

UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTA' DI INGEGNERIA

Corso di Laurea triennale in Ingegneria Biomedica

Analisi *in silico* di sistemi polimerici utilizzati per applicazioni biomediche e farmaceutiche

In silico analysis of polymer systems used for biomedical and pharmaceutical applications.

Relatore:

Prof. Emiliano Laudadio

Tesi di Laurea di:

Houssem Khirat

Correlatore:

Prof. Pierluigi Stipa

Indice

Introduzione	pag.4
Scopo della tesi	pag.9
Metodi	pag.9
Meccanica classica	pag.9
AMBER FF	pag. 14
Analisi conformazionale e minimizzazione dell'energia	pag.16
Dinamica molecolare	pag.18
Basi teoriche della dinamica molecolare: L'equazione del moto di Newton	pag.18
Ensembles	pag.19
Condizioni periodiche di contorno	pag.19
Coupling della temperatura e della pressione	pag.20
Modelli di solvente	pag.21
Lo scoring	pag.21
Settaggio del sistema	pag.22
Risultati	pag.23
Sistema PLA senza farmaci	pag. 23
Sistema PLA per il rilascio di paracetamolo	pag.24
Sistema PLA per il rilascio di prednisolone	pag.26
Sistema PLA per il rilascio di isoniazide	pag.27
Analisi strutturali	pag.29
Conclusioni	pag. 33
Bibliografia	pag.34

Introduzione

Un polimero è una macromolecola, ovvero una molecola dall'elevato peso molecolare, costituita da un gran numero di gruppi molecolari (o unità strutturali) uguali o diversi, come avviene nei copolimeri, uniti "a catena" mediante la ripetizione dello stesso tipo di legame, il quale è di tipo covalente. Alla base delle strutture polimeriche vi sono i monomeri, ovvero molecole semplici dotate di gruppi funzionali tali da renderle in grado di combinarsi ricorsivamente con altre molecole, identiche tra loro o reattivamente complementari ad esse, per formare macromolecole. Esistono polimeri naturali e di sintesi, con una elevata variabilità di struttura e funzione a seconda del tipo di monomeri utilizzati e delle strategie di polimerizzazione adottate.

Recentemente sono stati sviluppati polimeri biodegradabili, ovvero macromolecole che, disperse nell'ambiente, si decompongono facilmente in composti meno inquinanti grazie all'azione di batteri o altri microrganismi. Dagli ultimi decenni i polimeri biodegradabili ricoprono un ruolo di primo piano nelle applicazioni biomediche e farmaceutiche, come ad esempio nello sviluppo di impianti ortopedici, dispositivi intravascolari, dentali, sistemi per il rilascio controllato di farmaci, supporti temporanei utilizzati per guidare la crescita di tessuti ecc. I polimeri biodegradabili vengono utilizzati nella preparazione di matrici per l'ingegneria tissutale, e tali matrici sono, in genere, costituite da:

•materiali polimerici di sintesi, ottenibili in modo riproducibile, meccanicamente resistenti, biocompatibili e, possibilmente, biodegradabili-riassorbibili;

•biopolimeri di origine naturale come, ad esempio, l'acido ialuronico ed alcuni suoi derivati.

Una volta impiantati nel corpo, i dispositivi biodegradabili-riassorbibili devono necessariamente conservare opportune proprietà meccaniche richieste dal tipo di applicazione, e devono successivamente essere degradati, assorbiti, ed eliminati dall' organismo senza innescare processi infiammatori.

Il meccanismo primario di degradazione del polimero è l'idrolisi dei gruppi idrofili a contatto con l'acqua contenuta dei fluidi biologici. Nella prima fase di degradazione, l'acqua penetra all'interno del dispositivo, interagisce a livello dei legami nella zona amorfa del polimero e trasforma le lunghe catene polimeriche in frammenti più corti e solubili in acqua, diminuendo il peso molecolare del polimero (figura 1). Durante seconda fase di degradazione il dispositivo polimerico subisce un processo di attacco enzimatico. La metabolizzazione dei frammenti determina una rapida perdita della massa polimerica.



Figura 1: Schema di degradazione polimerica

Uno dei polimeri biodegradabili più utilizzati per lo sviluppo di sistemi di rilascio dei farmaci è sicuramente l'acido polilattico (PLA). Esso è un componente ampiamente utilizzato appartenente alla famiglia dei poliesteri alifatici. Ha guadagnato apprezzamento e popolarità sin dal primo isolamento dal latte acido nel 1780 e successiva produzione nel 1881, tappe importanti avvenute sulla base di ricerche approfondite circa lo sviluppo di metodi di elaborazione avanzati [1].

Le specifiche proprietà fisico-chimiche e meccaniche del PLA sono alla base di un suo proficuo utilizzo per la progettazione di specifici dispositivi medici riassorbibili, ed anche per l'industria alimentare. Esso costituisce il biomateriale più utilizzato per scopi medici, dal momento che viene completamente degradato a contatto con acqua e anidride carbonica. Conosciuto anche come polilattide, il PLA è altamente biocompatibile e riassorbibile, ed è attualmente considerato una bioplastica poiché derivata da biomassa, e quindi non basata sull'utilizzo di fonti non rinnovabili come le riserve di petrolio [2]. La versatilità d'uso, il basso costo, la reperibilità, l'origine non inquinante e la capacità di biodegradarsi avvicinano il PLA al concetto di biomateriale plastico ideale.

La possibilità di combinare strutture di PLA con altri polimeri sintetici apre importanti prospettive scientifiche e tecnologiche nell'ottica dell'economia circolare e della sostenibilità ambientale. La ricerca sull'acido lattico, ovvero il monomero di PLA, ha portato grandi progressi nell'utilizzo di strutture polimeriche da esso derivato nell' industria alimentare [3]. Più nel dettaglio, l'acido lattico (acido 2-idrossipropionico) è un acido carbossilico ottenuto naturalmente, ma può anche essere prodotto per fermentazione o sintesi chimica. La maggior parte dell'acido lattico è prodotta mediante fermentazione batterica di carboidrati tramite Lactobacilli modificati allo scopo di produrre esclusivamente acido lattico.

L'acido polilattico, la cui formula chimica è $(C_3H_4O_2)_n$, può esistere in tre forme stereochimiche (figura 2): poli (L-lattide) (PLLA), poli (D-lattide) (PDLA) e come copolimero dei due precedenti (PDLLA). Oggi è noto che *Lactobacilli amylophilus*, *L. casei*, *L. bavaricus*, *L. maltaromicus* e *L. salivarius* producono l'isomero L, mentre l'isomero D e le miscele sono prodotti principalmente dai ceppi di *L. delbrueckii*, *L. jensenii*, *L. acidophilus*. In laboratorio, l'acido polilattico può essere

prodotto attraverso tre diversi processi: condensazione diretta, polimerizzazione dell'acido lattico (C₃H₆O₃) con apertura dell'anello e distillazione azeotropica. Le forme amorfe e cristalline possono essere facilmente ottenute [4]. Un'altra particolare caratteristica del PLA riguarda la temperatura di fusione, che è compresa tra 150 e 160 °C. Costituisce un polimero che si liquefa, che non brucia e che può essere raffreddato e riscaldato senza eccessivo degrado in virtù di una notevole termoplasticità. Quest'ultima proprietà consente anche la riciclabilità del PLA, al contrario di quanto si possa affermare per materiali termoindurenti, i quali si alterano irreversibilmente con il riscaldamento e bruciano alla seconda esposizione di calore [5]. La bassa temperatura di transizione vetrosa rende il PLA inadeguato per applicazioni ad alta temperatura, ma molto adatto per una modellazione secondo la forma desiderata a circa 100 °C, come ad esempio in acqua a temperatura di ebollizione, nelle impostazioni della sala operatoria, per il trattamento delle fratture.

Il PLA può essere prodotto con vari processi e mezzi, usando una vasta gamma di catalizzatori e producendo strutture polimeriche di vari peso molecolare, densità e velocità di riassorbimento [6]. Le proprietà del PLA dipenderanno da: polimerizzazione, temperatura di lavorazione, tempo di ricottura, peso molecolare, isomeri componenti, grado di cristallinità e orientazione.



Figura 2: struttura 2D dell'acido lattico, formazione del dimero (lattide), e conseguente apertura dell'anello che porta alla polimerizzazione senza l'aggiunta di solventi (a). Forme enantiomeriche dell'acido lattico, ovvero acido S lattico ed acido R lattico, che portano alla formazione di polimeri diversi tra loro (b).

Il PLA e i sistemi copolimerici da esso derivati hanno mostrato risultati migliori rispetto ad altri materiali nello sviluppo di applicazioni nell'ambito della ingegneria biomedica. L'uso dell'acido polilattico in queste applicazioni non è solo basato sulla sua biodegradabilità ma anche sull'utilizzo di risorse rinnovabili. Il PLA viene utilizzato per la sua compatibilità e offre eccellenti proprietà oltre al suo basso prezzo [7].

In definitiva, i benefici nell'utilizzo del PLA sono la rinnovabilità, la biocompatibilità, la capacità di processo e il risparmio energetico. Inoltre, gli effetti non tossici e non cancerogeni nel corpo umano

rendono questo polimero ed i suoi prodotti di degradazione, come H₂O e CO₂, utili per applicazioni biomediche e sistemi di somministrazione di farmaci (DDS).

I polilattidi, sia che si tratti di strutture idrofile (polivinilpirrolidone, poliidrossietilmetacrilato e alcool polivinilico), che idrofobiche (etilene vinil acetato, polidimetilsilossani) che di polimeri biodegradabili (polilattidi, acido poliglicolico, policaprolattone, cianoacrilati polialchilici e acido poli(lattico-co-glicolico) trovano ampio impiego come sistemi di rilascio di farmaci [8].

Lo scopo principale del migliorare i sistemi di rilascio dei farmaci risiede nella volontà di aumentare la disponibilità del farmaco nel corpo umano, migliorando il rapporto di farmaco effettivamente in grado di raggiungere il sito bersaglio evitando la degradazione prematura dei farmaci, diminuendo la tossicità sistemica ed aumentando il tempo di ritenzione. A questo scopo, i polimeri sono strutturati come nanosfere o nanocapsule, ed il farmaco è situato all'interno del polimero stesso oppure assorbito sulla sua superficie, a seconda della lipofilicità del farmaco [9]. I sistemi microparticellari sono particelle con dimensioni comprese tra 1 e 1000 µm, anche se le dimensioni di maggior interesse sono generalmente comprese nell'intervallo 1-200 µm. Il principio attivo incapsulato in un sistema può essere localizzato nelle cavità interne al sistema (i.e., microcapsule) o finemente disperso nella matrice polimerica (i.e. microsfere), a seconda della tecnica di produzione e/o della formulazione di partenza. Allo scopo di ottenere questi composti, vengono utilizzati riempitivi, come i minerali d'argilla, nanotubi di carbonio, il grafene e il suo precursore [10]. L'organo-montmorillonite e le nanofibre naturali sono utilizzati come agenti annessi.

In tale contesto si inserisce il presente lavoro di Tesi, avente come obiettivo l'analisi *in silico* di microsfere polimeriche basate su PLA ed utilizzate per il rilascio controllato di farmaci. Un grande vantaggio di tali sistemi di rilascio è dato dal fatto che sono particolarmente efficaci con dosi di farmaco somministrato relativamente basse [11]. Il rilascio dei farmaci nei tessuti bersaglio avviene attraverso diversi meccanismi, tra cui la diffusione e la degradazione del vettore polimerico [12]. Recentemente è stata studiata la combinazione di polimeri &-caprolattone, policaprolattone (PCL), caprolattone e acidi polilattici per generare nuovi sistemi a rilascio controllato di farmaci. Vari composti farmaceutici, come i farmaci antitumorali, cardiovascolari, antipsicotici, dermatoterapia, vitamine, ormoni, immunoterapia vaccinale, antibiotici, antimicobatterici, antimalarici ed antinfiammatori vengono degradati ed eliminati come sostanze semplici e non tossiche [13].

L'innesto del PLA sul chitosano inoltre si è dimostrato utile come acceleratore di guarigione delle ferite o agente rigenerante dei nervi nelle nanoparticelle biodegradabili prodotte per rilascio di farmaci [14]. Le nanoparticelle di PLA possono essere utilizzate come vettori per il rilascio transdermico di farmaci. Il rilascio contino del farmaco dal composto può durare fino a un anno [8].

In generale, i biomateriali sono fabbricati in maniera tale da risultare porosi per utilizzarli come sistemi di rilascio; il pH e la presenza di specifiche strutture molecolari sono componenti di grande importanza, e giocano un ruolo fondamentale nel corretto funzionamento dei polimeri come sistemi di trasporto di farmaci (Drug Delivery System (DDS)) [9].

Come il polimero e l'ambiente tissutale possono influenzare il corretto rilascio del farmaco, così quest'ultimo può incidere sul comportamento dinamico del polimero. I farmaci sono piccole molecole che possono essere idrofile o idrofobe, e quindi essere solubili in solventi polari (come l'acqua) o apolari (come le matrici lipidiche cellulari). Per poter dare un valore al grado di lipofilicità di un composto chimico, viene utilizzata la regola di Lipinski, detta anche regola del 5 di Lipinski o semplicente regola del 5. Essa costituisce un importante algoritmo ideato dal ricercatore Christopher Lipinski nel 1997, utilizzato per la progettazione e lo sviluppo di farmaci, ed è costituita da un insieme di requisiti da imprescindibili per la selezione di una molecola destinata ad essere studiata come farmaco. Tali regole sono le seguenti:

- la molecola in esame non deve avere una massa molecolare maggiore di 500 Da (PM < 500). Se la molecola fosse voluminosa e pesante sarebbe difficilmente assimilabile dall'organismo ed incontrerebbe difficoltà nel processo di diffusione;
- 2- la molecola non deve possedere nel suo scheletro chimico più di 5 donatori di legami idrogeno. Troppi legami idrogeno rendono la molecola estremamente polare, impedendone la diffusione nelle parti lipofile (apolari) delle membrane cellulari;
- 3- la molecola non deve possedere nel suo scheletro chimico più di 10 accettori di legami idrogeno, costituiti solitamente da atomi di ossigeno e azoto;
- 4- la molecola deve avere un log (P) minore di 5 [log (P) < 5]. Il log P è il logaritmo del coefficiente di ripartizione della molecola in ottanolo ed in acqua, ed esprime una precisa misura della liposolubilità della molecola; molecole con log (P) > 0 sono definite lipofile, mentre i composti con log (P) < 0 sono idrofili; molecole con log (P) = 0 hanno una polarità intermedia. Il n-ottanolo è scelto perché mima le proprietà anfifiliche, teste polari e catene lipofile dei fosfolipidi che costituiscono le membrane cellulari.

La capacità di un composto di essere assorbito viene spesso quantificata come biodisponibilità orale. Questo termine definisce il rapporto tra la massima concentrazione raggiunta da un composto somministrato oralmente e la massima concentrazione raggiunta dallo stesso composto somministrato per via endovenosa. Anche se un farmaco non soddisfa una o più di una delle regole sopra elencate, può comunque avere una soddisfacente biodisponibilità. Le regole di Lipinski vanno considerate come principi guida ai fini di valutare nuovi possibili farmaci.

Scopo della tesi

Lo scopo della tesi è quello di investigare dal punto di vista computazionale il comportamento di uno specifico sistema polimerico utilizzato per veicolare farmaci, e di valutarne il comportamento in assenza ed in presenza di alcuni farmaci specificatamente scelti. L'idea di questo lavoro di tesi è quella di mettere a punto un sistema predittivo che permetta di ricavare le proprietà chimico-fisiche dei sistemi polimerici DDS, simulandone il comportamento nel loro ambiente natio. L'utilizzo di risorse di calcolo sempre più accurate e sofisticate permetterebbe di predire la capacità di uno specifico sistema polimerico nel veicolare uno specifico farmaco, considerando anche l'ambiente in cui si trova. In tal modo sarebbe possibile prevedere le caratteristiche di un sistema ancor prima di spendere tempo e soldi per la progettazione in laboratorio, evitando anche l'annoso problema dello smaltimento dei rifiuti di laboratorio. Il presente lavoro di tesi si focalizza sullo studio accurato del sistema di PLA, e pone in risalto le differenze di comportamento del vettore polimerico in differenti condizioni. A questo scopo, il lavoro di tesi ha previsto quattro simulazioni di dinamica molecolare della durata di 50 nanosecondi (ns) ciascuna, considerando il prednisolone, il paracetamolo e l'isoniazide come farmaci da testare e da veicolare con il modello PLA. Sono stati ricreati i seguenti quattro sistemi: sistema PLA in acqua con 0.15 M NaCl, sistema PLA-prednisolone in acqua con 0.15 M NaCl, sistema PLA-paracetamolo in acqua con 0.15 M NaCl, sistema PLA-isoniazide in acqua con 0.15 M NaCl. In tal modo per ciascuna simulazione è stato ricreato l'ambiente cellulare, e sono state valutate differenti caratteristiche tra cui l'effetto ed il rilascio del farmaco.

Metodi

Meccanica classica

La chimica computazionale è la branca della chimica teorica che si occupa dello sviluppo di modelli matematici, basati sia sulla meccanica classica che sulla meccanica quantistica, in grado di simulare sistemi chimici, 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, per ottenere, rappresentare e manipolare strutture, reazioni molecolari e tutte quelle proprietà strettamente legate alla tridimensionalità dei sistemi.

É possibile trattare il sistema molecolare in esame in due modi: considerando l'atomo come l'unità fondamentale utilizzando la meccanica molecolare (fa 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, centinaia o 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. 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 nel 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, angoli di legame, angoli diedri e interazioni di non legame. 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 legata 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 3: 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 4: 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 5: Andamento dell'energia in funzione del movimento di stretching secondo il potenziale armonico (in verde) e di Morse (in blu).

2. Potenziale di bending Eb

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".

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

Un altro termine di correzione è la distinzione del bending *in-plane* dal bending *out-of-plane* per gli atomi ibridizzati sp2.



Valence angle bending

Figura 6: Movimento di bending atomico



Figura 7: 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.

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

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 Es e Eb.



Figura 8: Andamento del potenziale in funzione della torsione dell'angolo diedro.

Quando si hanno sistemi ibridizzati sp2 le cose si complicano perchè il bending *out-of-plane* può distruggere la simmetria del sistema, per cui tali interazioni devono essere trattate a parte.



Figura 9: Torsione di un angolo diedro.

4. Potenziale di non legame Enb

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 Buckingam. Il potenziale di Lennard-Jones richiede un calcolo meno oneroso rispetto al potenziale di Buckingam. Considera quelle che sono le interazioni a corto raggio.

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

 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.

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

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



Figura 10: 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 alto livello. Per cui ogni atomo viene descritto utilizzando una serie di parametri che riguardano: l'ibridazione, la carica formale sull'atomo, gli atomi vicinali con cui è legato. In questa maniera si definisce l'*atom type*, 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 [14] e implementato nel pacchetto di dinamica molecolare denominato AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) [15]. 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 [16] e dalle simulazioni allo stato liquido cominciate da

Jorgensen [17]. 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 [18].

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 voleva 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 [19] e l'ff99 [20] si cercò di accordare i dati sperimentali ottenuti tramite dicroismo circolare e NMR con i dati trovati tramite calcoli quantomeccanici [21].

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 cattivo 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 [22]. 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 [23].

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 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 *downhill*.



Figura 11: 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.

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.

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

La dinamica molecolare 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.

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 nell'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).

Condizioni periodiche di contorno

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



Figura 12: 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 se 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.

Coupling della temperatura e della pressione

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

1- Berendsen: viene utilizzato per la fase di equilibrazione, non genera il corretto ensemble termodinamico per questo viene definito weak-coupling (coupling debole della temperatura) [24].

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 [25].

3- Nosè-Hoover: è utilizzato per la fase produttiva della simulazione, poiché garantisce un corretto ensemble termodinamico. [26,27].

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 d'equilibrazione [24].

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) [28, 29].

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.





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.

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 [30]. Così, il punto fondamentale di un metodo computazionale efficiente è avere una 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 [31]. Un criterio basato esclusivamente sulla complementarietà geometrica non permette di discriminare bene tra complessi [32]. 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.

Settaggio del sistema

Durante il periodo di tesi è stato considerato un sistema polimerico composto da PLA amorfo di 16968 atomi, corrispondenti a 64 monomeri di acido lattico. Tale sistema è stato posto in un box di simulazione di 16 nm³ ed opportunamente solvatato con 130873 molecole di acqua e 740 ioni salini (370 ioni Na+ e 370 ioni Cl- espliciti). Come già riportato, questo sistema è stato considerato per

quattro differenti simulazioni di dinamica molecolare. Nella prima simulazione non sono stati considerati farmaci, nella seconda sono state introdotte 78 molecole di paracetamolo (PM= 151,163 g/mol; log (P)= 0.3), nella terza sono state aggiunte 32 molecole di prednisolone (PM= 360,444 g/mol; log (P)= 1.6), mentre nella quarta simulazione sono state inserite 81 molecole di isoniazide (PM= 137,139 g/mol; log (P)= -0,7). La scelta del numero specifico di molecole di farmaci da aggiungere è relativa alla volontà di ricreare specifiche condizioni sperimentali in cui si aggiungono 5 mg/ml di farmaco.

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 farmaco in relazione alla quantità di polimero sono state simulate usando farmaci comparativi, polimeri e i rapporti molari in acqua. Il paracetamolo, il prednisolone e l'isoniazide sono farmaci già ampiamente noti e già veicolati con sistemi di PLA, e stati scelti per questo lavoro di tesi sulla base di una marcata differenza di lipofilicità testimoniata dai valori di log (P). Sistemi di PLA contenenti tali farmaci rappresentano quindi un ottimo punto di partenza per la validazione del protocollo computazionale. Le catene di polimero sono state modellate utilizzando Macromodel Maestro v 11.1, ovvero una suite della Schroedinger che permette, tramite la funzione Building Polymer, di generare strutture polimeriche più o meno complesse, considerando molto precisamente 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 che normalmente si riscontrano in ambito sperimentale. 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 microsfere (sia in presenza che in assenza di farmaci).

Risultati

Le traiettorie di dinamica molecolare sono state estrapolate ed analizzate, e permettendo un dettagliato studio del comportamento delle strutture polimeriche e come esse vengono influenzate dalla presenza del farmaco.

Sistema PLA senza farmaci

Allo scopo di valutare il comportamento del polimero in un ambiente di simulazione che potesse mimare le condizioni cellulari, è stata dapprima condotta una simulazione di dinamica molecolare in assenza di farmaco, considerando esplicitamente la presenza del polimero di PLA, di molecole di acqua e di ioni Na⁺ e Cl⁻. Tale iniziale approccio risulta cruciale anche per la necessità di validare il

metodo di simulazione, e per essere certi di generare strutture molecolari verosimili a quelle che originano *in vivo* ed *in vitro*, escludendo la possibilità di generare artefatti. Ciascuna simulazione di dinamica molecolare ha la durata di 50 ns ed è stata condotta alla temperatura di 310 K (ovvero 37 °C) e alla pressione di 1 atm. Analizzando le traiettorie generate, il sistema si è dimostrato stabile ed in grado di riorientarsi all'interno del box di simulazione (figura 14). Un ruolo importantissimo è interpretato dalla concentrazione salina, poiché gli ioni in soluzione generano importanti interazioni ione dipolo con i gruppi polari del PLA, influenzandone il movimento ed il comportamento.



Figura 14: Strutture tridimensionali rappresentative del modello di PLA nel box di simulazione all'inizio (1ns) ed al termine (50 ns) della simulazione. L'acqua è riportata in punti rossi, mentre le sfere gialle e blu rappresentano rispettivamente gli ioni Na+ e Cl-. Il polimero PLA è riportato in sfere di Van der Waals azzurre, mentre in rosso sono riportati gli atomi di ossigeno del PLA.

Dall'analisi delle traiettorie risulta evidente il comportamento del polimero, il quale orienta i gruppi esterei delle catene polimeriche a contatto con l'acqua e gli ioni, predisponendo le componenti idrofobiche a generare interazioni apolari lontano dall'ambiente acquoso. Tali fattori emersi dalle traiettorie, seppur teoricamente scontati, sono molto importanti poiché permettono di validare il metodo predittivo. Il polimero risponde al solvente ed alla concentrazione salina in maniera esattamente identica a quanto già sperimentalmente determinato, e ciò permette di utilizzare il metodo computazionale messo a punto per studiare di sistemi polimerici atti al rilascio controllato di farmaci.

Sistema PLA per il rilascio di paracetamolo

Durante la preparazione delle microsfere, i farmaci idrofobici si legano alla porzione idrofobica delle matrici polimeriche, in quanto entrambi non sono in grado di generare legami idrogeno con mezzi acquosi. In varia misura, in relazione alla chimica fisica del farmaco, le molecole potrebbero

rimanere intrappolate all'interno delle microsfere polimeriche precipitanti. I risultati computazionali indicano che la relativa capacità di incapsulamento di un polimero per una varietà di farmaci può essere modellata. Da quanto detto, si evince che le simulazioni possono essere usate per prevedere l'incapsulamento di farmaci idrofobici come il prednisolone e paracetamolo all'interno di polimeri PLA. Questi metodi computazionali possono essere costituire uno strumento di screening iniziale per polimeri da utilizzare ancor prima delle procedure di incapsulamento sperimentale. Sulla base di tali considerazioni, abbiamo analizzato le traiettorie di dinamica molecolare del sistema di PLA in soluzione fisiologica ed in presenza delle molecole di paracetamolo. Questo farmaco presenta un valore di log (P)= 0.3, e quindi risulta essere una molecola con carattere blandamente lipofilo. Dai risultati *in silico* abbiamo osservato che le molecole di paracetamolo sono in grado di interagire fortemente con le componenti idrofobiche del PLA, e tali interazioni risultano meno intense lungo la durata della simulazione, nel corso della quale il farmaco genera interazioni polari con il solvente (figura 15).



Figura 15: Strutture tridimensionali rappresentative modello di PLA nel box di simulazione all'inizio (1ns) ed al termine (50 ns) della simulazione. L'acqua è riportata in punti rossi, mentre le sfere gialle e blu rappresentano rispettivamente gli ioni Na+ e Cl-. Il polimero di PLA è riportato in sfere di Van der Waals azzurre, mentre in rosso sono riportati gli atomi di ossigeno del PLA. In verdi sfere di Van der Waals sono riportate le molecole di paracetamolo.

Analizzando il comportamento del farmaco, si nota che durante i 50 ns le molecole di paracetamolo si trovano dapprima in prossimità delle componenti apolari del PLA per poi spostarsi a ridosso delle porzioni esteree polari del polimero, permettendo da un lato di ottenere un discreto grado di incapsulamento, dall'altro un consistente rilascio (figura 16). L'incapsulamento dei farmaci a carattere più o meno idrofilico a livello delle componenti esteree delle microsfere polimeriche risulta però problematico, poiché farmaci prettamente idrofili rimangono nella fase acquosa durante la lavorazione e i forti legami idrogeno con l'acqua impediscono la co-precipitazione nella matrice

polimerica e successiva associazione con la superficie della microsfera polimerica. Il paracetamolo, oltre ad avere gruppi polari, ha anche un parziale carattere lipofilo, che gli consente di essere incapsulato e veicolato all'interno del polimero di PLA, anche se non si osserva una elevata quantità di farmaco. A causa della scarsa lipofilicità del farmaco, la percentuale di inglobamento estrapolata dalla simulazione è molto bassa, e questo risultato è in linea con i dati sperimentali presenti in letteratura. Ciò è dovuto al fatto che le interazioni tra il paracetamolo ed il solvente sono fortemente competitive con le interazioni tra il farmaco ed il polimero, inficiando fin da subito la possibilità di inglobare e veicolare una elevata quantità di farmaco.



Figura 16: Struttura rappresentativa del sistema PLA-Paracetamolo ottenuto al termine dei 50 ns di dinamica molecolare. Le molecole di paracetamolo (riportate in verde) sono blandamente inglobate nel sistema di PLA (riportato in sfere di Van der Waals azzurre e rosse). Si noti che in prossimità delle molecole di Paracetamolo troviamo sia le porzioni apolari del polimero, evidenziate da atomi di Carbonio (riportati in sfere azzurre) che legano atomi di idrogeno (riportate in sfere bianche), sia da gruppi polari, evidenziati dai gruppi esterei del polimero (atomi di carbonio che legano atomi di ossigeno, questi ultimi sono riportati in sfere rosse). L'acqua e gli ioni non sono riportati per una maggior chiarezza dell'immagine.

Sistema PLA per il rilascio di prednisolone

Un altro sistema polimerico considerato riguarda l'incapsulamento del prednisolone, il quale ha un log (P)= 1.6. Tale farmaco risulta essere prettamente lipofilo, infatti dalle simulazioni di dinamica molecolare abbiamo osservato che le molecole di prednisolone restano in prossimità delle porzioni idrofobe del polimero, generando intense interazioni apolari che sono state osservate per tutto il corso della durata della simulazione (figura 17). Tali forti interazioni garantiscono anche un controllato e prolungato rilascio del farmaco, il quale resta inglobato nel sistema polimerico fino alla degradazione del vettore polimerico stesso. Sarà proprio il tempo di degradazione del PLA a determinare la velocità di rilascio del farmaco. Il sistema si è dimostrato stabile ed in grado di

riorientarsi nel box di simulazione, sulla base delle forti interazioni PLA-prednisolone riscontrate per tutti i 50 ns di simulazione.



Figura 17: Strutture tridimensionali rappresentative del modello PLA nel box di simulazione all'inizio (1ns) ed al termine (50 ns) della simulazione. L'acqua è riportata in punti rossi, mentre le sfere gialle e blu rappresentano rispettivamente gli ioni Na+ e Cl-. Il polimero di PLA è riportato in sfere di Van der Waals azzurre, mentre in rosso sono riportati gli atomi di ossigeno del PLA. In arancioni sfere di Van der Waals sono riportate le molecole di prednisolone.

L'elevato carattere lipofilo del prednisolone gioca un ruolo fondamentale nell'incapsulamento del farmaco. Analizzando nel dettaglio le pose di binding osservate durante le traiettorie, si nota che le molecole di prednisolone sono sempre circondate dalle componenti apolari del polimero di PLA (figura 18), determinando anche uno specifico effetto sul polimero stesso.



Figura 18: Struttura rappresentativa del sistema PLA-Prednisolone ottenuto al termine dei 50 ns di dinamica molecolare. Le molecole di prednisolone (riportate in arancio) sono efficacemente inglobate nel sistema di PLA (riportato in sfere di Van der Waals azzurre e rosse). Si noti che in prossimità delle molecole di Prednisolone sono presenti le porzioni apolari del polimero, evidenziate da atomi di Carbonio (riportati in sfere azzurre) che legano atomi di idrogeno (riportate in sfere bianche). L'acqua e gli ioni non sono riportati per una maggior chiarezza dell'immagine.

Sistema PLA per il rilascio di isoniazide

Come riportato precedentemente, l'incapsulamento dei farmaci a carattere più o meno idrofilico a livello delle componenti esteree delle microsfere polimeriche risulta problematico poiché tali farmaci rimangono nella fase acquosa durante la lavorazione, generando così forti legami idrogeno con l'acqua che impediscono la co-precipitazione del farmaco nella matrice polimerica e successiva associazione con la superficie della microsfera polimerica stessa. Tali considerazioni sono facilmente evincibili anche dalle traiettorie della simulazione di dinamica molecolare condotta sul sistema PLA ed isoniazide. Questo farmaco presenta un log (P) negativo, quindi rappresenta una molecola prettamente idrofila. Analizzando le traiettorie di 50 ns di dinamica molecolare osserviamo che tutto il farmaco viene rilasciato e si allontana velocemente dal polimero già dopo 5 ns di simulazione (figura 19), promuovendo l'insorgenza di interazioni con il solvente piuttosto che con il polimero.



Figura 19: Strutture tridimensionali rappresentative del modello PLA nel box di simulazione all'inizio (1ns) ed al termine (50 ns) della simulazione. L'acqua è riportata in punti rossi, mentre le sfere gialle e blu rappresentano rispettivamente gli ioni Na+ e Cl-. Il polimero di PLA è riportato in sfere di Van der Waals azzurre, mentre in rosso sono riportati gli atomi di ossigeno del PLA. In sfere blu di Van der Waals sono riportate le molecole di isoniazide.

Si potrebbe affermare che un così basso livello di incapsulamento è difficile da studiare e quantificare usando simulazioni su scala atomistica, a causa della granulosità delle strutture polimeriche. L'elevato carattere idrofilo del farmaco determina una rapida diffusione dell'isoniazide in acqua, pur partendo da un sistema in cui le molecole di farmaco sono state forzate a restare all'interno del sistema polimerico (figura 20). Ciò implica che un sistema di questo tipo non può essere felicemente utilizzato per veicolare farmaci come isoniazide, i quali anche

considerando una preparazione con successo, diffonderebbero nel mezzo solvente ancor prima della somministrazione.



Fig 20: Struttura rappresentativa del sistema PLA-Isoniazide ottenuto al termine dei 50 ns di dinamica molecolare. Le molecole di isoniazide (riportate in blu) sono lontane dal sistema di PLA (riportato in sfere di Van der Waals azzurre e rosse). L'acqua e gli ioni non sono riportati per una maggior chiarezza dell'immagine.

Analisi strutturali

Per poter confrontare meglio i sistemi polimerici e per meglio comprendere l'effetto del farmaco sul vettore polimerico, abbiamo operato una serie di analisi strutturali ricavando alcune informazioni dalle traiettorie di dinamica molecolare dei sistemi. Per ciascuna simulazione abbiamo ricavato le deviazioni quadratiche medie (valori RMSD) degli atomi che compongono le catene polimeriche, allo scopo di verificare l'effettivo raggiungimento di uno stato di equilibrio dinamico. Questa analisi è resa necessaria dal fatto che se i valori di oscillazione atomistica del polimero non fossero costanti nel tempo, la simulazione di dinamica molecolare andrebbe necessariamente estesa ad un tempo di simulazione maggiore di 50 ns, poiché significherebbe che il sistema non ha ancora raggiunto una condizione di equilibrio dinamico necessaria affinché si possa indagare il corretto comportamento del sistema. Un'altra analisi strutturale condotta riguarda la determinazione della percentuale di rilascio del farmaco in funzione del tempo di simulazione. Abbiamo già evidenziato come farmaci con log (P) molto diverso possano avere comportamenti molto differenti tra loro, determinando un rilascio in soluzione sempre diverso ed un effetto indiretto sul polimero, che necessita di essere investigato caso per caso. Dall'analisi delle traiettorie siamo in grado di quantificare il farmaco rilasciato ad ogni campionamento del tempo di simulazione.

Ulteriori analisi molto importanti riguardano la determinazione dei profili di densità di massa dei sistemi polimerici, allo scopo di derivare la densità media delle microsfere e la densità delle molecole di farmaci all'interno delle microsfere stesse. I profili di densità di massa permettono di

individuare la distribuzione tridimensionale di un sistema all'interno di un box di simulazione, e permette di comprendere se tale sistema risulti essere ordinato (rilevando la presenza di un picco nel grafico) oppure disordinato (comportamento evidenziato dalla presenza di differenti picchi con intensità minore), e se le molecole si muovano in particolar modo all'interno del box di simulazione. Tale analisi permette anche di quantificare la capacità di diffusione del polimero nel box di simulazione. Un'ultima analisi molto utile è rappresentata dal calcolo della percentuale di volume libero, ovvero il volume occupato da un sistema in relazione alla grandezza del box. Essendo le dimensioni del box di simulazione e le dimensioni del sistema PLA costanti per i quattro modelli di simulazione, una variazione del volume libero occupato dal sistema polimerico è certamente un dato interessante in relazione alla presenza di un determinato farmaco.

Osservando i valori di oscillazione degli atomi che compongono i sistemi polimerici (valori RMSD) si nota che tutti i modelli, in presenza ed in assenza di farmaci, raggiungono uno stato stazionario di oscillazione dopo 25 ns di simulazione, che costituisce il tempo oltre il quale osserviamo un valore medio di oscillazione che è costante fino al termine delle simulazioni (figura 21A). Notiamo inoltre che i sistemi hanno un andamento omogeneo tra loro, e questo è molto importante, poiché se ci fossero variazioni significherebbe che il tipo e/o la quantità di farmaco inserita andrebbe a modificare le proprietà chimico fisiche del sistema polimerico, inficiandone le caratteristiche di diffusione e la flessibilità molecolare. Questa analisi ci permette di constatare che i sistemi sono stabili e che raggiungono uno stato di equilibrio dinamico.



Figura 21: Scarto Quadratico Medio (Root Mean Square Deviation, RMSD) dei sistemi polimerici in assenza ed in presenza dei farmaci (a). Percentuale di rilascio dei farmaci in funzione del tempo di simulazione (b).

Analizzando la percentuale di rilascio del farmaco in funzione del tempo di simulazione, notiamo comportamenti molto differenti, e ciò è ascrivibile al tipo di farmaco rilasciato (figura 21B). In particolare, si nota che il sistema polimerico contenente il prednisolone trattiene efficacemente il farmaco al suo interno, determinando un rilascio decisamente prolungato. Ciò è dovuto al fatto che il prednisolone interagisce con le componenti apolari del polimero, evitando le interazioni con il

solvente. Il carattere lipofilo di questo farmaco rende il sistema PLA un ottimo metodo di rilascio. Analizzando il sistema contenente il paracetamolo, notiamo che il trend è leggermente diverso, a seguito del fatto che il log (P) del farmaco è inferiore a quello del prednisolone. Ne consegue che il paracetamolo interagisce anche con il solvente, generando una competizione tra le interazioni farmaco-polimero e le interazioni farmaco-solvente, come già precedentemente affermato. Questo comportamento determina un maggior rilascio del farmaco in soluzione durante il tempo di simulazione.

Il sistema contenente isoniazide presenta invece un andamento completamente diverso dai primi due sistemi analizzati. In questo caso, il farmaco genera forti interazioni con il solvente già dopo 10 ns di simulazione. Ne consegue che il farmaco, estremamente idrofilo, interagisce blandamente con i gruppi esterici dei polimeri, per poi essere rapidamente rilasciato nel solvente dove avverranno interazioni ione-dipolo con gli ioni Na⁺ e Cl⁻ e legami idrogeno con l'acqua.

Il diagramma delle densità di massa dei sistemi di PLA ha confermato un effetto diretto del farmaco sul sistema (figura 22A). In assenza di farmaco si osserva una distribuzione spaziale del PLA molto diversa rispetto a quella adottata dal medesimo sistema polimerico in presenza dei farmaci. In particolare, il modello senza farmaci mostra una diffusione abbastanza omogenea nello spazio di simulazione, con una ripartizione specifica tridimensionale che va da 6 a 12 nm di distanza dal centro del box di simulazione. Le microsfere di PLA in presenza di paracetamolo presentano invece una elevata densità di massa a 6 nm di distanza dal centro del box, con una progressiva diminuzione di distribuzione da 7 nm in poi. Tale differenza è determinata dal farmaco, il quale interagisce con le componenti polari del polimero, e quest'ultimo a sua volta crea delle strutture compatte. Diverso è il comportamento riscontrato per il sistema contenete prednisolone. In questo caso, l'elevata lipofilicità del farmaco determina un andamento di distribuzione confrontabile con il sistema PLAparacetamolo, salvo poi avere una densità di distribuzione molto diversa dopo i 4 nm di distanza dal box di simulazione. Dopo tale valore, il sistema PLA in presenza di prednisolone mostra una densità di distribuzione tridimensionale molto simile a quella riscontrata per il sistema PLA senza farmaci, per poi fa registrare una consistente distribuzione a circa 14 nm dal centro del box. Le forti interazioni tra il polimero ed il prednisolone influenzano la distribuzione spaziale del polimero stesso, ed il riorientamento delle componenti apolari determina la formazione di un sistema decisamente disordinato se confrontato con gli altri due sistemi PLA studiati. Analizzando il sistema PLA con isoniazide, l'effetto del farmaco è ancor più evidente, in virtù del fatto che esso viene rilasciato completamente e rapidamente nel solvente. Notiamo infatti che questo sistema è quasi totalmente distribuito ad una distanza di 4 nm dal centro del box, per poi far registrare livelli di densità decisamente bassi. Ciò è dovuto al fatto che il sistema "subisce" la totale fuoriuscita del farmaco, determinando un grado di compattezza elevato a seguito del riorientamento dei gruppi polimerici, che all'inizio della dinamica interagivano con l'isoniazide, mentre dopo poco tempo di simulazione il farmaco viene completamente rilasciato. Poiché il modello di simulazione è stato preparato allo scopo di valutare l'effetto del farmaco, e poiché tutte le molecole di farmaco sono state inizialmente "forzate" all'interno del sistema polimerico, per poi essere lasciate libere di diffondere, la marcata fuoriuscita del farmaco dal sistema polimerico ha generato un profilo di densità di massa che costituisce certamente un artefatto, proprio perché sperimentalmente sarebbe impossibile introdurre molecole di farmaco con caratteristiche altamente idrofile in un sistema di PLA.



Figura 22: Profili di densità di massa dei sistemi polimerici in assenza ed in presenza dei farmaci (a). Percentuale di volume libero in funzione del tempo di simulazione (b).

Anche i risultati relativi alla percentuale di volume libero sono molto interessanti. Questa analisi permette di determinare il volume libero in un box di simulazione in funzione del tempo. Il volume libero viene tracciato come una frazione del volume totale. Per poter operare questa analisi, il software tenta di inserire una sonda con un determinato raggio nel corso delle simulazioni, e se la distanza tra la sonda e qualsiasi atomo è inferiore alle somme del raggio di van der Waals di entrambi gli atomi, la posizione è considerata occupata, ovvero non-free. Quindi questa analisi ci permette di mettere in relazione il volume libero del box di simulazione con il grado di compattezza del polimero. I volumi relativi alle molecole di farmaco non sono stati considerati, per poterci focalizzare sul comportamento del polimero (figura 22B). Quindi l'unico volume non libero è costituito dal volume libero maggiore rispetto agli altri modelli. Ciò è strettamente correlato al fatto che il polimero non riesce a trattenere il farmaco, determinando un grado di compattezza molto elevato, che si traduce con una quantità di volume libero più elevata. Anche il sistema senza farmaci

presenta una percentuale di volume libero elevata, in virtù del fatto che, come per il sistema con isoniazide, non ci sono interazioni specifiche con altre molecole, quindi il polimero si compatta minimizzando il più possibile l'esposizione al solvente delle sue componenti apolari. Nel modello con paracetamolo la percentuale di volume libero si abbassa, poiché il comportamento del farmaco determina una maggior esposizione delle componenti esteree del polimero, tramite le quali interagisce con il farmaco ed il solvente. La minor percentuale di volume libero riguarda il sistema contenente prednisolone. Abbiamo già ampiamente discusso circsa l'elevata lipofilicità di questa molecola, dunque il motivo per cui la percentuale di volume libero risulta essere la più bassa rispetto ad altri sistemi è relativa proprio alla presenza di questo farmaco nel sistema polimerico, il quale utilizza le sue componenti apolari per interagire con il farmaco, determinando una espansione tridimensionale del PLA, traducibile con una più bassa percentuale di volume libero.

Conclusioni

I polimeri sono strutture basate sulla ripetizione di una o più unità chimiche, e proprio grazie alla possibilità di utilizzare un elevato numero di molecole, naturali e sintetiche, è possibile ottenere polimeri con tantissimi tipi di caratteristiche. Per questi motivi i polimeri sono oggi molto utilizzati in moltissimi ambiti. La sintesi polimerica può però essere difficile da controllare, e sistemi particolarmente grandi potrebbero essere di difficile smaltimento e degradazione. Inoltre la determinazione delle giuste condizioni di sintesi (intese come reattivi da utilizzare e quantità specifiche) rende oneroso e dispendioso il processo di messa a punto di sistemi polimerici utilizzati per il rilascio controllato e selettivo dei farmaci. Il polimero infatti reagisce differentemente in base all' ambiente in cui si trova ed al farmaco che trasporta. Vista la possibilità di generare un elevato numero di sistemi, lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di mettere a punto un metodo predittivo basato sull'utilizzo di sofisticate tecniche computazionali, volte a simulare il comportamento di sistemi polimerici in specifiche condizioni. L'idea alla base di questo lavoro è quella di sviluppare un metodo predittivo basato su simulazioni di dinamica molecolare che permetta di progettare molti differenti sistemi polimerici da utilizzare per la strategia di drug delivery, ed effettuare quindi uno screening dei sistemi promettenti ancor prima di procedere con la sintesi e la produzione in laboratorio. In questo modo ci si focalizza solo sulla messa a punto sperimentale di sistemi promettenti, evitando la perdita di tempo e di soldi per lo sviluppo di un elevato numero di modelli da testare, molti dei quali risulterebbero poi inattivi e/o tossici. Nel corso del lavoro di tesi ci siamo soffermati sullo studio di un sistema polimerico basato su acido polilattico (PLA), già ampiamente studiato ed utilizzato per il rilascio controllato dei farmaci. I farmaci testati per il drug delivery sono stati paracetamolo, isoniazide e prednisolone, anche essi già ampiamente noti. La scelta di questi tre farmaci è relativa ai loro valori di log (P), che risultano

essere molto diversi tra loro. Le simulazioni di dinamica molecolare hanno mostrato come il farmaco abbia un effetto indiretto sul comportamento del polimero, e che i tempi di rilascio sono differenti a seconda delle caratteristiche del farmaco veicolato. In particolare, gli studi *in silico* hanno evidenziato come il trasporto di farmaci idrofili come l'isoniazide sia problematico se si utillassero sistemi di PLA ed altri simili ad esso, poiché tale farmaco si disperde rapidamente nel solvente. Al contrario il trasporto di un farmaco lipofilo come il prednisolone è risultato efficace, poiché il farmaco è opportunamente protetto dal polimero, il quale interagisce sia con il solvente tramite i suoi gruppi esterici, sia con il farmaco tramite le sue componenti apolari. Un comportamento particolare è stato riscontrato nel trasporto del paracetamolo, in cui il carattere blandamente lipofilo intermedio del farmaco determina una competizione tra le interazioni polimero-farmaco e solvente-farmaco. Tutti questi risultati e considerazioni sono in linea con dati sperimentali già pubblicati, evidenziando quindi l'affidabilità del metodo predittivo messo a punto, e la possibilità di utilizzarlo per la progettazione razionale ed il design molecolare di nuovi promettenti sistemi polimerici da utilizzare per il rilascio controllato e selettivo dei farmaci.

Bibliografia

- Hartmann MH. 1998. High molecular weight polylactic acid polymers. In: Kaplan DL, editor. Biopolymers from renewable resources. Berlin (Germany): Springer Verlag, p. 367–411
- 2- Sergiu Vacarasa, Mihaela Baciutb, Ondine Lucaciub, Cristian Dinua, Grigore Baciuta, Liana Crisana, Mihaela Hedesiua, Bogdan Crisanb, Florin Onisora, Gabriel Armenceaa, Ileana Mitreb, Ioan Barburb, Winfried Kretschmerb and Simion Branb- 2019. Understanding the basis of medical use of poly-lactide-based resorbable polymers and composites a review of the clinical and metabolic impact- Department of Cranio-Maxillofacial Surgery, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, Cluj-Napoca, Romania; Department of Oral Rehabilitation, Maxillofacial Surgery and Implantology, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, Romania.
- 3- Garlotta 2001
- 4- Sha L, Chen Z, Chen Z, Zhang A, Yang Z. 2016. *Polylactic acid based nanocomposites: promising safe and biodegradable materials in biomedical field*. Int J Polym Sci. 2016:1.
- 5- Garlotta D. 2001. A literature review of poly(lactic acid). J Polym Environ. 9: 63-84

- 6- John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. Appl Microbiol Biotechnol. 74:524–534.
- 7- Hamad K, Kaseem M, Yang HW, Deri F, Ko YG. 2015. *Properties and medical applications of polylactic acid: a review*. Express Polym Lett. 9:435–455.
- 8- Sha et al. 2016
- 9- Crisan L, Crisan B, Soritau O, Baciut M, Biris AR, Baciut G, Lucaciu O. 2015. *In vitro study of biocompatibility of a graphene composite with gold nanoparticles and hydroxyapatite on human osteoblasts*. J Appl Toxicol. 35:1200–1210.
- 10-Silva D, Kaduri M, Poley M, Adir O, Krinsky N, Shainsky-Roitman J, Schroeder A. 2018. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. Chem Eng J. 340:9–14.
- 11- El Enshasy HA, Abd Alsaheb RA, Aladdin A, Othman NZ, Abd Malek R, Leng OM, Aziz R.
 2015. *Recent applications of polylactic acid in pharmaceutical and medical industries*. J.
 Chem Pharm Res. 7:51–63.
- 12- Pulkkinen M. 2011. Modified poly(e-caprolactone) and poly(-lactic acid) polymers for controlled and targeted drug delivery (dissertation). Publications of the University of Eastern Finland Dissertations in Health Sciences Number 56. ISBN (pdf): 978-952-61-0426-3.
- 13-Maharana T, Pattanaik S, Routaray A, Nath N, Sutar AK. 2015. *Synthesis and characterization of poly(lactic acid) based graft copolymers*. React Funct Polym. 93:47–67.
- 14-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.
- 15-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 applyng 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.
- 16- 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.

- 17-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.
- 18- Wendy D. Cornell, PiotrCieplack, 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.
- 19-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.*
- 20- Jumei Wang, PiotrCieplack, Peter A. Kollman. *How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?*
- 21-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.
- 22- Viktor Hornak, Robert Abel, AsimOkur, Bentley Strockbine, Adrian Roitberg, ancd Carlos Simmerling. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters. Proteins: Structure, Function, and Bionformatics November 2006, Volume 65, Issue 3, pages 712-725, 15.
- 23- Romelia Salomon-Ferrer, David A. Cae, 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.
- 24-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.
- 25-Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. J. Chem. Phys. 2007, 126:014101.
- 26-Nosè S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. Mol. Phys. 1984, 52:255-268.
- 27-Hoover W. G. Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. Phys. Rev. 1985, A31:1695-1697
- 28-Nosè S., Klein M. L. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. Mol. Phys. 1983, 50:1055-1076.

- 29-Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. J. Appl. Phys. 1981, 52:7182-7190.
- 30-Yu Y. H.; Lu B. Z.; Han J. G.; Zhang P. F. J Computer-Aided Mol Design 2004, 18, 251.
- 31-Halperin I.; Ma B.; Wolfson H.; Nussinov R. Proteins 2002, 47, 409.
- 32-Palma P. N.; Krippahl L.; Wampler J. E.; Moura J. J. G. Proteins 2000, 39, 372.