molte proprietà, come la cristallinità e le caratteristiche meccaniche possono essere controllate sin dal momento della sua creazione, al fine di ottenere le caratteristiche desiderate [11].

La degradabilità del PLA dipende dal tasso di cristallinità del polimero stesso.



Figura 11: Struttura chimica del PLA

Può essere derivato da risorse biorinnovabili, come il riso, il frumento e la patata dolce, tramite fermentazione e polimerizzazione. [7] La degradazione che subisce è una degradazione di tipo idrolitico proprio grazie alla sua natura sintetica. [8]

Il poli (DL-lattide) (PDLLA) è un polimero amorfo a causa della distribuzione casuale di L- e D-lattide, ovvero le forme chirali levogire e destrogire, ed ha una temperatura di transizione vetrosa di 55-60 °C. A causa della sua natura amorfa il polimero mostra una resistenza decisamente inferiore rispetto a quella del poli(L-lattide), il quale presenta configurazione levogira, manifestando tutta un'altra serie di proprietà. Questo polimero perde la sua integrità entro 1–2 mesi quando idrolizzato e subisce una perdita di massa entro 12-16 mesi. Per queste proprietà si preferisce scegliere il sistema PLA con distribuzione casuale delle forme chirali, poiché nell'ottica dei sistemi di “drug delivery” il polimero non deve restare in circolazione per un tempo eccessivamente prolungato.

3.2.2 PGA: acido poliglicolico

Il polimero composto da acido poliglicolico (PGA) è noto dal 1954 per essere resistente ed a basso costo di produzione per la formazione di fibre. Esso è il più semplice poliestere alifatico (figura 12), ha una temperatura di transizione vetrosa tra 35-40° e punto di fusione che va da 224-227°C. A causa della sua semplice struttura chimica e della sua stereoregolarità, si presenta con un diverso grado di cristallinità da completamente amorfo fino ad un massimo del 52% di cristallinità.

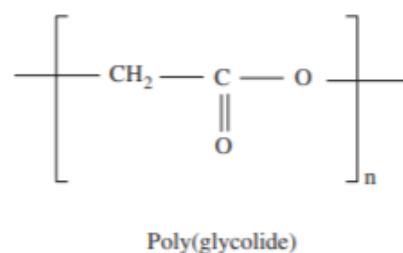
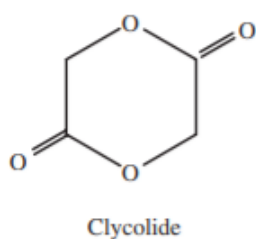


Figura 12. Struttura chimica del PGA

Oggi molti studi riportano l'utilizzo del sistema PGA nell'ottica di sistemi di rilascio del farmaco, poiché esso è facilmente degradabile, mostrando un più elevato grado di idrofilicità rispetto ai sistemi di PLA.

3.2.3 PLGA: acido polilattico-co-glicolico

L'ultimo polimero considerato in questo lavoro di tesi come vettore per farmaci è un copolimero composto dalle due specie precedenti. Il poliestere PLGA comprende quindi unità di acido polilattico (PLA) e di acido poliglicolico (PGA). Negli ultimi due decenni l'acido poli lattico-co-glicolico (figura 13) è stato tra i candidati polimerici più attraenti utilizzati per fabbricare dispositivi per la somministrazione di farmaci e applicazioni di ingegneria tissutale. Esso, infatti, è biocompatibile e biodegradabile, presenta una vasta gamma di tempi di erosione, ha proprietà meccaniche variabili a seconda delle quantità dei due tipi di monomeri e, soprattutto, è un polimero il cui utilizzo è approvato dalla FDA. In particolare, il copolimero PLGA è stato ampiamente studiato per lo sviluppo di dispositivi per la somministrazione controllata di farmaci con piccole molecole, ma anche proteine e altre macromolecole nell'uso commerciale e nella ricerca [16]. Per progettare un dispositivo di somministrazione dei farmaci meglio controllato, è essenziale comprendere le proprietà chimiche del PLGA.

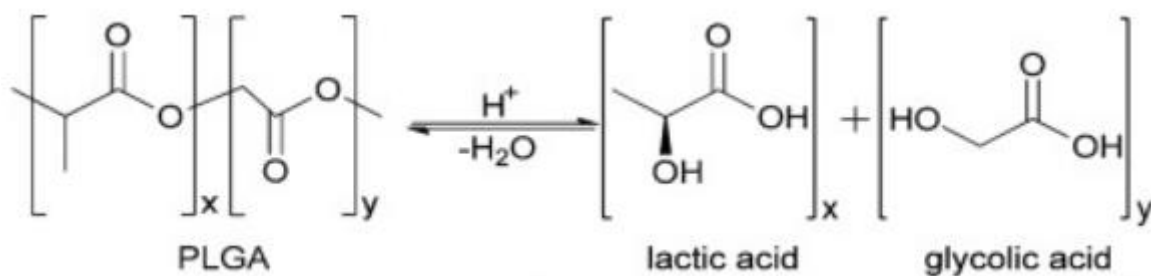


Figura 13 Struttura chimica del PLGA

Il rapporto monomero tra le unità di acido lattico e di acido glicolico (LA: GA) ha un effetto marcato sulle proprietà del polimero. Il periodo di riassorbimento *in vivo* può variare di molto modulando il grado di idrofobicità (aumentando le unità di acido lattico) o di idrofilicità (introducendo una maggior concentrazione di acido glicolico).[17]

Il copolimero PLGA è amorfo in natura con temperatura di transizione vetrosa compresa tra 45 e 55°C. Esso è solubile in un'ampia gamma di solventi come diclorometano, tetraidrofurano, acetato di etile, cloroformio, esafluoroisopropanolo, acetone e alcol benzilico. Il PLGA ha una cinetica di degradazione più veloce rispetto agli omopolimeri che lo compongono. Pertanto, l'uso di PLGA nelle applicazioni biomediche dipende dalla corretta scelta di un rapporto appropriato di LA e GA che dirigerebbe la cinetica di degradazione del sistema di rilascio del farmaco nel corpo.

Al rapporto LA:GA 50:50, i copolimeri PLGA hanno un alto tasso di degradazione che rallenta con l'aumentare della percentuale di LA da 50 a 100. La modifica delle proprietà di PLGA quando è esposto in un ambiente umido in condizioni fisiologiche può influenzare i tassi di rilascio e degradazione delle molecole di farmaci incorporate.[17] La cristallinità del polimero stesso dipende dalle unità monomeriche di cui è composto, per questo motivo durante il lavoro di tesi è stato considerato un copolimero con rapporto 75% di unità di acido lattico e 25% di unità di acido glicolico.

3.3 Processi di biodegradazione

I polimeri biodegradabili sono composti da unità assorbibili collegate fra loro. Durante la degradazione dei polimeri (che ricordiamo essere lunghe catene composte da monomeri), i singoli monomeri e le specie a più basso peso molecolare sono ottenute attraverso il processo di degradazione, ovvero rottura di alcuni dei legami covalenti lungo la catena. Successivamente questi composti sono assorbiti per mezzo delle vie metaboliche.

Poiché i processi di degradazione sono mediati da acqua o enzimi, possono essere distinti in:

- Enzimatici
- Idrolitici

La maggior parte dei polimeri sintetici sono degradati attraverso degradazione idrolitica, mentre i polimeri naturali sono degradati per mezzo della degradazione enzimatica. Il successo della degradazione idrolitica dipende dalla presenza di molecole di acqua, le quali operano l'effettiva idrolisi dei legami covalenti tra unità monomeriche agendo tramite meccanismi di sostituzione nucleofila. Per quanto concerne la degradazione enzimatica, essa è influenzata dalla diversa concentrazione di enzimi che può variare ampiamente da paziente a paziente e, in particolare, tra tessuti diversi nello stesso. Per questo motivo a livello biomedico si lavora molto più con i polimeri sintetici, poiché la loro degradazione tende ad essere più prevedibile di quella dei polimeri naturali, ed è possibile studiare nel dettaglio l'effetto che una soluzione acquosa e fisiologica può avere sul polimero stesso.

I principali fattori che determinano il processo di degradazione idrolitica sono:

- la struttura chimica della catena degradabile polimerica;
- carattere idrofilo/idrofobico;
- morfologia polimerica;
- peso molecolare;
- superficie;

- catalizzatori;
- additivi di polimeri riassorbibili.

La struttura chimica della catena degradabile del polimero è il parametro più importante. Generalmente, il gruppo estereo si degrada più velocemente del gruppo ammidico. Infatti, esso può facilmente essere idrolizzato secondo lo schema riportato in figura 14:

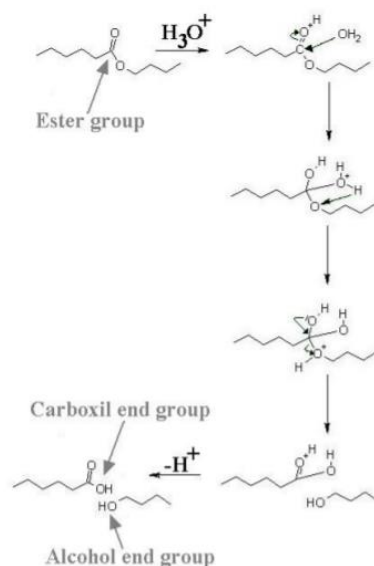


Figura 14 Schema del meccanismo idrolitico più importante

Il grado di degradazione è in genere stimato attraverso la misurazione dei seguenti parametri

- perdita di massa
- forza meccanica
- peso molecolare

la percentuale di perdita di peso WL% si può ottenere attraverso la seguente formula:

$$WL\% = \frac{100(W_o - W_r)}{W_o}$$

Dove W_o e W_r sono rispettivamente il peso iniziale e il peso residuo del polimero preso in considerazione[18].

Quella che caratterizzerà i polimeri di nostro interesse è proprio la degradazione idrolitica.

Il carattere idrofilo/idrofobico è un altro parametro importante nella degradazione dei polimeri. Come già riportato, il poli (acido glicolico) si degrada più velocemente del poli (acido lattico) più idrofobico.

Il tasso di degradazione è ulteriormente condizionato dalla morfologia dei polimeri, poiché sistemi semicristallini sono composti da zone cristalline immerse nella matrice amorfa. Generalmente, la degradazione tende a verificarsi nelle regioni amorse. Infatti, i domini cristallini sono meno suscettibili alla diffusione dell'acqua [19].

Nel nostro caso, i polimeri utilizzati per veicolare le molecole di chinino devono necessariamente essere amorfi, e questo garantisce la biodegradazione del vettore in tempi ragionevoli promuovendo un rilascio controllato del chinino. Dopo l'idrolisi dei legami covalenti tra monomeri, le unità di acido lattico e di acido glicolico ottenute vengono incorporate nel ciclo di Krebs e successivamente espulse sottoforma di anidride carbonica dai polmoni (figura 15). [20]

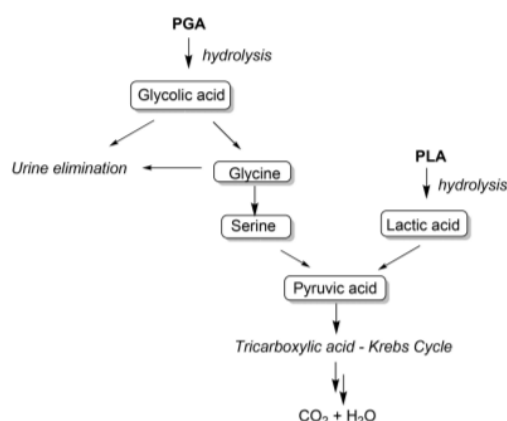


Figura 15. Vie di degradazione per il PLA e il PGA

3.4 I dispositivi a rilascio controllato del farmaco

L'utilizzo dei polimeri trova oggi un ampio campo di applicazione nel settore biomedico e farmaceutico, poiché strutture polimeriche sono alla base dello sviluppo di una particolare tecnologia volta alla somministrazione di farmaci. Tale tecnologia è nota come *drug delivery system*. Il successo di questo approccio nel settore sanitario è dovuto alla possibilità di studiare su larga scala molti processi biologici, meccanismi cellulari e molecole organiche. Per questa ragione, la medicina ha guardato alle nanotecnologie come ad una soluzione ideale per l'individuazione e il trattamento di molte malattie.

I farmaci somministrati per via orale devono generalmente passare attraverso la parete intestinale e la circolazione portale del fegato prima di raggiungere la circolazione sistemica. Gli enzimi intestinali ed epatici metabolizzano i farmaci processandoli e generando molecole generalmente con un carattere polare maggiore, in modo tale da aumentarne la solubilità. Questo processo può di fatto sottrarre un certo quantitativo di farmaco somministrato, portando ad una concentrazione plasmatica inadeguata dovuta ad una bassa biodisponibilità, la quale è necessaria per la risposta terapeutica desiderata [21]. In aggiunta a ciò, le molecole farmacologiche dovrebbero idealmente essere

rilasciate nel sito bersaglio in maniera controllata, in modo tale che si possa massimizzare l'efficacia terapeutica delle stesse e nello stesso tempo ridurre significativamente gli effetti indesiderati. [22]

L'utilizzo dei polimeri biodegradabili ha mostrato promettenti risultati nel migliorare la biodisponibilità di tali molecole terapeutiche. In primo luogo, quando tali molecole sono incorporate nei sistemi polimerici, esse possono essere protette da eventuali attacchi enzimatici, che potrebbero comportare la modifica o la demolizione della molecola prima che essa raggiunga il sito bersaglio.[23] In secondo luogo l'utilizzo di tali sistemi assicura che il rilascio del farmaco (delle molecole) avvenga nel sito specifico, senza che ci sia l'eventualità di un rilascio delle molecole in siti biologici diversi e non di interesse. [22] Ciò assicura la soluzione delle problematiche discusse in precedenza.

È possibile affermare tutto ciò dato che le nanoparticelle, che generalmente sono le più utilizzate e che andremo a studiare nella seguente trattazione, sono così dette "intelligenti", poiché in grado di rispondere a stimoli di tipo endogeno ed esogeno.[22]

Gli stimoli endogeni si possono tradurre nei seguenti:

- variazioni di pH
- livelli ormonali
- concentrazione degli enzimi

Mentre gli stimoli esogeni possono essere riassunti in:

- temperatura
- campo magnetico
- ultrasuoni
- luce ecc...

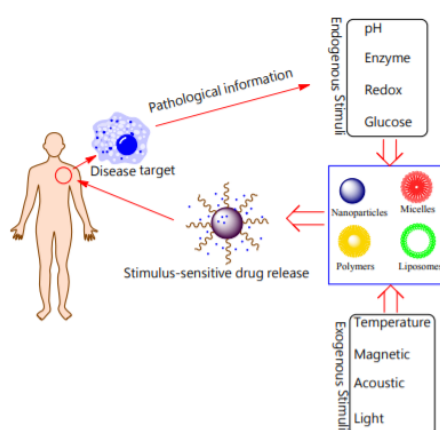


Figura 16. Illustrazione schematica di una risposta allo stimolo in un sistema a rilascio controllato del farmaco

Tutti questi fattori sono importanti poiché attraverso il controllo di questi e la modulazione delle proprietà fisico/chimiche del polimero è possibile ottenere risultati interessanti [22]. È stato anche

osservato che il farmaco veicolato con un polimero biodegradabile ha un impatto terapeutico superiore rispetto alla somministrazione del farmaco tal quale. Il miglioramento dell'efficacia terapeutica ed il rilascio controllato possono essere influenzati dalla dimensione delle particelle, dall'idrofobicità, dalla carica superficiale e dalla modifica superficiale del sistema coniugato. Le dimensioni, la forma e la struttura delle nanoparticelle controllano le loro proprietà fisico-chimiche delle stesse, svolgendo un ruolo molto importante durante il loro trasporto attraverso le membrane biologiche [21]. Negli ultimi anni materiali innovativi come i polimeri biodegradabili sono stati utilizzati per questo fine, portando a risultati davvero incoraggianti.

Abbiamo già parlato di possibili alternative alla medicina tradizionale, tuttavia un reale utilizzo delle molecole naturali può essere effettuato combinando le medesime con queste nuove tecnologie (figura 17). Associando le seguenti metodologie all'utilizzo di molecole naturali è possibile concentrarsi sulla “consegna efficiente” delle molecole con effetti antivirali, rendendo quindi la terapia più efficace rispetto ad un utilizzo meno specifico, ad esempio considerando il caso in cui le molecole vengano assunte per via orale sotto forma di compresse secondo altre formulazioni.

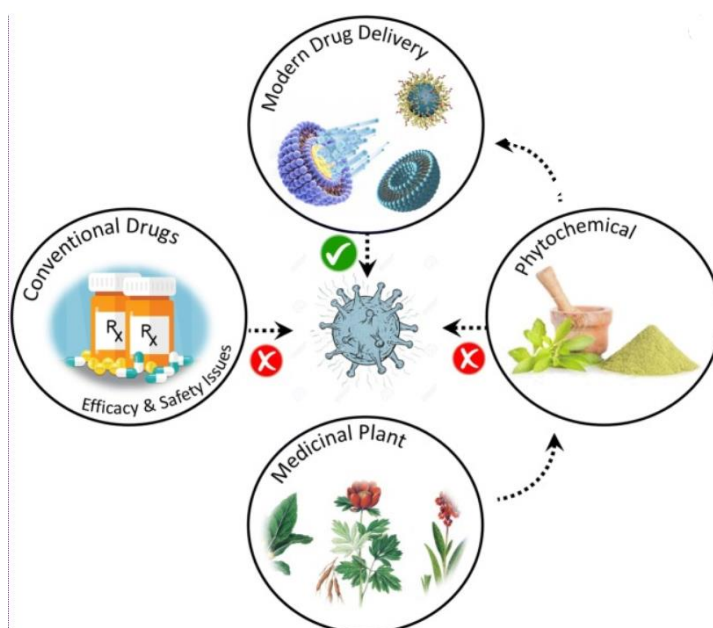


Figura 17. Possibile utilizzo dei medicinali fitochimici

I sistemi a rilascio del farmaco utilizzati per il rilascio di molecole antivirali possono essere di diverso tipo come ad esempio: idrogel, microsfele, nanoparticelle, fitosomi, transferosomi, e altri ancora [23]. I sistemi presi in esame per questo lavoro di tesi sono nanoparticelle (NP) dei polimeri sopra elencati. Esse differiscono dalle microparticelle per le dimensioni, poiché sono strutture solide e

sferiche con non più di 100 nm di dimensione [24]. Le NP sono molto efficaci perché in grado di incapsulare moltissimi tipi di molecole e piccole molecole chimiche e biochimiche [10].

Ci sono diversi processi di preparazione, e l'organizzazione della struttura può essere diversa. Il farmaco può essere sia intrappolato all'interno del nucleo di una "nanocapsula", oppure adsorbito sulla superficie di una nanosfera in relazione alla polarità della molecola considerata. La dispersione di polimeri preformati è la tecnica più usata per preparare le nanoparticelle biodegradabili di nostro interesse. Questi metodi comunemente includono due fasi importanti. Il primo passo consiste nel preparare un sistema emulsionato. Le nanoparticelle sono effettivamente formate attraverso il secondo step, il quale oltretutto conferisce il nome alla tecnica utilizzata. In generale viene utilizzato il processo di emulsione singola, la quale prevede una emulsione olio/acqua. In particolare, il polimero viene disciolto in un solvente organico come ad esempio l'etil acetato, diclorometano o cloroformio, a seconda della polarità richiesta. Il farmaco viene disciolto nella soluzione di polimero precedentemente preparata, e la miscela viene emulsionata. Successivamente il solvente organico viene fatto evaporare.

Questa è una procedura efficace nel momento in cui lavoriamo in laboratorio, tuttavia a livello industriale non è consigliata dato l'elevato costo [24].

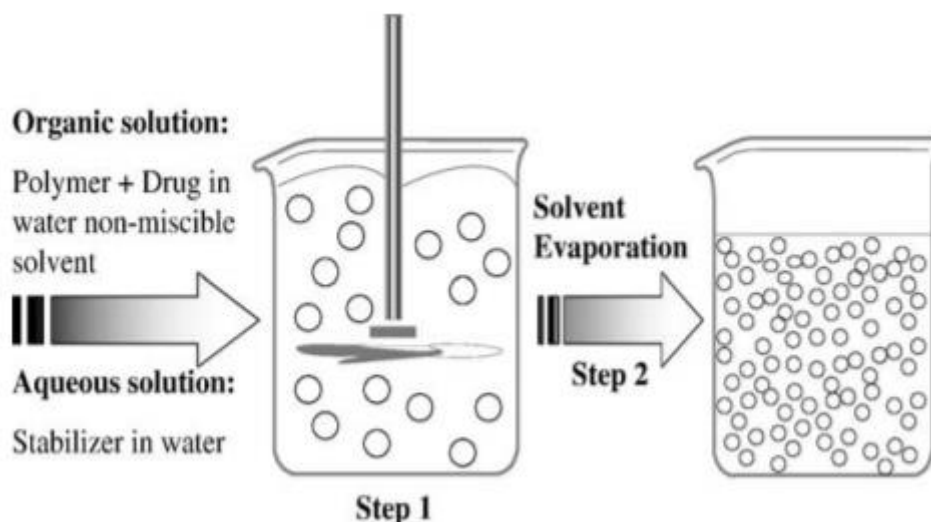


Figura 18. Rappresentazione schematica della tecnica emulsione-evaporazione

CAPITOLO 4. METODI

4.1 Meccanica classica

Il lavoro di tesi si basa sull'utilizzo di accurate e sofisticate metodiche di simulazione atomistica, volte a predire il comportamento dei sistemi prima ancora di procedere con la sintesi in laboratorio. Tale approccio è fondato sull'utilizzo di un validato modello *in silico*, che consente di avere accesso anche a fenomeni atomistici difficilmente investigabili con tecniche sperimentali. L'intero lavoro di tesi è quindi basato sull'utilizzo della chimica computazionale, ovvero la branca della chimica teorica che si occupa dello sviluppo di modelli matematici, basati su nozioni di meccanica classica e di meccanica quantistica, con lo scopo di calcolarne le grandezze fisiche caratteristiche e prevederne le proprietà chimiche.

La modellistica molecolare (molecular modeling) è un insieme di tecniche e metodi computazionali derivati dalla chimica computazionale, che ha lo scopo di ottenere, rappresentare e manipolare strutture, reazioni molecolari e tutte quelle proprietà strettamente legate alla tridimensionalità dei sistemi.

È possibile trattare il sistema molecolare in esame in due modi: considerando l'atomo come l'unità fondamentale utilizzando la meccanica molecolare (facendo uso delle leggi della meccanica classica o newtoniana), o analizzando ogni aspetto dell'atomo attraverso un modello elettronico esplicito tramite un approccio quanto-meccanico.

Il trattamento di sistemi di grandi dimensioni, ad esempio sistemi con migliaia o centinaia di migliaia di atomi, non può essere effettuato con tutte le tecniche della modellistica molecolare perché sarebbe troppo dispendioso dal punto di vista del tempo e delle risorse computazionali. In questi casi, riferendoci esplicitamente a sistemi polimerici in ambiente cellulare, si utilizza la meccanica molecolare, con cui non si considerano le proprietà elettroniche ma i soli aspetti strutturali. Tale approccio è possibile, poiché gli atomi esplicitamente coinvolti in processi biologici (come idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno, fosforo, zolfo, e metalli come sodio o magnesio) presentano ben pochi elettroni, e non vi sono esplicite problematiche di tipo elettronico da considerare. A tale scopo si fa uso dell'approssimazione di Born-Oppenheimer che descrive il moto degli elettroni separato da quello dei nuclei rispetto all'equazione di Schrödinger. Quindi la meccanica molecolare tratta i soli nuclei e lascia gli elettroni impliciti.

La meccanica molecolare trova la propria estrinsecazione nell'utilizzo di *Force Field* (o campo di forza), ossia un potenziale che descrive le caratteristiche energetiche che la molecola genera attorno a sé in un determinato spazio di simulazione: in questo modo è possibile valutare le proprietà

dinamiche della molecola in esame rispetto ad un particolare ambiente, in una certa conformazione, o rispetto ad un'altra molecola.

La meccanica molecolare considera gli atomi come delle masse legate tra loro da forze armoniche o elastiche. Tali forze possono essere descritte da funzioni di energia potenziale legate a caratteristiche strutturali quali lunghezze di legame (E_s), angoli di legame (E_b), angoli diedri (E_w) e interazioni di non legame (E_{nb}). L'energia di una molecola è funzione della sua struttura e può essere approssimata ad una somma di contributi energetici:

$$E = E_s + E_b + E_w + E_{nb}$$

E è l'energia sterica, essa rappresenta la differenza di energia tra la molecola reale e una molecola ipotetica dove tutti i valori strutturali come angoli e lunghezze di legame sono esattamente uguali al loro valore "ideale" o "naturale". I primi tre termini riguardano l'energia correlata ai legami, l'ultimo termine invece riguarda l'energia di non legame.

1. Potenziale stretching E_s

E_s è l'energia di stretching, ovvero l'energia relativa alla lunghezza di legame. Viene utilizzata l'equazione del potenziale armonico, cioè la legge di Hooke.

$$E_s = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} K_s (r_i - r_{i0})^2$$

N è il numero totale di legami nella molecola, K_s sono le costanti di forza di stretching, r_i sono le lunghezze del legame reale, r_{i0} sono le lunghezze dei legami naturali.

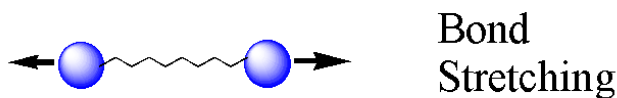


Figura 19. Movimento di stretching atomico.

Se si vuole rendere più accurata la descrizione di questo termine energetico va presa in considerazione anche la funzione di Morse, questo termine di anarmonicità è dovuto al fatto che se la molla viene estesa oltre un certo limite non risponde più in maniera armonica. Si aggiunge un termine cubico a quello quadratico della legge di Hooke.

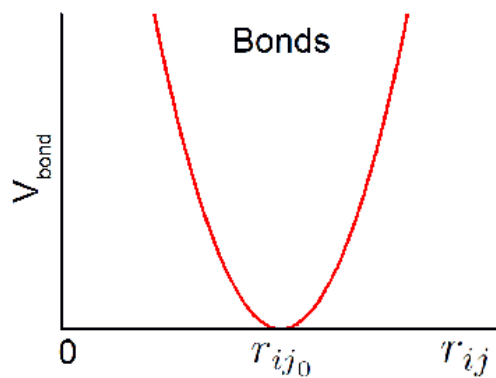


Figura 20. Andamento del potenziale in funzione del movimento di stretching secondo il potenziale armonico.

$$E_s = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} K_s (r_i - r_{i0})^2 + K' (r_i - r_{i0})^3$$

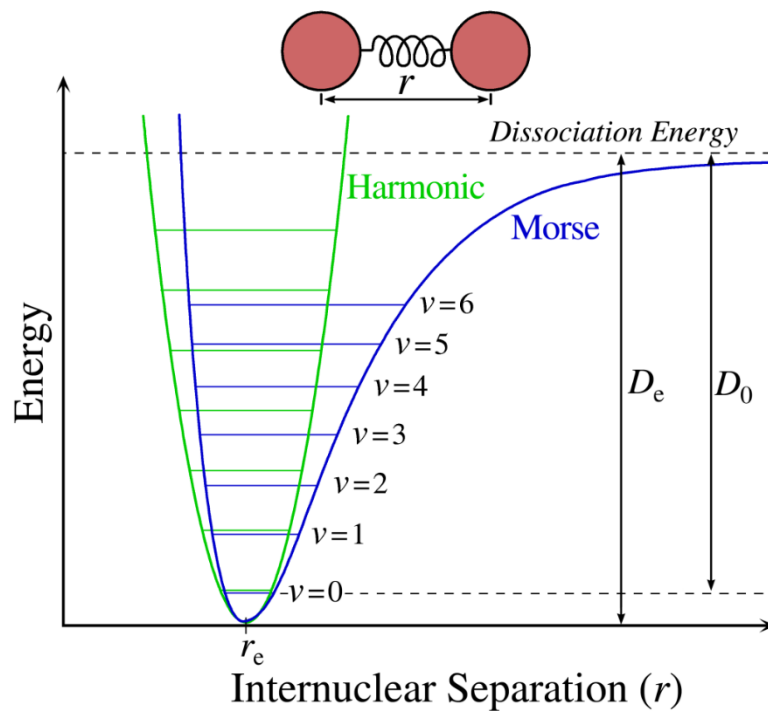


Figura 21. Andamento dell'energia in funzione del movimento di stretching secondo il potenziale armonico (in verde) e di Morse (in blu)

2. Potenziale di bending E_b

È l'energia di bending. Rappresenta l'energia potenziale dell'angolo di legame.

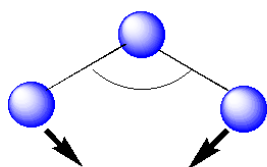
$$E_b = \sum_{i=1}^M \frac{1}{2} K_b (\theta_i - \theta_{i0})^2$$

M è il numero totale di angoli di legame presenti, K_b sono le costanti di forza di bending, θ_i sono gli angoli di legame reali, θ_{i0} sono gli angoli di legame naturali.

I termini E_s e E_b sono legati tra loro e in genere una deviazione dell'uno comporta anche una deviazione dell'altro termine per cui a volte si considera un termine aggiuntivo “cross-term”.

$$E_{sb} = \sum_{i < j} \frac{1}{2} K_{ij}^{sb} (r_i - r_{i0} + r_j - r_{j0}) (\theta_{ij} - \theta_{ij0})$$

Un altro termine di correzione è la distinzione del bending *in-plane* dal bending *out-of-plane* per gli atomi ibridizzati sp^2 .



Valence angle bending

Figura 22. Movimento di bending atomico

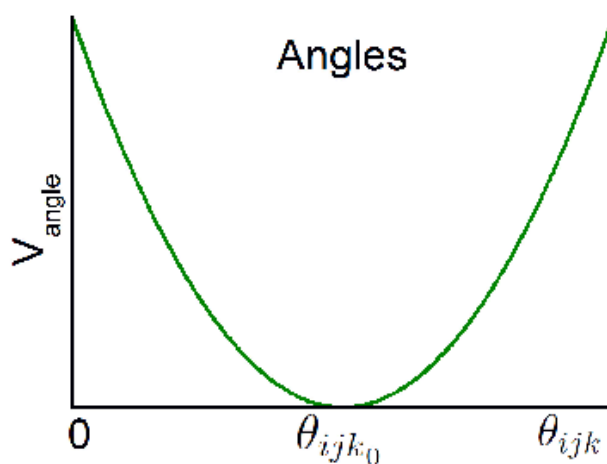


Figura 23. Andamento del potenziale in funzione del movimento di bending.

3. Potenziale torsionale E_w

È l'energia dovuta alla torsione dei diedri. L'angolo diedro è definito per una serie di atomi A-B-C-D legati covalentemente, come l'angolo misurato dall'asse B-C tra il piano A-B-C e il piano B-C-D. Per definire quest'energia si utilizzano le trasformate di Fourier.

$$E_w = \sum_{\text{diedri}} \left(\frac{1}{2} V_1 (1 + \cos \omega) + \frac{1}{2} V_2 (1 - \cos 2\omega) + \frac{1}{2} V_3 (1 + \cos 3\omega) \dots \right)$$

Un'interpretazione fisica di queste costanti è: V_1 riguarda interazioni dipolo-dipolo, V_2 iperconiugazione degli alcani o coniugazione in sistemi insaturi e V_3 termine sterico

I termini V_1 e V_2 sono più consistenti per sistemi contenenti eteroatomi.

Generalmente richiede meno energia distorcere un angolo diedro che piegare un angolo di legame. Perciò una distorsione molecolare mostrerà una maggiore porzione di energia torsionale rispetto ai termini E_s e E_b .

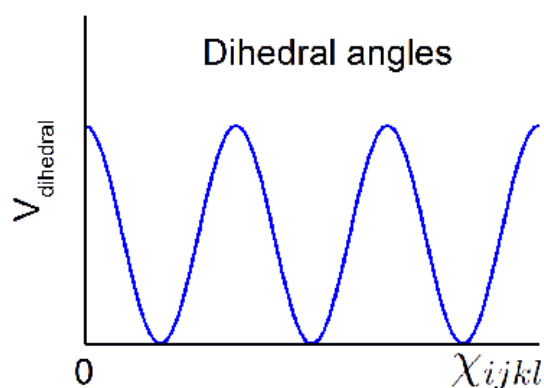


Figura 24: Andamento del potenziale in funzione della torsione dell'angolo diedro.

Quando si hanno sistemi ibridizzati sp^2 le cose si complicano perché il bending *out-of-plane* può distruggere la simmetria del sistema, per cui tali interazioni devono essere trattate a parte.

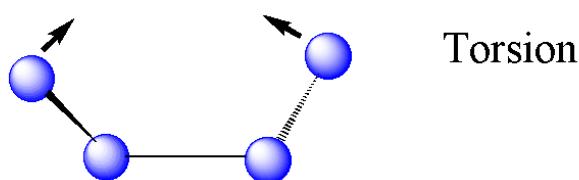


Figura 25: Torsione di un angolo diedro.

4. Potenziale di non legame E_{nb}

È un termine energetico che comprende tutte le energie di non legame. Può essere suddiviso in due contributi, l'energia di Van der Waals e l'energia elettrostatica.

Il termine di energia potenziale di Van der Waals è legato alle interazioni di non legame tra coppie di atomi ed è funzione della distanza tra i nuclei. Le due funzioni di energia potenziale più usate sono: il potenziale di Lennard-Jones e quello di Buckingham. Il potenziale di Lennard-Jones richiede un calcolo meno oneroso rispetto al potenziale di Buckingham. Considera quelle che sono le interazioni a corto raggio.

$$E_{vdw} = \varepsilon \left[\left(\frac{r_0}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{r_0}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

ε è la costante dielettrica del mezzo, il termine elevato alla sesta è la parte attrattiva dell'interazione, il termine elevato alla dodicesima è la parte repulsiva dell'interazione.

Il termine elettrostatico viene descritto tramite il potenziale di Coulomb.

$$E_{ele} = \frac{kQ_iQ_j}{4\pi\epsilon r_{ij}}$$

Q_i e Q_j sono le cariche parziali sugli atomi i e j .

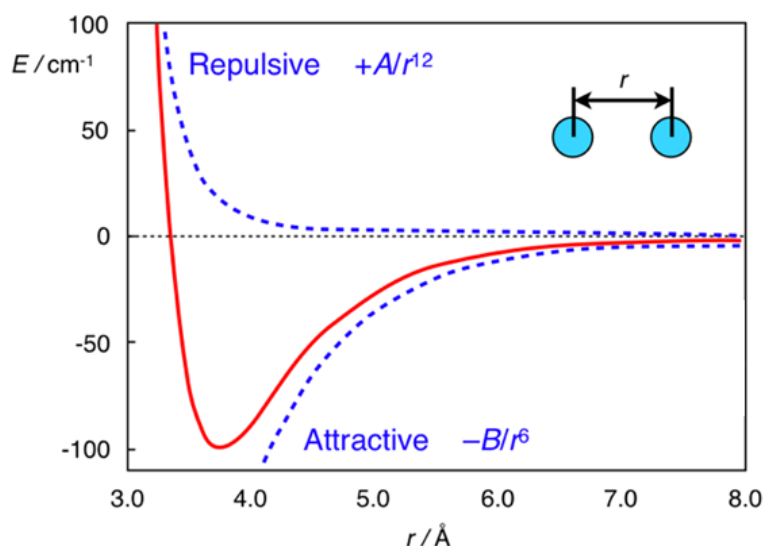


Figura 26: La funzione del potenziale di Lennard-Jones in rosso.

Tutti i termini energetici vengono considerati nel loro insieme e formano il cosiddetto Force Field. Il Force Field esprime l'energia potenziale di un sistema di particelle (solitamente, ma non necessariamente, atomi). Le funzioni del Force Field ed i set di parametri sono derivati sia da dati sperimentali che da calcoli quantomeccanici *ab initio* di livello elevato. Per cui ogni atomo viene

descritto utilizzando una serie di parametri che riguardano: l'ibridazione, la carica formale sull'atomo, gli atomi vicini con cui è legato. In questa maniera si definisce l'*atomtype*, il quale rappresenta l'ambiente chimico di un atomo.

Il Force Field (FF) da noi utilizzato per le simulazioni di dinamica molecolare è chiamato AMBER.

AMBER FF

Nella prima metà del 1980 cominciò ad essere sviluppata una nuova generazione di FF. Il primo di questi non presentava tutti gli idrogeni espliciti. Data l'importanza del legame idrogeno però, era necessario trovare un compromesso tra una buona rappresentazione ed un sistema non troppo oneroso dal punto di vista computazionale, per cui si pensò di tenere gli idrogeni polari espliciti e considerare gli idrogeni legati al carbonio come un'unica entità. Un campo di forza di questo tipo molto utilizzato fu sviluppato dal gruppo di Kollman nel 1984 [25] e implementato nel pacchetto di dinamica molecolare denominato AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) [26]. Le cariche venivano derivate con calcoli quantomeccanici attraverso il fitting delle cariche atomiche parziali con il potenziale quanto-elettrostatico, queste sono generalmente chiamate cariche ESP (potenziale elettrostatico). Il termine di Van der Waals fu adattato con il fit dei dati del cristallo dell'amide del gruppo di Lifson [27] e dalle simulazioni allo stato liquido cominciate da Jorgensen [28]. Le costanti di forza, le lunghezze di legame e gli angoli idealizzati vennero presi dalla struttura del cristallo e adattati per abbinarli alle normali modalità di frequenza dei frammenti peptidici. Finalmente le costanti della forza di tensione vennero aggiustate per abbinarle alle barriere torsionali estratte dagli esperimenti o da calcoli quanto-chimici. Questo approccio presentava alcuni problemi, per cui grazie all'incremento delle risorse di calcolo, molti gruppi decisero di sviluppare FF che tenevano conto di ogni atomo separatamente gli uni dagli altri.

Un' estensione del campo di forza del 1984 con un modello *all-atom* fu pubblicata nel 1986, come una collaborazione tra i gruppi di Kollman e Case. Il continuativo incremento della velocità dei computer portò il gruppo di Kollman a decidere all'inizio del 1990 che lo sviluppo di un nuovo tipo di Force Field era garantito; quello che è conosciuto col nome di "Cornell et al" o ff94 [29].

Oltre ai miglioramenti nei parametri, si decise di descrivere in maniera esplicita l'algoritmo con cui sono stati derivati i parametri, così da permettere di estendere il campo di forza ad altre molecole, anche molto diverse dalle strutture proteiche finora direttamente prese in considerazione. Si volevano realizzare potenziali utilizzabili per simulazioni in fase condensata ed accordare i parametri con le cariche atomiche che erano state derivate tramite calcoli quanto-meccanici.

Nelle parametrizzazioni successive, come l'ff96 [30] e l'ff99 [31] si cercò di accordare i dati sperimentali ottenuti tramite dicroismo circolare e NMR con i dati trovati tramite calcoli quantomeccanici [32].

Diversi gruppi notarono che ff99 (e ff94) non forniva un buon bilancio dell'energia tra le eliche e le regioni estese del peptide e dei *backbone* proteici. Un altro problema è dato dal fatto che molte varianti dell'ff94 davano un inadeguato trattamento dei parametri del *backbone* della glicina. Ff99sb fu uno degli ultimi che cercò di migliorare questo comportamento, e fu sviluppato dal gruppo Simmerling. Presenta un'attenta ri-parametrizzazione dei termini torsionali del *backbone* rispetto all'ff99 [33]. L'AMBER ha ora implementato un ampio range di parametri, infatti ff10 comprende i parametri dell'ff99sb, del BSC0 DNA, degli ioni di Cheatham et al. e le modifiche dell'RNA. C'è anche un nuovo force-field, ff12sb, fornito con AMBER v12 con un supporto accresciuto per i potenziali polarizzabili così come l'FF CHARMM attraverso un programma ausiliario chiamato Chamber [34].

4.2 Analisi conformazionale e minimizzazione dell'energia

L'analisi conformazionale è lo studio delle conformazioni di una molecola e delle sue proprietà e comportamento, come per esempio la reattività chimica. La maggior parte delle molecole organiche, ed in particolare le strutture polimeriche, può assumere più di una conformazione e le varie conformazioni possono essere diversamente popolate. L'interconversione tra le conformazioni è dovuta alle vibrazioni interne della molecola che provengono da una varietà di moti interni come lo stiramento di legame, il piegamento degli angoli di legame e le rotazioni attorno ai legami semplici, tutti termini energetici opportunamente considerati nei Force Field, come già precedentemente considerato.

La funzione di energia potenziale di un sistema molecolare può essere descritta come una superficie complessa che presenta un elevato numero di dimensioni. Tale superficie presenta un unico punto di minimo assoluto, o globale, e più minimi locali; in questi punti le derivate prime della funzione di energia potenziale rispetto alle coordinate sono pari a zero, e tutte le derivate seconde sono positive. Nella superficie si trovano anche i punti a sella, che sono punti di transizione e i punti di massimo, corrispondenti a conformazioni molecolari energeticamente improbabili, poiché non stabili.

La minimizzazione dell'energia è un metodo che viene utilizzato per calcolare lo stato di equilibrio di una molecola o di un sistema supramolecolare, cioè la conformazione assunta al minimo energetico, che può essere un minimo locale o globale. Partendo da una geometria molecolare di non-equilibrio si impiegano delle procedure matematiche che permettono di muoversi lungo la Superficie

di Energia Potenziale (PES) e trovare un minimo conformazionale del sistema. Gli algoritmi di minimizzazione normalmente usati in meccanica molecolare sfruttano la conoscenza delle derivate della espressione dell'energia in funzione delle coordinate $E(R)$ per decidere in che direzione muoversi sulla superficie di potenziale (cioè in che modo far variare le coordinate). Le due principali caratteristiche di un algoritmo di minimizzazione sono l'efficienza (trovare il minimo nel minor tempo di calcolo possibile) e la robustezza (funzionare bene qualunque sia la conformazione di partenza). Gli algoritmi matematici più utilizzati a questo scopo sono: Steepest Descent e Conjugate Gradient, entrambi metodi detti *downhill*.

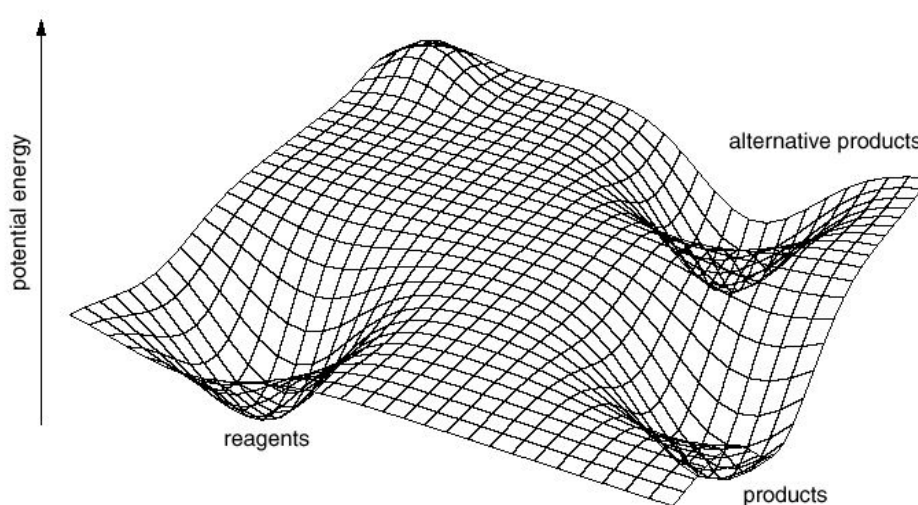


Figura 27: Superficie di energia potenziale (PES)

Lo Steepest Descent non è un algoritmo molto efficiente, ma è robusto e facile da implementare. La ricerca del minimo avviene lungo una direzione delle coordinate (*line search*), la quale è opposta al gradiente. Una volta che viene trovato il minimo lungo questa direzione ne viene creata una nuova opposta al gradiente in quel punto. La procedura viene ripetuta più volte fino così che la derivata prima tenda allo zero, e in questo caso si dice che la minimizzazione sta convergendo. Supponendo che l'energia potenziale possa essere descritta da una superficie bidimensionale, le direzioni lungo cui la minimizzazione procede sono sempre perpendicolari, la precedentemente con la successiva, per cui questo approccio assume un carattere oscillante, e diviene sempre più inefficiente man mano che raggiunge il minimo. La minimizzazione procede velocemente se la geometria è lontana dal minimo mentre procede lentamente se la conformazione è vicina all'optimum.

Il Conjugate Gradient è più lento dello Steepest Descent nelle prime fasi della minimizzazione, ma diviene più efficiente vicino al minimo energetico. Vengono prodotte una serie di *line search* con

direzioni mutuamente coniugate. Questo sistema comporta che il gradiente successivo sia ortogonale a tutti i precedenti gradienti, quindi la nuova direzione è coniugata alle precedenti.

Esistono tre procedure fondamentali per compiere un'analisi conformazionale:

1- Ricerca sistematica (grid search o systematic search)

2- Ricerca statistica (metodo Metropolis Monte Carlo)

3- Dinamica molecolare

La ricerca conformazionale può generare un gran numero di dati che devono essere analizzati. Molte delle conformazioni generate sono molto simili, è quindi preferibile essere in grado di selezionare dal set di dati un set di conformazioni rappresentative più piccolo. Questo può essere fatto con l'analisi di cluster che raggruppa insieme oggetti simili da cui estrarre i più rappresentativi.

La strategia della ricerca sistematica consiste nel far variare ad intervalli fissi per tutti i 360° tutti gli angoli diedri della molecola (o un loro sottoinsieme). Vanno considerate tutte le possibili combinazioni tra questi angoli. Ogni conformazione così generata è sottoposta a minimizzazione dell'energia.

Il metodo Monte Carlo è un metodo di ricerca stocastico in cui la conformazione di partenza è modificata variando gli angoli diedri intorno a legami semplici di valori casuali. Se la conformazione così prodotta non è stata già trovata in precedenza, è memorizzata. A questo punto si sceglie una nuova conformazione di partenza, e si ripete il procedimento. Essendo casuale, un processo del genere non ha una fine ben precisa. Si può decidere di finire la ricerca quando dopo un certo numero di stadi non si trovano più nuove conformazioni, ma non c'è mai la certezza che non ci siano altre conformazioni a più bassa energia. In ogni caso, per raggiungere una buona probabilità di aver trovato tutte le conformazioni occorre ottenere ciascuna di esse varie volte, e questo ovviamente limita l'efficienza del metodo.

4.3 Dinamica molecolare

Attraverso la dinamica molecolare MD è possibile ottenere un elevato numero di conformazioni che la molecola può assumere. La dinamica molecolare è un altro metodo molto efficiente per esplorare lo spazio conformazionale di una molecola. La dinamica molecolare simula il comportamento reale della molecola: la molecola tende a sistemarsi in conformazioni a bassa energia, ma avendo un certo moto termico è in grado di superare la barriera di energia che separa una conformazione dall'altra. La procedura normalmente utilizzata è di effettuare la simulazione di dinamica molecolare,

memorizzando ad intervalli regolari la conformazione assunta dalla molecola. Queste conformazioni sono poi usate come punti di partenza per la successiva minimizzazione dell'energia. L'insieme delle coordinate atomiche molecolari nella successione temporale della simulazione rappresentano l'evoluzione del moto atomico nel tempo, ovvero la traiettoria della simulazione.

Per effettuare, condurre e analizzare le traiettorie di dinamica molecolare si possono utilizzare vari tipi di algoritmi, il GROMACS è un pacchetto di software contenente vari algoritmi che consentono di effettuare la dinamica molecolare.

4.3.1 Basi teoriche della dinamica molecolare: L'equazione del moto di Newton

La dinamica molecolare (MD) risolve la semplice equazione del moto di Newton, per cui si parla di simulazioni di dinamica molecolare classica.

$$F_i(t) = m_i a_i(t)$$

$$F_i = -\left(\frac{dE}{dr_i}\right)$$

$$-\left(\frac{dE}{dr_i}\right) = m_i \left(\frac{d^2 r_i}{dt^2}\right)$$

L'equazione classica del moto è deterministica, quindi conoscendo le coordinate e le velocità al tempo t_0 è possibile calcolare le due variabili al tempo t_1 , per cui è possibile seguire la traiettoria. Per seguire una traiettoria e quindi conoscere le coordinate al trascorrere tempo si possono utilizzare vari tipi di algoritmo come: Verlet, Leap-Frog, Velocity Verlet e Beeman.

4.3.2 Ensembles

Risolvendo l'equazione del moto si generano una serie di punti nello spazio multidimensionale in funzione del tempo. Con un sistema di N particelle si ha uno spazio di $6N$ dimensioni. Un unico punto nello spazio multidimensionale descrive lo stato del sistema. Un ensemble è una collezione di punti nello spazio che soddisfa le condizioni di un particolare stato termodinamico. Sono tre gli ensemble comunemente usati nella MD, sono descritti da tre variabili termodinamiche che sono mantenute costanti.

- 1- The constant-NVE or microcanonical ensemble (sono mantenuti costanti volume e energia totale);
- 2- The constant-NVT or canonical ensemble (sono mantenuti costanti volume e temperatura);

3- The constant-NPT or isothermal-isobaric ensemble (sono mantenute costanti pressione e temperatura).

4.3.3 Condizioni periodiche di contorno

Le condizioni periodiche al contorno sono una serie di condizioni al contorno usate per simulare grandi sistemi.

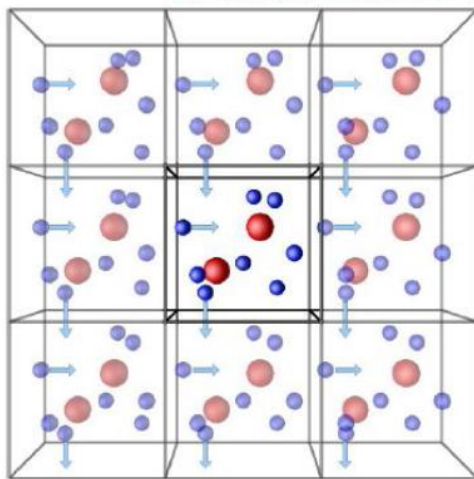


Figura 28: Rappresentazione delle condizioni periodiche al contorno (PBC)

Una cella unitaria o un box di simulazione sono delle unità di spazio che racchiudono il sistema da analizzare, il box è periodico nel senso che viene replicato uguale a sé stesso lungo le tre direzioni x, y e z; tutto ciò che esce dal box rientra dalla faccia opposta alla stessa velocità. Il box deve essere grande abbastanza da impedire la creazione di artefatti, cioè il sistema durante la simulazione non dovrà superare i margini del box.

4.3.4 Coupling della temperatura e della pressione

Il GROMACS usa tre principali algoritmi per il coupling della pressione che sono Berendsen, V-rescale e Nosè-Hoover.

1- Berendsen: viene utilizzato per la fase di equilibrizzazione, non genera il corretto ensemble termodinamico per questo viene definito weak-coupling (coupling debole della temperatura) [35].

2- V-rescale: è una modificazione del Berendsen che assicura una corretta distribuzione dell'energia cinetica. I vantaggi sono gli stessi riscontrati nell' utilizzo del Berendsen, ed in più produce un corretto ensemble canonico [36].

3- Nosè-Hoover: è utilizzato per la fase produttiva della simulazione, poiché garantisce un corretto ensemble termodinamico. [37,38].

Per quanto riguarda il controllo della pressione, gli algoritmi utilizzati dal GROMACS sono due:

1- Berendsen: anche in questo caso viene utilizzato per la fase di equilibrizzazione [35].

2- Parrinello-Rahman: viene utilizzato in associazione col Nosè-Hoover e permette un corretto ensemble in NPT. Può essere gestito in maniera isotropica, semi-isotropica e anisotropica. Nella simulazione isotropica, lungo gli assi x, y e z, il controllo della pressione è gestito omogeneamente, le dimensioni del box vengono scalate omogeneamente lungo le tre direzioni (come nel caso di polimeri in soluzione). Nel semi-isotropico la pressione viene gestita in maniera indipendente nel piano x-y rispetto all'asse z (ad es. per la simulazione di proteine in membrana o di sistemi lipidici anisotropi come le membrane cellulari) [39,40].

4.3.5 Modelli di solvente

Simulare la corretta solvatazione dell'ambiente per il sistema molecolare significa cercare il miglior modello esplicito da usare per l'acqua.

Esistono diversi modelli dell'acqua, in cui variano i parametri geometrici.

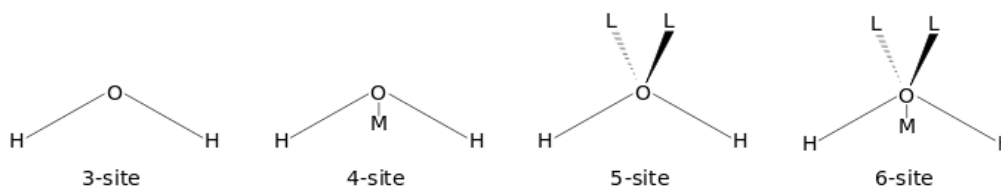


Figura 29: Modelli rappresentativi dell'acqua.

Il modello TIP3P rappresenta un buon compromesso tra accuratezza e costo computazionale. Il modello presenta tre siti di interazione, corrispondenti ai tre atomi della molecola d'acqua. A ogni atomo è associata una carica puntuale, e l'atomo di ossigeno ha inoltre assegnati i parametri di Lennard-Jones.

I modelli a 4, 5 e 6 siti considerano esplicitamente gli elettroni di non legame dell'ossigeno di una molecola di acqua, sono molto accurati ma richiedono elevati costi computazionali, per cui si utilizzano solo nel caso di piccoli sistemi biochimici e chimici.

4.3.6 Lo scoring

Al termine delle simulazioni di dinamica molecolare, vengono valutate le energie di tutti i complessi polimerici trovati al termine della fase di produzione, in modo da individuare il complesso con la più bassa energia [41]. Così, il punto fondamentale di un metodo computazionale efficiente è avere uno schema di punteggio in grado di valutare un gran numero di soluzioni e discriminare i complessi che si legano in maniera corretta rispetto a tutti quelli generati [42]. Un criterio basato esclusivamente sulla complementarità geometrica non permette di discriminare bene tra complessi [43]. Le interazioni tra strutture poliedriche, molecole di solvente e molecole di farmaci avvengono tramite legami idrogeno, interazioni di Van der Waals, ponti salini e contatti elettrostatici.

Le variazioni di entropia e di entalpia dipendono da un lato dalle variazioni che si verificano a livello del solvente, e dall'altro dal soluto. Per quanto riguarda il solvente, la desolvatazione dovuta alla formazione del complesso può riguardare le parti polari e cariche sulle superfici dei sistemi polimerici, oppure può avere lo stesso effetto sulle parti non polari. Il contributo per le parti cariche e polari è sfavorevole dal punto di vista entalpico perché le interazioni che il polimero forma con le molecole di solvente sono generalmente più forti rispetto a quelle che si formeranno tra polimeri. Le parti apolari daranno un contributo favorevole perché aumenta l'entropia grazie alle molecole d'acqua rilasciate e si formeranno interazioni più favorevoli nel complesso, dall'altro lato ci sarà anche un contributo sfavorevole per la formazione di una cavità nel solvente che contenga il soluto.

Per quanto riguarda il soluto, si ha una variazione dell'entropia dovuta alla formazione del complesso, da un lato si ha perdita di entropia rotazionale e traslazionale, ed anche la perdita di entropia conformazionale dovuta alla restrizione degli angoli diedri, quindi il contributo è sfavorevole. Il termine entalpico è invece legato all'energia interna (conformazionale) del complesso.

4.3.7 Settaggio del sistema

Durante il periodo di tesi sono stati considerati tre differenti sistemi polimerici nanoparticellari. Il primo composto da PLA amorfo di 16968 atomi, corrispondenti a 64 monomeri di acido lattico, il secondo composto da altre 64 unità di acido glicolico, a generare un sistema amorfo di PGA, mentre il terzo è composto dal copolimero derivato dall'utilizzo dei due monomeri descritti sopra. Tale copolimero (PLGA) presenta il 75 % di unità monomeriche di PLA amorfo ed il restante 25% di PLG. Tali sistemi sono stati posti in un box di simulazione di 16 nm³ ed ognuno di essi è stato opportunamente solvatato con 130873 molecole di acqua e 740 ioni salini (370 ioni Na⁺ e 370 ioni Cl⁻ espliciti). Questo sistema è stato considerato per sei differenti simulazioni di dinamica molecolare.

Nella prime simulazioni e sono stati considerati separatamente i tre polimeri in assenza farmaci, ed è stato valutato il comportamento delle nanoparticelle in relazione al contatto con i fluidi biologici. Nelle successive tre simulazioni sono state introdotte 34 molecole di chinino (PM= 324,42 g/mol; log P= 3,44). La scelta del numero specifico di molecole di farmaco da aggiungere è relativa alla volontà di ricreare specifiche condizioni sperimentali in cui si aggiungono 5 mg/ml di farmaco. Il LogP, anche detto coefficiente di ripartizione (o coefficiente di distribuzione) rappresenta il rapporto tra le concentrazioni di un composto all'interno delle due fasi di una miscela di due liquidi immiscibili all'equilibrio. L'importanza di questo coefficiente consiste nell'indicazione del livello di idrofilicità o idrofobicità di una sostanza chimica, e a tal proposito si è convenuto di utilizzare come miscela quella formata dall'ottanolo (composto idrofobo) e dall'acqua (che è ovviamente idrofila) indicando il coefficiente di ripartizione come P_{OW} . In termini pratici questo coefficiente viene comunemente indicato su scala logaritmica in base 10, ovvero come $\log P_{OW}$. Si considera quindi il seguente rapporto:

$$P_{OW} = \frac{[Mol]_{\text{ottanolo}}}{[Mol]_{\text{acqua}}}$$

Dove $[Mol]_{\text{ottanolo}}$ rappresenta la concentrazione della molecola nella fase idrofoba, mentre $[Mol]_{\text{acqua}}$ rappresenta la quantità di molecola nella fase acquosa.

È stata determinata l'efficienza di incapsulamento nelle simulazioni contando il numero di molecole di farmaco intrappolate dal polimero in relazione al numero totale di molecole di farmaco nel sistema. Le concentrazioni di chinino in relazione alla quantità di polimero sono state simulate usando farmaci comparativi, polimeri e i rapporti molari in acqua. Il chinino è stato scelto sulla base della sua marcata idrofobicità, come testimonia il valore di logP estremamente positivo, e questa rappresenta certamente una caratteristica necessaria affinché possa essere felicemente veicolati da nanoparticelle come quelle prese in esame nel lavoro di tesi. Le catene di polimero sono state modellate utilizzando Macromodel Maestro v 11.1, ovvero una suite del pacchetto Schroedinger che permette, tramite la funzione Building Polymer, di generare strutture polimeriche più o meno complesse, considerando con molta precisione il grado di cristallinità desiderato e quindi la tatticità del polimero stesso. Sono state introdotte unità polimeriche di lunghezza variabile, allo scopo di simulare gli eventi di polidispersività normalmente osservati in ambito sperimentale e durante i processi di lavorazione. Tutti i sistemi sono stati sottoposti a simulazioni di dinamica molecolare di 50 ns, e le traiettorie atomistiche generate sono state analizzate per determinare alcune delle proprietà dei sistemi, come

l'energia, la densità del sistema e il raggio di rotazione delle nanoparticelle (sia in presenza che in assenza di farmaci).

CAPITOLO 5. RISULTATI

I sistemi PLA, PGA e PLGA sono stati indagati *in silico* in assenza ed in presenza di molecole di chinino, allo scopo di valutare l'interazione dei sistemi con l'ambiente e l'effetto del farmaco sul vettore polimerico ed il grado di rilascio. Lo scopo è quello di utilizzare le metodiche computazionali per il design razionale e la progettazione di sistemi utili al trattamento di patologie relative al contagio da covid19.

5.1 Sistemi polimerici senza farmaco

I vettori polimerici sono stati sottoposti a simulazioni di dinamica molecolare di 50 ns ciascuna, in solvente esplicito, ovvero considerando esplicitamente la presenza e l'effetto delle molecole di acqua e di ioni Na^+ e Cl^- . Gli ioni sono stati aggiunti per raggiungere una concentrazione molare di 0.15 M di NaCl, allo scopo di ricreare un ambiente di simulazione il più fedele possibile alle condizioni fisiologiche. Al fine di valutare l'effettiva stabilità dei sistemi tramite l'osservazione delle catene polimeriche, sono state condotte analisi di deviazione quadratica media (root mean square deviation, rmsd) (figura 30). Tale analisi è necessaria per valutare se il tempo di simulazione scelto è sufficiente ad ottenere sistemi in equilibrio dinamico, a verificare l'effettiva stabilità dinamica dei modelli, ed anche a capire i motivi per i quali eventualmente non si sia arrivati a sistemi stabili. I valori estrapolati al termine delle simulazioni mostrano come per tutti i modelli polimerici si ottenga un valore di oscillazione che resta il medesimo fino al termine del tempo di simulazione (circa 5 Å di oscillazione). Da questa prima analisi si evince che le piccole molecole di chinino non modificano la stabilità del polimero, e questa è una condizione necessaria poiché il farmaco non deve in alcun modo aggiungere variabili comportamentali al polimero da utilizzare.

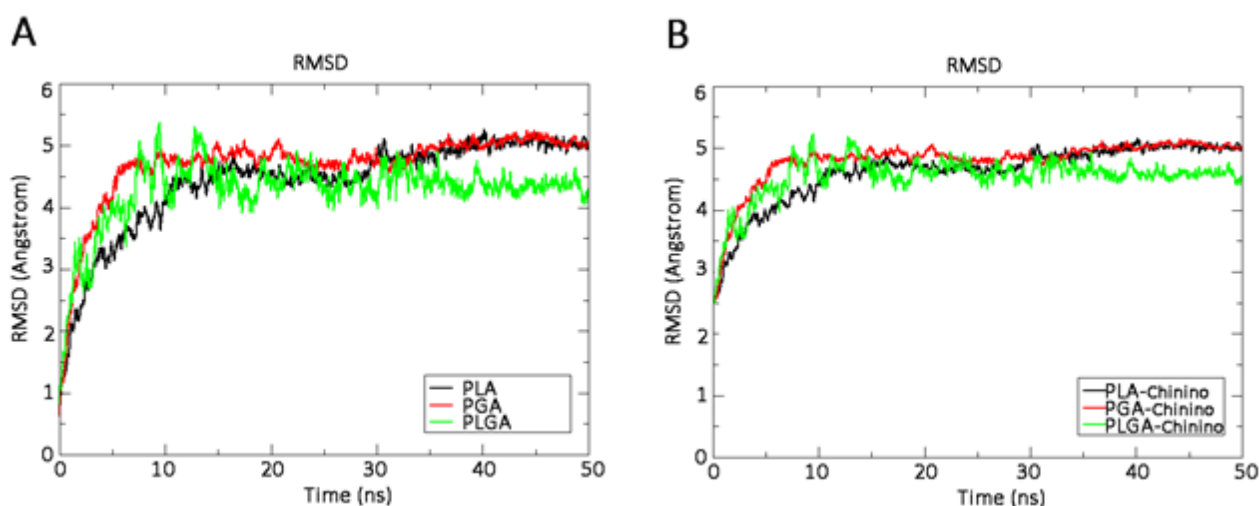


Figura 30: Deviazione quadratica media dei sistemi polimerici in assenza (a) ed in presenza di farmaco (b)

Allo scopo di comprendere il comportamento dei polimeri a contatto con fluidi biologici, sono state investigate l'area di superficie accessibile a solvente (SASA) (figura 31a) ed il numero di legami idrogeno che i sistemi polimerici instaurano con l'acqua (figura 31b). Tali analisi sono ampiamente utilizzate per determinare quale sia il grado di miscibilità dei sistemi polimerici una volta somministrati.

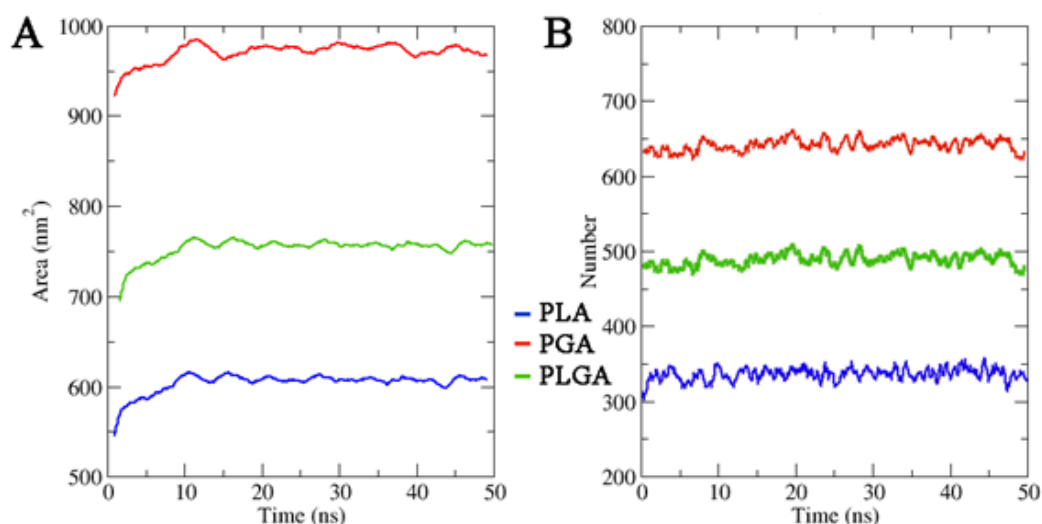


Figura 31: Area di superficie accessibile al solvente (a) e numero di legami idrogeno polimero-acqua (b)

Dalle analisi si evince come il sistema PGA presenta una elevata miscibilità col solvente, mostrando un valore di SASA di circa 968 nm² e un valore medio di 643 legami idrogeno con la fase acquosa. Tale comportamento è dovuto al basso contenuto di componenti polimeriche apolari, che rendono le forze di interazione tra le catene polimeriche molto deboli rispetto alle interazioni con il solvente. Ne consegue un'altissima miscibilità del PGA, inficiando un potenziale rilascio controllato di farmaco.

Le molecole, infatti, non sarebbero adeguatamente protette nel momento in cui il polimero va immediatamente incontro a idrolisi.

Il sistema PLA al contrario mostra un valore di SASA di circa 608 nm^2 e 342 espliciti legami idrogeno con il solvente. Il valore molto basso di SASA dimostra che la miscibilità del sistema è decisamente inferiore rispetto a quella riscontrata nel modello PGA, e questa enorme differenza è relativa alla presenza del gruppo metilico in ogni unità di PLA. Questo gruppo sembra giocare un ruolo fondamentale nel favorire le interazioni tra le catene polimeriche, determinando una maggiore resistenza al solvente. La miscibilità riscontrata per il PLA risulta essere decisamente molto bassa, poiché le forti interazioni apolari riscontrate favoriscono le interazioni del polimero con sé stesso. Il forte contributo idrofobico deriva dalle interazioni dirette tra i gruppi metilici del sistema PLA.

Il modello copolimerico PLGA, risultato dell'utilizzo dei polimeri di acido lattico e di acido glicolico, mostra un comportamento intermedio rispetto ai due sistemi evidenziati precedentemente, e ciò è dovuto alla presenza di un quantitativo di gruppi metilici inferiore rispetto a quelli riscontrati nel PLA. Infatti, i valori di SASA riscontrati per il copolimero sono 756 nm^2 , ed un valore medio di 487 legami idrogeno sono stati osservati. La specifica quantità di gruppi metilici (75 PLA : 25 PGA) risulta essere sufficiente, poiché il copolimero sembra mostrare una elevata stabilità, dovuta ad interazioni polimero-polimero, ed anche una elevata capacità di interazione con il solvente. Dalle simulazioni, il copolimero PLGA sembra essere il miglior candidato da utilizzare come sistema di drug delivery del chinino.

La figura 32 riporta le strutture rappresentative dei tre polimeri al termine delle simulazioni. Si noti come il PLA resti più compatto, in relazione alle forti interazioni polimero-polimero dovute ai legami apolari tra i gruppi metilici, mentre il PGA si presenta ben disteso con una ben più elevata attitudine alla miscibilità ed a generare legami polari (legami idrogeno o forze ione-dipolo) con il solvente. Il PLGA invece mostra un comportamento intermedio, candidandosi come miglior modello da utilizzare tra i tre sistemi polimerici indagati. Il motivo è legato al PLGA interagisce con il solvente ma mantiene una elevata stabilità, poiché si osserva una importante modulazione tra le interazioni apolari polimero-polimero e le interazioni polari tra polimero e fase acquosa.

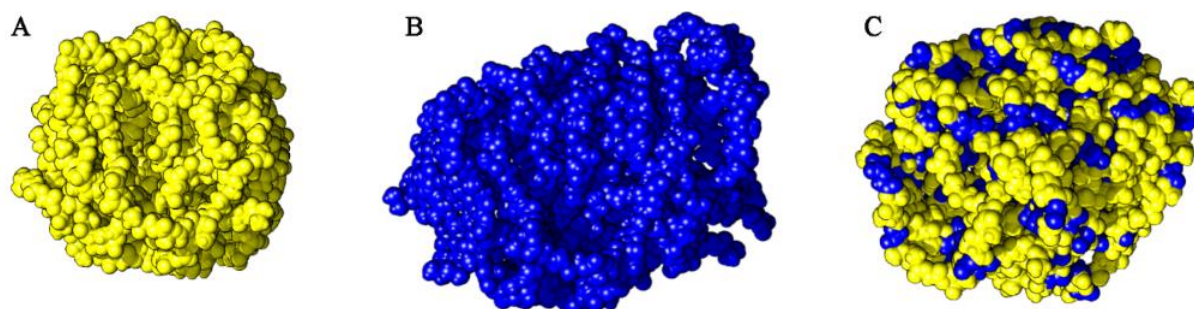


Figura 32: struttura di PLA (a), PGA (b) e PLGA(c) in equilibrio dinamico. Le unità di acido lattico sono di colore giallo, mentre quelle di acido glicolico sono riportate in blu. L'acqua e gli ioni del solvente sono stati omessi per maggior chiarezza di immagine

In sintesi, le simulazioni di dinamica molecolare mostrano comportamenti differenti dei tre vettori polimerici in esame. L'analisi delle traiettorie e l'estrapolazione di proprietà specifiche conducono all'individuazione del PLGA come al miglior candidato asservato, in relazione alle caratteristiche fisico-chimiche evidenziate. Tuttavia, il tipo e le caratteristiche delle molecole di farmaco possono innescare processi di difficile lettura in ambito sperimentale. L'utilizzo di metodiche di simulazione atomistica rende alcune proprietà chiave accessibili all'occhio umano, permettendo una indagine con il massimo grado di accuratezza possibile.

5.2 Sistemi polimerici con il farmaco

Abbiamo già ampiamente discusso circa le differenze tra i polimeri scelti come vettori del chinino. Per quanto concerne il farmaco considerato, il chinino (figura 33ab) rappresenta una molecola estremamente lipofila, con qualche gruppo polare in grado di interagire con sistemi polari. Proprio queste caratteristiche rendono il chinino idoneo alla sua veicolazione tramite sistemi polimerici, il quale grado di degradazione determinerà l'effettivo rilascio del farmaco nel sito target.

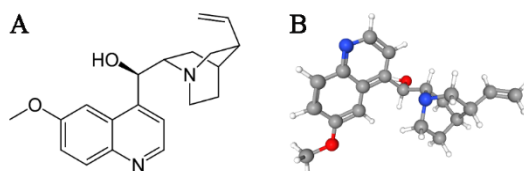


Figura 33: Struttura 2D (a) e 3D (b) del chinino

Prima di procedere alle simulazioni dei sistemi contenenti chinino, le molecole di farmaco sono state esplicitamente poste all'interno del core polimerico, allo scopo di simulare il comportamento del sistema a seguito di un riprodotto caricamento del polimero e di una somministrazione.

5.2.1 PLA Chinino

Il modello basato su polimero di acido lattico è stato il primo sistema investigato con l'approccio di dinamica molecolare. Nel corso della simulazione il sistema si dimostra estremamente stabile, poiché si evidenziano forti contributi idrofobici dovuti alle interazioni apolari tra le unità monomeriche di

acido lattico. Tali interazioni sono state osservate per tutti i 50 ns di simulazione e sono le medesime osservate nel sistema PLA senza farmaco. La forte tendenza del sistema ad aggregare con sé stesso rende di fatto poco miscibile il sistema PLA-Chinino, che rischia di essere poco solubile a contatto con solventi biologici. Inoltre, nel corso delle simulazioni le molecole di chinino restano stranamente aggregate tra loro tramite interazioni di π -stacking e legami idrogeno (figura 34). Questa particolare caratteristica è ascrivibile alla poca miscibilità del polimero, ripercuotendosi sulla capacità di diffusione nel farmaco, il quale aggrega con sé stesso. Questo ha un duplice effetto negativo: da un lato il farmaco non viene opportunamente rilasciato, dall'altro la formazione di aggregati di piccole molecole diminuisce drasticamente la biodisponibilità delle stesse. Ciò vuol dire che se anche il polimero venisse completamente degradato, tutto il farmaco sarebbe rilasciato in un unico step, senza alcun tipo di controllo e senza alcuna efficacia.

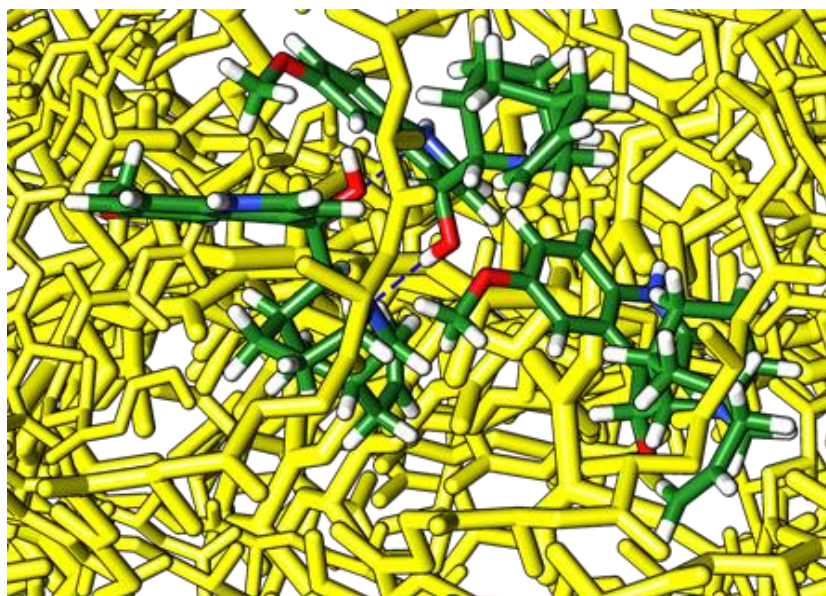


Figura 34: Modello di PLA-Chinino. Le catene polimeriche sono riportate in giallo, mentre gli atomi di C, O, N e H delle molecole di chinino sono riportate in verde, rosso, blu e bianco rispettivamente. Le linee blu tratteggiate indicano i legami idrogeno tra le molecole di chinino

Tali interazioni sono favorite dalla scarsa miscibilità del vettore a contatto con i solventi biologici. Al termine dei 50 ns di simulazione le molecole di chinino non dimostrano una tendenza alla diffusione, al contrario restano stabilmente nel core del sistema polimerico. Tali evidenze mostrano che il sistema non risulta particolarmente idoneo ad un utilizzo come sistema di drug delivery nell'ottica di terapie mirate per il trattamento al covid19.

5.2.2 PGA Chinino

Il modello PGA-Chinino è stato preso in considerazione in questo paragrafo. Abbiamo già visto come il polimero basato su unità di acido glicolico abbia un evidente carattere polare, promuovendo forti interazioni con il solvente ed evidenziando una elevata tendenza alla degradazione per idrolisi. Dalle simulazioni di dinamica molecolare si evince che l'aggiunta delle molecole di chinino nel core del vettore PGA ha un forte effetto destabilizzante sul polimero. In particolare, all'inizio della simulazione, le molecole di chinino cercano un miglior accomodamento conformazionale nel core del polimero, indice del fatto che il farmaco non sembra particolarmente incline ad interagire con il vettore. Ciò provoca un aumento nello spazio del core polimerico, poiché prevalgono effetti repulsivi tra le catene, che di fatto promuovono le loro interazioni con il solvente, già favorite. Questo facilita il movimento diffusivo delle molecole di chinino, che molto rapidamente evadono dal core polimerico diffondendo nella fase acquosa (figura 35)

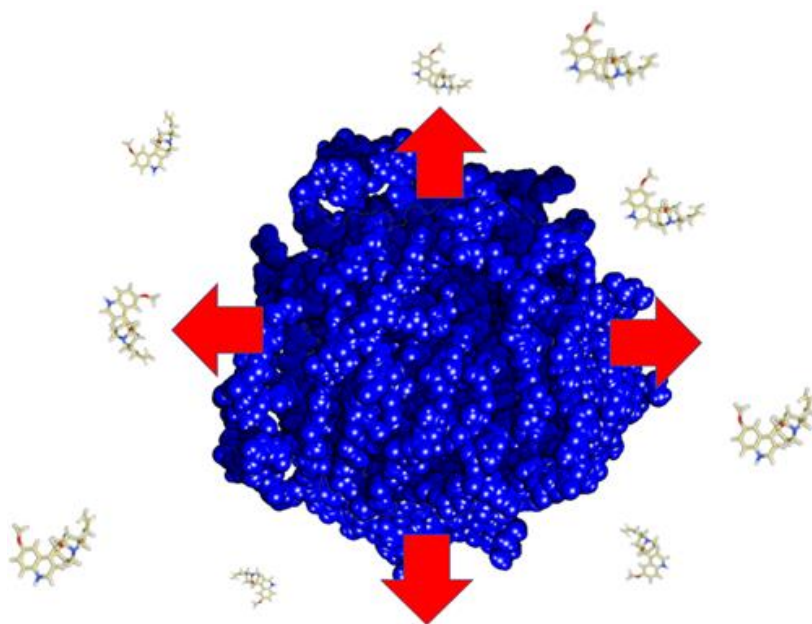


Figura 35: Modello PGA-Chinino. Le catene polimeriche sono riportate in sfere blu, mentre gli atomi di C, O, N e H delle molecole di chinino sono riportate in giallo, rosso, blu e bianco rispettivamente. Le frecce rosse servono ad enfatizzare la dispersione del polimero PGA.

Le molecole di polimero tendono a diffondere, e le interazioni tra chinino e polimero sono molto deboli. Per questi motivi tutto il farmaco viene rilasciato molto rapidamente. Queste considerazioni ci portano a ritenere il sistema PGA-chinino come non particolarmente utile, non solo perché il polimero mostra un eccessivo grado di miscibilità, ma anche perché il farmaco viene rilasciato velocemente, non riuscendo a raggiungere il sito bersaglio.

5.2.3 PLGA Chinino

Il sistema PLGA-Chinino è l'ultimo osservato. Questo modello si basa sull'utilizzo del copolimero composto da unità di acido lattico e acido glicolico, con un ordine di successione casuale che conduce alla formazione di un polimero amorfo. Questa rappresenta una condizione assolutamente necessaria per l'utilizzo di sistemi PLGA in sistemi di rilascio controllato di farmaci. Le unità di acido glicolico hanno un carattere idrofilo importante, che quindi promuovono le interazioni con la fase acquosa favorendo la diffusione del polimero. Dall'altro lato le unità di acido lattico (presenti in forma enantiomerica) tendono ad aggregare tra loro tramite interazioni apolari promosse dai gruppi metilici. Poiché dalle simulazioni di dinamica molecolare i due polimeri PGA e PLA hanno mostrato gravi defezioni, a causa di un elevato carattere idrofilo del primo e di un evidente carattere lipofilo per il secondo, l'utilizzo di un copolimero basato sui due sistemi potrebbe rappresentare una strategia vincente per la progettazione razionale di sistemi di rilascio controllato dei farmaci. Inoltre, modulando sulle concentrazioni dei due tipi di unità monomeriche è possibile modificare il carattere del vettore, modulando accuratamente tra il carattere idrofilo e lipofilo. Per quanto concerne i nostri sistemi, parliamo di drug delivery in relazione alla diffusione di covid19, quindi è per noi necessario considerare in particolare un determinato carattere lipofilo del polimero, rendendolo allo stesso tempo stabile a contatto con la fase acquosa e in grado di degradarsi in tempi ragionevoli, rilasciando il farmaco in maniera controllata. Un altro motivo di ciò è che il chinino ha un logP decisamente positivo (2.51) quindi è richiesto un certo grado di lipofilità del vettore per stabilizzare le molecole di farmaco al suo interno. Per questi motivi abbiamo scelto di aggiungere solo il 25% di acido glicolico, al fine di non rendere troppo polare il vettore.

Durante i 50 ns di simulazione di dinamica molecolare, questa strategia è risultata essere vincente poiché il sistema si mostra assolutamente stabile, ed è possibile apprezzare un evidente accomodamento delle molecole di chinino nel core copolimerico (figura 36). Le molecole si distanziano tra loro, spostandosi dalla zona centrale alla periferia del sistema PLGA, favorendo forti interazioni polari ed apolari tra farmaco e polimero.

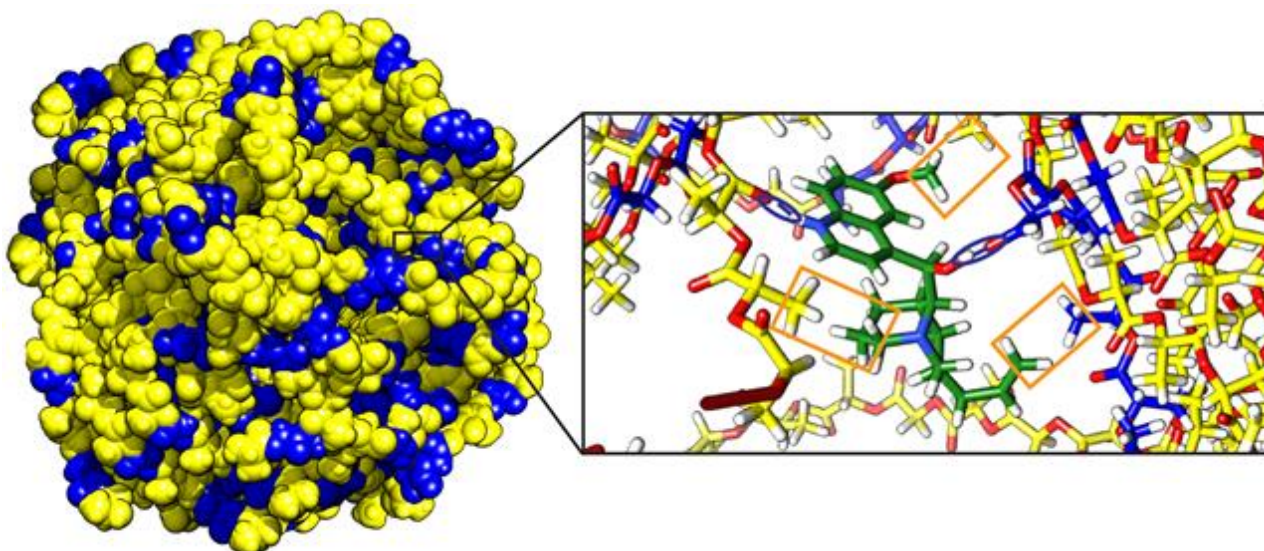


Figura 36: Sistema PLGA-chinino. Le catene polimeriche sono riportate in sfere blu (acido glicolico) e giallo (acido lattico), mentre gli atomi di C, O, N e H delle molecole di chinino sono riportate in verde, rosso, blu e bianco rispettivamente. I cerchi blu ed i rettangoli arancioni evidenziano rispettivamente i legami idrogeno e le interazioni apolari osservate tra chinino e copolimero.

Non si osservano interazioni tra molecole di farmaco, e questo è molto importante poiché eventuali loro aggregati vanno di fatto a ridurre la biodisponibilità dello stesso. Non si osservano diffusioni del chinino nella fase acquosa, sinonimo del fatto che le interazioni con il polimero sono fortemente stabilizzanti. Troviamo infatti legami idrogeno ed interazioni apolari tra chinino e diverse unità di PLGA tra i medesimi. Questo consente di veicolare il farmaco al sito bersaglio, e di rilasciarlo in maniera controllata in relazione ai tempi di degradazione del polimero.

CAPITOLO 6. CONCLUSIONI

I polimeri rappresentano oggi materiali assolutamente utili e innovativi per diversi ambiti tecnologici. L'utilizzo dei polimeri biodegradabili offre avanzate possibilità di sviluppo e ricerca, in particolare, allo scopo di individuare metodiche più innovative ed efficienti in campo biomedico. L'elevata versatilità e modulazione di proprietà fisico-chimiche permette di determinare efficaci approcci contro le più svariate patologie e problematiche, come ad esempio in merito all'attuale pandemia da Covid-19. Sono state largamente discusse le proprietà dei polimeri e le loro caratteristiche. Lo scopo di questa tesi è stato quello di simulare il comportamento di sistemi polimerici al fine di rendere l'alcaloide naturale del chinino il più efficace possibile contro il virus Sars-Cov2.

I metodi e le procedure per ottenere dei sistemi a rilascio controllato di farmaco possono essere molteplici e disparati. Questo lavoro di tesi si è basato sull'utilizzo di modelli di simulazione tramite software specifici e sofisticati. Tale approccio ha permesso di condurre il lavoro evitando contatti tra

persone in laboratorio, mantenendo al tempo stesso il massimo grado di accuratezza possibile. Un altro aspetto importante relativo all'utilizzo dell'approccio computazionale riguarda il fatto che tecniche atomistiche avanzate permettono di far risparmiare tempo e denaro, poiché è possibile studiare in dettaglio una formulazione senza produrla, garantendo così una certa cernita dei sistemi che si dimostrano promettenti per lo sviluppo in laboratorio.

L'efficacia de chinino nei confronti del virus è già stata riscontrata da diversi studi clinici, pertanto ci siamo focalizzati sulla progettazione di sistemi in grado di aumentare la biodisponibilità del farmaco, ovvero la quantità di composto chimico integro in grado di raggiungere il sito bersaglio. I nostri studi si sono focalizzati sui polimeri PLA e PGA, e sul copolimero dei due sistemi, denominato PLGA. Guardando ai risultati ottenuti da questo lavoro di tesi possiamo apprendere che il sistema che meglio si presta alla progettazione di sistemi di rilascio controllato di farmaco è senza dubbio il copolimero PLGA. Le motivazioni di ciò sono fondamentalmente legate al fatto che esso incorpora le caratteristiche specifiche dei polimeri di PLA, il quale è altamente idrofobo, e di PGA, che è invece idrofilo. Dalle simulazioni di dinamica molecolare si evince che il PLA tende ad interagire con i gruppi apolari del chinino e con le catene polimeriche, mantenendo tutto il farmaco sottoforma di aggregato all'interno del sistema polimerico stesso. Al contrario, il PGA non riesce a trattenere per un tempo sufficiente l'alcaloide, il quale diffonde nella fase acquosa in maniera troppo repentina. L'utilizzo del PLGA nella specifica composizione che prevede il 75% di unità di acido lattico e 25% di unità di acido glicolico, con ripetizioni random, ha permesso di mettere a punto un sistema di drug delivery davvero molto promettente, dove le molecole di farmaco vengono veicolate senza generare aggregati ed il polimero mostra il giusto grado di interazione con la fase acquosa tale per cui il farmaco venga veicolato nel sito bersaglio.

In conclusione, questo lavoro di tesi ci ha permesso di progettare promettenti formulazioni in relazione ad un trattamento contro il covid19. La modellazione atomistica e lo sviluppo dei sistemi hanno permesso di investigare la compatibilità della molecola naturale da me scelta. Questo lavoro rappresenta un punto di partenza per successivi passaggi di sintesi e saggi biochimici volti a sviluppare le promettenti formulazioni teorizzate in questo lavoro di tesi.

BIBLIOGRAFIA

1. Rodriguez-Morales AJ, Bonilla-Aldana DK, Balbin-Ramon GJ, Rabaan AA, Sah R, Paniz-Mondolfi A, Pagliano P, Esposito S. 2020. *History is repeating itself: probable zoonotic spillover as the cause of the 2019 novel coronavirus epidemic*. Infez Med **28**:3–5.
2. Philip V'kovski, Annika Kratzel, Silvio Steier, Hanspeter Stalder, Volker Thiel *Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2*. Nature Reviews Microbiology 2020.
3. Kuldeep Dhama^{a,*} Sharun Khan,^{b,*} Ruchi Tiwari,^{c,*} Shubhankar Sircar,^{d,*} Sudipta Bhat,^{d,*} Yashpal Singh Malik,^{d,*} Karam Pal Singh,^{a,*} Wanpen Chaicumpa,^{e,*} D. Katterine Bonilla-Aldana,^{f,g,h,*} and Alfonso J. Rodriguez-Morales^{g,h,i,*} *Coronavirus Disease 2019–COVID-19*
4. Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Verdiá-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, Castaño Rodríguez C, Alcaraz A, Torres J, Aguilera VM, Enjuanes L. 2014. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis*. PLoS Pathog
5. Bai Yan, Yao Lingsheng, Wei Tao, et al. *Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19* JAMA. 2020.
6. Duygu YILMAZ AYDIN, Metin GURU, Selahattin GURU, *Effect of Alkaloids on SARS-Cov-2*, NATURENGS, MTU Journal of Engineering and Natural Sciences, Special Issue (2020) 10-18
7. Asaad Ma. Babker, Lana Sotnik, Vyacheslav Lyashenko *Polymeric Materials in Medicine*, February 2018
8. Maurice Dalton, Martin John Forde, Declan Devine, Ian Major *Bioresorbable Polymers and their biomedical application: preface* October 2017
9. S.H. Kim Y. Jung *Resorbable polymers for medical applications* Ottobre 2013

10. Kim, K. K., & Pack, D. W. (2006). *Microspheres for Drug Delivery. BioMEMS and Biomedical Nanotechnology: Volume I Biological and Biomedical Nanotechnology*, 19–50.

11. Lakshmi S. Nair, Cato T. Laurencin, *Biodegradable polymers as biomaterials* August 2007
Journal of Biomaterials Science Polymer Edition 32(8-9):762-798

12. Maximilian Große, Natalia Ruetalo , Ramona Businger , Sascha Rheber , Christian Setz1 , Pia Rauch1 , Janina Auth1, Ekkehard Brysch, Michael Schindler, and Ulrich Schubert, *Evidence taht quinine exhibits antiviral activity against Sars-CoV-2 infection in vitro*, 6/07/2020

13. Srinivasa, A.; Tosounidou, S.; Gordon, C., *Increased Incidence of Gastrointestinal Side Effects in Patients Taking Hydroxychloroquine: A Brand-related Issue?* The Journal of rheumatology 2017, 44, (3), 398.

14. Tönnesmann, E.; Kandolf, R.; Lewalter, T., Chloroquine cardiomyopathy - a review of the literature. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 2013, 35, (3), 434-42.

15. Vera, A.; Howard, J., *WHO temporarily pauses hydroxychloroquine study due to safety concerns. CNN*, 2020.

16. Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3(3), 1377–1397.

17. Deepak N Kapoor, Amit Bhatia, Ripandeep Kaur, Ruchi Sharma, Gurvinder Kaur, Sanju Dawan, PLGA: a unique polymer for drug delivery. January 2015, *Therapeutic Delivery* 6(1):41-58

18. AC Vieira, JC Vieira, RM Guedes, AT Marques. Experimental degradation characterization of PLA-PCL, PGA-PCL, PDO and PGA fibres. In: International Committee on Composite Materials (ICCM). Edinburgh, 27-31 July 2009.

19. Scaffaro, R., Maio, A., Sutura, F., Gulino, E. F., & Morreale, M. (2019). Degradation and Recycling of Films Based on Biodegradable Polymers: A Short Review. *Polymers*, 11(4), 651.
20. Daniela Pappalardo, Torbjorn Mathisen and Anna Finne-Wistrand Biocompatibility of resorbable polymers: A historical perspective and framework for the future, *Biomacromolecules* 2019 20 (4), 1465-1477
21. Pradip Jana, Mousumi Shyam, Sneha Singh, Venkatesan Jayaprakash, Abhimanyu Dev, Biodegradable polymers in drug delivery and oral vaccination, *European Polymer Journal*, Volume 142, 2021,
22. Dong Liu, Fang Yang, Fei Xiong and Ning Gu, The smart drug delivery system and its clinical potential, *Theranostics* 2016, Vol. 6, Issue 9
23. Shimon Ben-Shabat, Ludmila Yarmolinsky, Daniel Porat, Arik Dahan, Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: applications and drug delivery strategies. *Drug Delivery and Translational Research* ,2020 10:354-367
24. Fatemeh Sadat Tabatabaei Mirakabad, Kazem Nejati-Koshki, Abolfazi Akbarzadeh, Mohammad Rahmati Yamchi, Mortaza Milani, Nosratollah Zarghami, Vahideh Zeighamian, Amirbahman Rahimzadeh, Somayeh Alimohamadi, Younes Hanifehpour, Sang Woo Joo, PLGA-Based nanoparticles as cancer drug delivery system. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(2), 517-535
25. Weiner S. J., Kollman P. A., Case D. A., Singh U. C., Ghio C., Alagona G., Profeta Jr. S., Weiner P. A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Protein. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106 765-784.

26. Pearlman, David A., Case, David A., Caldwell James, W., Ross, Wilson S; Cheatham, Thomas E. III, DeBolt Steve, Ferguson David, Seibel George, Kollman Peter. "AMBER", a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to stimulate the structural and energetic properties of molecules. Computer Physics Communications, Volume 91.
27. Hagler A. T., Huler E., Lifson S. Energy functions for peptides and proteins. I. Derivation of a consistent force field including the hydrogen bond from amide crystals. J. Am. Chem. Soc. 1974, 96 (17) pp 5319-5327.
28. William L. Jorgensen. Quantum and statistical mechanical studies of liquids. 10. Transferable intermolecular potential functions for water, alcohols, and ethers. Application to liquid water J. Am. Chem. Soc. 1981, 103 (2), pp 335-340.
29. Wendy D. Cornell, Piotr Cieplak, Christopher I. Bayly, Ian R. Gould, Kenneth M. Merz, David M. Ferguson, David C. Spellmeyer, Thomas Fox, James W. Cadwell, Peter A. Kollman. A Second-Generation Force Field for the simulation of Protein, Nucleic Acids, and Organic Molecules. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (19), pp 5179-5197.
30. Kollman P. A., Dixon R., Cornell W., Fox T., Chipot C., Pohorille A. The development/application of a "minimalist" organic/biochemical molecular mechanic force field using a combination of ab initio calculations and experimental data.
31. Jumei Wang, Piotr Cieplak, Peter A. Kollman. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?
32. Wolfgang Damn, Wilfred F. Van Gunsteren. Reversible peptide folding: Dependence on molecular force field used. Journal of Computational Chemistry July 2000, Volume 21, Issue 9, pages 774-787, 15.

33. Viktor Hornak, Robert Abel, Asim Okur, Bentley Strockbine, Adrian Roitberg, and Carlos Simmerling. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* November 2006, Volume 65, Issue 3, pages 712-725, 15.
34. Romelia Salomon-Ferrer, David A. Case, Ross C. Walker. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* March/April 2013, Volume 3, Issue 2, pages 198-210.
35. Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., DiNola A., Haak J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 1984, 81:3684-3690.
36. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 2007, 126:014101.
37. Nosè S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.* 1984, 52:255-268.
38. Hoover W. G. Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev.* 1985, A31:1695-1697
39. Nosè S., Klein M. L. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Mol. Phys.* 1983, 50:1055-1076.
40. Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* 1981, 52:7182-7190.
41. Yu Y. H.; Lu B. Z.; Han J. G.; Zhang P. F. *J Computer-Aided Mol Design* 2004, 18, 251.
42. Halperin I.; Ma B.; Wolfson H.; Nussinov R. *Proteins* 2002, 47, 409.