

# MODELAREA MOLECULARĂ A INTERACȚIUNII LIPOZOMILOR STABILIZAȚI STERIC TRANSPORTORI DE MEDICAMENTE CU OPSONINELE SERICE: I – VALIDAREA MODELELOR

A. Neamțu\*, O. C. Mungiu\*\*

## REZUMAT

Din momentul utilizării pentru prima dată la începutul anilor '90 a lipozomilor stabiliți steric pentru furnizarea de substanțe active medicamentoase organismului și pînă în prezent s-au făcut progrese însemnate în domeniul transportorilor nanoparticulați lipozomali, în prezent existând o tendință de abordare la nivel fundamental a problematicei ameliorării performanțelor acestei clase de vehicule transportoare. Astfel, odată cu creșterea puterii de calcul a computerelor actuale devine posibilă aplicarea metodelor teoretice de modelare în vederea designului in silico a transportorilor și a studiului interacțiunii acestora cu mediul biologic. Studiul (în două părți) prezentat în lucrarea de față își propune stabilirea unei metodologii de lucru folosind tehnici de modelare moleculară pentru studiul interacțiunii dintre opsoninele serice și transportorii lipozomali nanoparticulați, fenomen responsabil de îndepărtarea acestora din circulație, precum și validarea prin comparație cu date experimentale cunoscute a parametrilor utilizați pentru modelare.

**Cuvinte cheie:** modelare moleculară, lipozomi stabiliți steric, opsonine

## ABSTRACT

### Molecular Modelling of the Sterically Stabilized Liposomes – Serum Opsonin Interactions:

#### I. Model Validation

From their first use as transport vehicles for biological active compounds in the early 1990's and until present days, sterically stabilized liposomes (SSL) have evolved significantly and there is now a reality that the research interests in the field of nanoparticulate transporters has moved towards a more fundamental approach. Recently new molecular modelling techniques have become available, due mainly to constant increase in computational power of modern computers, techniques that have a real potential in rational design of nanoparticulate transporters. The present study (in two parts) is trying to establish a new methodology for the study of liposomal transporters using molecular modelling methods, especially for the interactions between serum opsonins and liposomal surfaces. This first part of the study is concerning the validation of the forcefields and simulation parameters used by comparing selected experimental data to simulation predictions.

**Key words:** molecular modelling, sterically stabilized liposomes, opsonins

## Introducere

Apariția în terapeutică și în practica medicală în general a Sistemelor Terapeutice cu acțiune prelungită/controlată reprezintă un moment, s-ar putea spune istoric, aparținând evoluției și dezvoltării farmacologiei. În esență este vorba despre o nouă concepție de formulare, administrare și monitorizare a substanțelor active medicamentoase introduse în organism, mergând în prezent până la utilizarea implantelor ce eliberează treptat, luni de zile, agenții terapeutici, aducând pentru largi categorii de bolnavi (mai puțin în cazurile acute) beneficiile așteptate în vindecarea suferințelor acestora.

Un avânt remarcabil pe tot parcursul preocupărilor privind sistemele terapeutice de la proiectare și până la aplicare s-a constatat odată cu dezvoltarea științei biomaterialelor (de ex. polimeri inteligenți). Biomaterialele, atât cele naturale cât și cele sintetice, constituie în prezent suportul de înglobare sau transport pentru multe formulări în practica medicală a sistemelor terapeutice (Neamțu, 2005).

Sistemele terapeutice pe bază de nanoparticule sunt deosebit de atractive datorită dimensiunilor mici ale transportorilor și posibilităților de modificare a suprafeței acestora în vederea prelungirii timpului de circulație sau a țintirii active

a țesuturilor afectate de diverse procese patologice.

Unii dintre cei mai utilizați transportori nanoparticulați sunt lipozomii – vezicule delimitate de una sau mai multe membrane cu structură de bistrat lipidic, similară membranelor celulare. Substanța activă se găsește încărcată în mediul apos delimitat de aceste membrane pentru substanțele hidrofile sau în miezul hidrofob al straturilor lipidice pentru medicamentele hidrofobe.

Succesul terapeutic al formulărilor lipozomale administrate intravenos depinde în cea mai mare măsură de rata de îndepărtare a acestor transportori din circulație, de dorit fiind un timp cât mai lung de circulație pentru ca aceștia să poată elibera lent medicamentul înglobat, conform programului prestabilit. Din păcate, odată introduși în circulație lipozomii interacționează rapid cu o gamă largă de proteine plasmatică (opsonine), cum ar fi anumite fracțiuni ale sistemului complement, imunoglobulina-G, fibronectina,  $\beta$ 2-glicoproteina I, proteina C-reactivă, apolipoproteine, care fie destabilizează lipozomul fie facilitează captarea acestuia de către fagocitele Sistemului Reticulo-Endotelial.

Adsorbția opsoninelor plasmatică pe suprafețele lipozomilor circulanți este considerat fenomenul central care conduce la îndepărtarea acestor transportori din circulație.

\*Andrei Neamțu - Asistent universitar – Disciplina de Biofizică, Facultatea de Medicină Dentară, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași;

\*\*Ostina C. Mungiu - Profesor universitar – Disciplina de Farmacologie, Toxicologie și Algeziologie, Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

Prelungirea timpului de circulație a lipozomilor transportori de medicamente se poate realiza prin stabilizarea sterică a suprafeței acestora adică prin acoperirea cu diverse substanțe hidrofile cum ar fi PEG (Poli-Etilen-Glicol) (procedeu numit pegilare) sau gangliozidul GM1, acoperire care are ca efect ameliorarea adsorbției opsoninelor plasmatică pe suprafețele lipozomale.

Cu toate că populațiile de celule fagocitare sunt în final responsabile de clearance-ul lipozomilor, existând un mare volum de date experimentale în acest sens, complexe intermediare (temporare) a lipozomilor cu proteinele sanguine sunt încă puțin înțelese și studiate (Jeon, 1991).

Studiul direct al interacțiilor dintre proteinele serice și suprafețele lipozomale (fie ele clasice sau stabilizate steric) este deosebit de dificil de realizat cu o rezoluție temporală și spațială suficientă datorită scărilor de timp și spațiu extrem de mici la care acestea se desfășoară. Tehnicile experimentale adecvate pentru analiza interacției opsonine – bistraturi lipidice lipozomale cum ar fi Rezonanța plasmonică de suprafață, Electroforeza pe gel de poli-acrilamidă sau Spectroscopia bidimensională în infraroșu, necesită protocoale de lucru complexe și tehnologie avansată, costisitoare, fără însă a oferi informații suficiente de detaliat despre interacțiunile și mecanismele intime care conduc în final la manifestarea fenomenului de opsonizare.

Se întrevide însă în prezent o soluție alternativă și complementară în același timp la aceste probleme prin utilizarea metodelor de modelare moleculară. În viziunea noastră, acest tip de abordare își va găsi cu siguranță un loc aparte în dezvoltarea viitoare a bionanotehnologiilor care stau la baza realizării de sisteme terapeutice, fapt susținut de preocupările și investițiile financiare în creștere pe plan mondial în domeniu. Astfel, într-un raport publicat în anul 2003 de către Business Communications Company Inc. [1], intitulat „Biomedical Applications of Nanoscale Devices (B-162)”, se concluzionează următoarele: „Se prevede că totalul cheltuielilor mondiale efectuate pentru realizarea de nanodispozitive și modelare moleculară cu aplicabilitate biomedicală să evolueze cu o Rată Anuală Medie de Creștere (RAMC) de 27,5% de la 400 milioane de dolari în 2002 la 1,37 miliarde de dolari în 2007; vânzările de nanodispozitive biomedicale reprezintă și vor reprezenta în continuare cea mai mare parte a acestei creșteri, cu un indice RAMC de 35%, ocupând 87% din piața de desfacere din domeniu în 2007; aplicațiile software pentru modelare moleculară, deși nu reprezintă nanodispozitive, sunt esențiale pentru designul și fabricarea acestora. Piața acestora, evaluată la 137 milioane de dolari în 2002, va crește cu un indice RAMC de 5,8% pînă la 182 milioane de dolari în 2007; eliberarea țintită/controlată a substanțelor active medicamentoase reprezintă o arie de aplicabilitate de cea mai mare importanță pentru nanodispozitive, unele dintre acestea putînd acționa ele însele ca medicamente. Cu toate că există un prezent extrem de benefic și se prefigurează de asemenea un viitor plin de speranțe justificate al aplicabilității nanodispozitivelor în acest domeniu, punerea la punct pentru uzul clinic curent pe scară largă încă mai are nevoie de timp”.

Există din acest motiv în prezent o preocupare crescândă, chiar dacă se găsește abia la început, în rîndul cercetătorilor implicați în designul farmaceutic pentru aplicarea tehnicilor de modelare moleculară în studiul și designul transportorilor nanoparticulați de substanțe active. Progresele semnificative înregistrate în ultimii ani de industria tehnicii de calcul și de dezvoltarea de aplicații software specializate fac posibilă analiza unor sisteme moleculare extinse, reprezentate pînă

la detaliu de atomi componenți, pentru perioade de timp suficiente pentru a surprinde procese care se desfășoară la nivel de mezoscală (10 – 1000 nm și 10 ns – 10 μs).

Structura și proprietățile nanoparticulelor transportoare de medicamente se încadrează în aceste scări spațio-temporale ceea ce face din modelarea moleculară un instrument eficient în predicția proprietăților fizico-chimice precum și a celor de eliberare pentru această clasă de sisteme terapeutice.

Dintre studiile de modelare moleculară cu impact asupra proprietăților nanoparticulelor lipidice ca vehicule transportoare de substanțe active amintim cele efectuate de Smit (1990) care propune primul model nelaticel pentru studiul surfactanților (ex. fosfolipide), pe baza căruia ulterior s-au realizat cercetări asupra structurării și asamblării miceliilor lipidice (Smit, 1993; Palmer, 1996). Prelungirea duratelor de simulare și extinderea dimensiunilor spațiale a sistemelor simulate, precum și rafinarea modelului Smit au permis ulterior modelarea agregării miceliilor (Gottberg, 1997), a formării spontane în medii apoase a bistraturilor lipidice (Marrink, 2004) și a veziculelor lipidice (lipozomi) (Marrink, 2001a,b, 2003), modelarea adsorbției particulelor coloidale pe suprafețe acoperite cu polimeri aplicînd metoda dinamicii particulelor disipative (Gibson, 1998), modelarea lanțurilor de PEG grefate pe bistraturi lipidice (Rex, 1998; Papisov, 1998).

Un studiu interesant de amintit aici este cel realizat de Lam (2003, 2004) care, chiar dacă nu vizează lipozomi transportori de medicamente, se constituie însă ca prima cercetare de modelare moleculară care analizează proprietățile unui ansamblu veritabil de nanoparticule încărcate cu un agent activ medicamentoasă. Simulările, efectuate prin metoda Dinamicii Particulelor Disipative (Frenkel, 2002), se referă la micelii de bloc-copolimeri încărcate cu haloperidol (un medicament utilizat în tratamentul psihozelor acute și cronice), urmărind influența pe care încorporarea agentului activ o are asupra morfologiei miceliilor. Predicțiile simulărilor au fost confirmate pe deplin de către aceeași autori prin studii experimentale de crio-microscopie electronică de transmisie.

Deși simulările menționate mai sus oferă informații deosebit de utile asupra proprietăților fizico-chimice și de eliberare ale vehiculelor transportoare de substanțe active, nu există însă pînă în prezent studii de acest tip care să utilizeze metodele modelării moleculare pentru analiza directă a interacțiunii dintre mediul biologic și acești transportori.

În lumina celor amintite, studiul prezentat în lucrarea de față (în două părți) își propune tocmai analiza prin modelare moleculară a adsorbției opsoninelor plasmatică pe suprafețele lipozomale clasice și stabilizate steric, ca factor determinant al captării transportorilor lipozomali de către Sistemul Reticulo-Endotelial.

## Material și metodă

Analiza proprietăților fizico-chimice de suprafață a lipozomilor, atât convenționali cât și a celor modificați în vederea prelungerii timpului de circulație, în interrelație cu opsonizarea lor este deosebit de utilă în vederea proiectării unor transportori cu performanțe terapeutice crescute.

În studiul de față s-au realizat o serie de simulări care au avut ca scop într-o primă etapă validarea (verificarea) câmpurilor de forțe și a metodelor utilizate în modelare, urmate apoi de simulări ale fenomenului de opsonizare propriu-zis. În general, modelele sunt validate prin compararea predicțiilor lor în cadrul unor simulări, cu rezultatele achiziționate în

experimente reale corespunzătoare situațiilor simulate. Pentru validarea modelelor fizico-matematice utilizate în descrierea sistemelor terapeutice lipozomale am urmărit reproducerea unor situații concrete, observabile experimental, privind comportamentul de fază al fosfolipidelor în medii apoase. Validarea s-a făcut atât pentru modele de lipide nepegilate cât și pentru amestecuri de lipide nepegilate/lipide pegilate în diverse proporții.

Astfel, pentru dispersiile de lipide nepegilate am încercat să reproducem prin simulare comportamentul structurilor fosfolipidice lamelare bistratificate discoidale care în medii apoase se invaginează și se autosigilează spontan cu formarea în final de lipozomi (vezicule) unilamelari mici.

Pentru amestecurile de lipide nepegilate/lipide pegilate am urmărit reproducerea diagramei tranzițiilor de fază pe care aceste sisteme le manifestă atunci când concentrația de lipide pegilate crește.

Pentru efectuarea simulărilor am folosit metoda Dinamicii Moleculare care constă în esență în reproducerea evoluției în timp a sistemului studiat prin integrarea ecuațiilor clasice de mișcare ale fiecărei particule componente (ex. atom), considerând că aceasta se află sub influența câmpurilor de forțe intramoleculare, intermoleculare și externe (pentru o prezentare pe larg a acestei metode și a aplicațiilor ei în biologia moleculară recomandăm a se consulta Leach, 2001).

Modelul utilizat a fost de tip redus (Coarse Graining Models) în care grupuri restrânse de atomi sunt reprezentate printr-un singur centru de interacțiune. Parametrii aleși pentru reprezentarea lipidelor au fost cei propuși de Marrink (2004). În cadrul acestui model se definesc patru tipuri principale de situri de interacțiune (particule): P – polare, N – semipolare, C – apolare și respectiv Q – încărcate electric. Interacțiunile dintre particulele care nu sunt legate prin legături covalente au fost modelate prin funcții potențiale de tip Lenard-Jones. Parametrii utilizați pentru cele cinci tipuri de interacțiuni definite în cardul modelului sunt:  $\sigma = 0,47\text{nm}$ ,  $\epsilon_1 = 5\text{ kJ/mol}$  (atractive),  $\epsilon_{II} = 4,2\text{ kJ/mol}$  (semiatractive),  $\epsilon_{III} = 4,3\text{ kJ/mol}$  (intermediare),  $\epsilon_{IV} = 2,6\text{ kJ/mol}$  (semirepulsive) și respectiv  $\epsilon_V = 1,8\text{ kJ/mol}$  (repulsive). Pentru particulele încărcate cu sarcină electrică (tipul Q), pe lângă interacțiunile Lenard-Jones se definesc și interacțiuni de tip electrostatic descrise de potențiale de tip Coulomb cu o constantă dielectrică de  $\epsilon_r = 20$ . Legăturile covalente dintre particule sunt modelate prin potențiale de tip armonic cu  $R_{\text{echilibru}} = 0,47\text{ nm}$  și  $K_{\text{leg}} = 1250\text{ kJ/mol}$ . Termenul energetic asociat unghiurilor de valență este modelat sub forma unui potențial unghiular periodic cu parametrul  $\theta_{\text{echilibru}} = 180^\circ$  și  $K_{\text{unghiular}} = 25\text{ kJ/mol}$ .

Pentru validarea modelelor utilizate am efectuat un număr de 5 simulări după cum urmează: în Simularea V1 se pornește de la un petec de membrană (bistrat lipidic) cu o suprafață de  $390,45\text{ nm}^2$  ( $19,76 \times 19,76\text{ nm}$ ) conținând 1250 molecule lipidice de POPC (Palmitoil-Oleoil-fosfatidilcolina) și 75478 molecule de  $\text{H}_2\text{O}$ , având o durată de 112 ns; Simularea V2 este asemănătoare simulării V1, lipidele fiind aranjate sub forma unui petec de bistrat lipidic cu o suprafață de  $886,25\text{ nm}^2$  ( $29,77 \times 29,77\text{ nm}$ ) (2592 molecule de POPC și 188704 molecule de  $\text{H}_2\text{O}$ ) având o durată de 250 ns; simularea V3 începe cu un amestec de lipide nepegilate și pegilate distribuite aleator într-un element de volum având formă cubică cu latura de  $15,99\text{ nm}$  ( $V=4088,3\text{ nm}^3$ ) poziționat în centrul unei celule de simulare conținând solvent ( $\text{H}_2\text{O}$ ) cu latura de  $24\text{ nm}$  ( $V=13824\text{ nm}^3$ ), sistemul conținând 1000 molecule POPC, 100 molecule PE-PEG750 (fosfatidiletanolamina pegilată cu PEG de greutate moleculară aprox. 750) și 110656 molecule

de  $\text{H}_2\text{O}$  (durata simulării 176 ns); simularea V4 începe cu lipidele aranjate sub forma unui petec de bistrat lipidic cu o suprafață de  $872,02\text{ nm}^2$  ( $29,53 \times 29,53\text{ nm}$ ) (2592 molecule de POPC, 128 molecule de PE-PEG550 și 194697 molecule de  $\text{H}_2\text{O}$ ) lipidele PEG-ilate fiind distribuite simetric între cele două straturi lipidice (durata simulării a fost de 279 ns); în simularea V5 atât lipidele nepegilate cât și cele pegilate sunt distribuite aleator în celula de simulare având un volum de  $27000\text{ nm}^3$  (latura de  $30\text{ nm}$ ) (3375 molecule de PEG, 1000 PE-PEG550 și respectiv 200737 molecule de  $\text{H}_2\text{O}$ ), durata simulării fiind de 54 ns.

Toate simulările au fost realizate folosind programul GROMACS 3.2.1 (Berendsen, 1995) sub sistemul de operare Linux OpenSuse 10. Calculul s-a efectuat în mod paralel pe o rețea de tip Gigabit Ethernet de 4 calculatoare PIV (3.00 GHz, 1Mo RAM). Graficele au fost realizate cu ajutorul programului PyMol v0.98 (DeLano, 2005).

## Rezultate și discuții

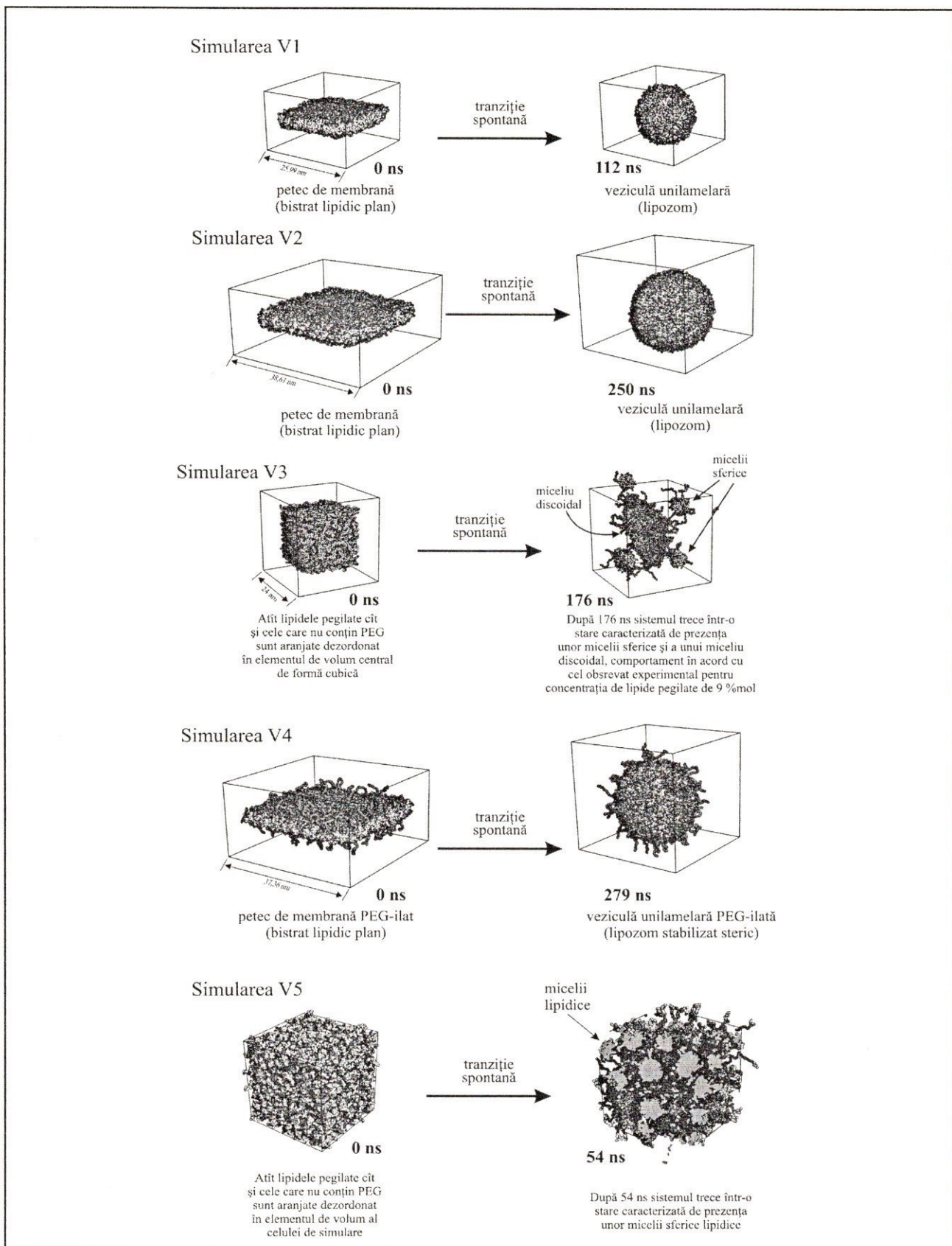
Amestecurile de tip lipide nepegilate/lipide pegilate manifestă o tranziție de la o fază dispersă lamelară (lipozomi) la concentrații mici ale PEG/lipid la o fază micelară la concentrații mari ale PEG/lipid. Tranziția are loc printr-o fază intermediară caracterizată de prezența simultană la început, pe lângă cea a lipozomilor, a unor micelii discoidale mici (bicelii) a căror mărime se diminuează treptat cu creșterea concentrației lipidelor pegilate astfel încât la concentrații mari de PEG întâlnim doar suspensii de micelii (fără lipozomi). Acest comportament de fază a fost pus în evidență prin crio-microscopie electronică de transmisie realizată pe suspensii de lipozomi la diferite concentrații de PEG (Johnsson, 2001, 2003). Pentru a valida modelele lipozomale în vederea utilizării lor pentru predicții asupra fenomenului de opsonizare am comparat rezultatele simulărilor V1, V2, V3, V4 și respectiv V5 cu tipul de comportament observat experimental descris mai sus.

Rezultatele simulărilor sunt prezentate în figura 1 în care sunt expuse conformațiile pe care le adoptă spontan amestecurile de lipide în fază apoasă în funcție de concentrațiile relative ale lipidelor pegilate (simulările V3, V4 și V5).

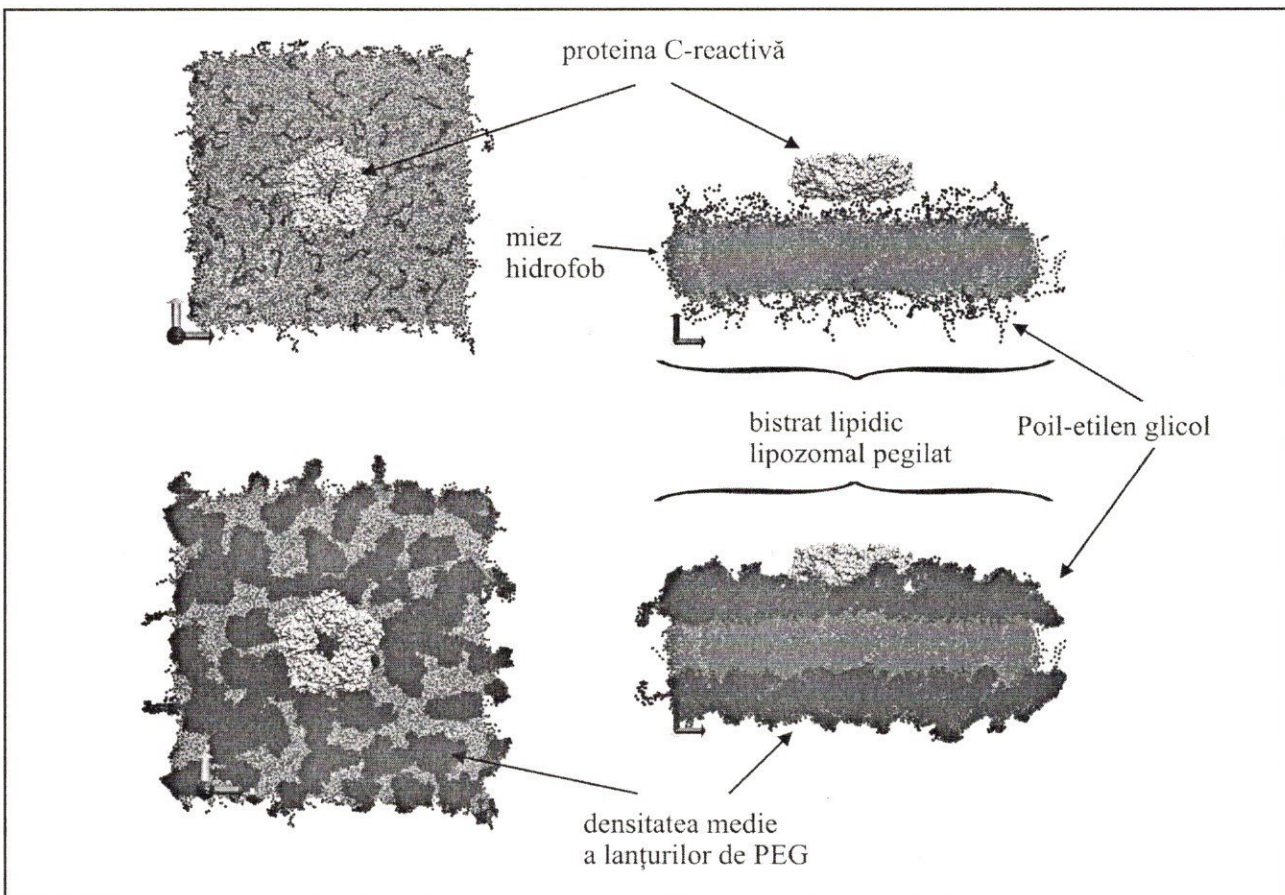
Simulările V1 și V2 surprind autosigilarea spontană a unor membrane bistratificate fosfolipidice de POPC plane cu formarea în final de lipozomi unilamelari mici, rezultate în acord cu faptele stabilite experimental pentru această situație (Joannic, 1997). Rezultă faptul că modelul ales, parametrii și metodologia de simulare folosită este adecvată pentru studiul lipozomilor clasici transportori de substanțe active.

Pentru amestecurile de lipide nepegilate (POPC) cu lipide pegilate (PE-PEG) simulările prezic formarea de lipozomi la concentrații de 4,7%mol PE-PEG (simularea V4), formarea de suspensii ce conțin atât micelii sferice cât și micelii discoidale (bicelii) pentru o concentrație de 9,09%mol PE-PEG (V3) și respectiv suspensii ce conțin cu precădere micelii sferice în prezența câtorva micelii discoidale de dimensiune foarte mică (apropiată de cea a miceliilor sferice) pentru o concentrație de 22,85%mol PE-PEG (simularea V5).

Se observă deci că modelul utilizat pentru descrierea lipozomilor stabilizați steric (lipozomi SSL) este capabil să reproducă comportamentul observat experimental pentru clasa de lipide „funcționalizate” cu PEG, ceea ce validează modelul în vederea utilizării acestuia pentru predicția comportamentului lipozomilor pegilați transportori de medicamente.



**Fig. 1** Rezultatele simulărilor de validare a modelelor lipozomale. În figură sunt reprezentate configurațiile inițiale și respectiv finale ale sistemelor studiate (moleculele de apă nu sunt reprezentate pentru simplitate)



**Fig. 2** Reprezentarea unei configurații instantanee a unui strat fosfolipidic acoperit cu PEG (sus) și a densității mediate în timp (pentru o perioadă de 4,5 ns) a lanțurilor polimerice de PEG (jos) care acoperă acest strat. În figură este reprezentată și proteina C-reactivă (opsonină serică) pentru o apreciere directă a modului de interacțiune cu suprafața lipozomală.

Analiza datelor furnizate de simulări oferă o explicație pentru acest comportament. Astfel, vizualizarea cu ajutorul unor programe specializate (Visual Molecular Dynamics – VMD, Humphrey, 1996) a traiectoriilor rezultate în urma simulărilor de dinamică moleculară și care redau evoluția în timp a sistemelor modelate, relevă faptul că la concentrații mari de PE-PEG (> 10%mol) straturile moleculare de polietylenglicol exercită repulsii sterice unele față de altele astfel încât ansamblurile moleculare individuale de lipide nu pot fuziona pentru a forma structuri moleculare plane extinse care să se autosigileze sub formă de lipozomi stabilizați steric.

Totodată simulările prezentate aici relevă un aspect interesant care va trebui luat în considerare atunci când vom analiza interacțiunea dintre proteinele plasmactice și suprafețele lipozomale acoperite cu PEG. Astfel, din analiza dinamicii sistemelor analizate am observat o flexibilitate mare și o mișcare relativ rapidă a lanțurilor polimerice ancorate pe suprafețele lipidice astfel încât moleculele proteice vor interacționa (vor „sesiza”) de fapt cu o densitate mediată în timp a lanțurilor polimerice și nu cu configurații instantanee ale lanțurilor polimerice. Acest aspect este evidențiat în figura 2 care prezintă rezultatele unei simulări de durată 4,5 ns efectuată special în acest scop asupra unui bistrat lipidic pegilat (concentrația PE-PEG550 ≈ 4%mol). Se observă diferența dintre o configurație

instantanee a lanțurilor polimerice și configurația mediată pe parcursul întregii durate a simulării, astfel încât moleculelor proteice serice le va fi accesibilă o proporție mult mai mică din aria suprafeței bistratului pegilat.

## Concluzii

Studiul de față a avut ca scop evaluarea unor modele moleculare lipozomale în vederea validării lor pentru studiul direct al interacțiunii acestora cu suprafețele lipozomale clasice și stabilizate steric cu opsoninele plasmactice, fenomen deosebit de important ce influențează timpul mediu de circulație a acestei clase de transportori. Modelele utilizate pentru descrierea lipozomilor s-au dovedit a reproduce corect comportamentul observat pe cale experimentală pentru clasele de lipide care formează lipozomii, ceea ce validează parametrii aleși pentru simulare în vederea utilizării lor în analiza interacției lipozomi-opsonine.

Totodată se stabilește o metodologie de lucru utilă pentru studii mai largi prin modelare moleculară privind designul și optimizarea acestei clase de transportori nanoparticulați în vederea prelungirii timpului de circulație și ameliorării biocompatibilității, factori determinanți în obținerea unor beneficii terapeutice crescute.

## BIBLIOGRAFIE

1. BCC, Inc., 25 Van Zant St., Norwalk, CT 06855, USA. Phone: (203) 853-4266, <http://www.bccresearch.com/bio-tech/B162.html>
2. **Berendsen H. J. C., van der Spoel D., van Drunen R.** (1995) – GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation, *Comp. Phys. Comm.*, 91:43 – 56
3. **DeLano W.L.** (2005) The Case for Open-Source Software in Drug Discovery, *Drug Discovery Today*, 10, 213-217
4. **Frenkel D., Smit B.** (2002) – Chapter 17. Dissipative Particle Dynamics, in *Understanding Molecular Simulation*, Academic Press San Diego, p.465-476
5. **Gibson G. B., Chen Ke., Chynoweth S.** (1998) – Simulation of particle adsorption onto a polymer-coated surface using the dissipative particle dynamics method, *J. Colloid and Interface Science*, 206:464-474
6. **Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K.** (1996) “VMD - Visual Molecular Dynamics”, *J. Molec. Graphics*, 14:33-38
7. **Jeon S. L., Lee J. H., Andrade J. D., De Gennes P. G.** (1991) – Protein-surface interactions in the presence of Polyethyleneoxid, *J. Colloid InterfaceSci.*, 142:149-166
8. **Joannic, R., L. Auvray, and D. D. Lasic.** (1997) Monodisperse vesicles stabilized by grafted polymers. *Phys. Rev. Lett.* 78:3402-3405
9. **Johnsson M., Edwards K.** (2001) – Phase behavior and aggregate structure in mixtures of dioleoylphosphatidylethanolamine and poly(ethylene glycol) lipids, *Biophys. J.*, 80:313-323
10. **Johnsson M., Edwards K.** (2003) – Liposomes, disks and spherical micelles: aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethylene glycol) phospholipids, *Biophys. J.*, 85:3839-3847
11. **Lam Y. M., Wood G. G.** (2003) – Mesoscale simulation of block copolymers in aqueous solution: parametrisation, micelle growth kinetics and the effect of temperature and concentration morphology, *Polymer*, 44:3593-3605
12. **Lam Y. M., Wood G. G., Boothroyd C.** (2004) – Mesoscale simulation and cryo-TEM of nanoscale drug delivery systems, *Molecular Simulation*, 30:239-247
13. **Leach A. R.** (2001)– *Molecular Modelling: Principles and Applications*, Pearson Education Limited England, p.353-410
14. **Marrink S. J., de Vries A. H., Mark A. E.** (2004) – Coarse grained model for semiquantitative lipid simulation, *J. Phys. Chem B*, 108:750-760
15. **Marrink S. J., Lindahl E., Edholm O., Mark A.E.** (2001a) *J. Am. Chem. Sci.*, 123:8638
16. **Marrink S. J., Mark A. E.** (2001b) *J. Phys. Chem. B*, 105:6122
17. **Marrink S. J., Mark A. E.** (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, 125:11144
18. **Neamțu A., Mungiu O. C., Neamțu Monica** (2005) – *Sisteme Terapeutice și Biomateriale-de la concepere la utilizare*, Ed. „Gr. T. Popa” U.M.F. Iași
19. **Palmer B. J., Liu J.** (1996) – Simulations of micelle self-assembly in surfactant solutions, *Langmuir*, 12:746-753
20. **Papisov M.** (1998) – Theoretical considerations of RES-avoiding liposomes: molecular mechanics and chemistry of liposome interactions, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 32:119-138
21. **Rex S., Zuckermann M. J., Lafleur M., Silviu J. R.** (1998) – Experimental and Monte Carlo simulation studies of the thermodynamics of polyethyleneglicol chains grafted to lipid bilayers, *Biophys. J.*, 75:2900-2914
22. **Smit B., Hilbers P. A. J., Esselink K., Rupert L. A. M., Van Os N. M., Schlijper A. G.** (1990) – Computer simulations of a water/oil interface in the presence of micelles, *Nature*, 384:624
23. **Smit B., Esselink K., Hilbers P. A. J., Van Os N. M., Rupert L. A. M., Szleifer I.** (1993) – Computer simulations of surfactant self-assembly, *Langmuir*, 9:9-11
24. **Von Gottberg F. K., Smith K. A., Hatton T. A.** (1997) – *J. Chem Phys.*, 106:9850