

## As Múltiplas Contribuições para a Complexação Proteína-Ligante: Consequências em *Drug Design*

Guimarães, C. R. W.

*Rev. Virtual Quim.*, 2012, 4 (4), 348-364. Data de publicação na Web: 18 de julho de 2012

<http://www.uff.br/rvq>

### The Many Contributions to Protein-Ligand Binding: Implications in Drug Design

**Abstract:** The protein-ligand binding event is exceedingly complex with several contributions playing important roles in determining the affinities of compounds against biological targets. The net binding free energy is a fine balance between contributions that oppose binding, such as individual ligand and protein penalty terms (interactions lost with the solvent, strain, and also entropy losses), and those that favor it like protein-ligand intermolecular interactions and the release of waters from binding sites. Here, some of the most important contributions to Protein-Ligand binding are analyzed. Deep knowledge of those contributions is of fundamental importance in Medicinal Chemistry since it can enhance drug design effectiveness, enabling the generation of compounds with improved potency and desirable properties.

**Keywords:** Protein-ligand binding; enthalpic contributions; entropic contributions; intermolecular interactions.

### Resumo

O processo de complexação proteína-ligante é extremamente complicado e no qual diversas contribuições desempenham papel crucial na afinidade entre moléculas pequenas e seus alvos biológicos. A energia livre de complexação é resultado de um balanço sensível entre contribuições que se opõem à complexação, como termos de penalidade para o ligante e a proteína (perda de interações com o solvente, deformação intramolecular e perdas entrópicas), e as que a favorecem como interações intermoleculares proteína-ligante e a liberação de águas do sítio ativo. Neste artigo, algumas das contribuições mais importantes para a complexação são dissecadas. O conhecimento profundo delas é de fundamental importância em Química Medicinal já que permite uma maior eficiência em ciclos de otimização de compostos líderes, acarretando na geração de análogos com maior afinidade e propriedades desejáveis.

**Palavras-chave:** Complexação proteína-ligante; contribuições entálpicas; contribuições entrópicas; interações intermoleculares.

\* Pfizer Global Research & Development, Worldwide Medicinal Chemistry Department, 620 Memorial Drive, Cambridge, MA, USA.

✉ [cristiano.guimaraes@pfizer.com](mailto:cristiano.guimaraes@pfizer.com)

DOI: [10.5935/1984-6835.20120027](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120027)

## As Múltiplas Contribuições para a Complexação Proteína-Ligante: Consequências em *Drug Design*

Cristiano R. W. Guimarães

Pfizer Global Research & Development, Worldwide Medicinal Chemistry Department, 620 Memorial Drive,  
Cambridge, MA, USA.

\* [cristiano.guimaraes@pfizer.com](mailto:cristiano.guimaraes@pfizer.com)

*Recebido em 28 de junho de 2012. Aceito para publicação em 12 de julho de 2012*

1. Introdução
2. O efeito hidrofóbico ( $\Delta G_w$ )
3. Perdas entálpicas e entrópicas do ligante ( $\Delta H_{intra}^{lig}$ ,  $\Delta S_{conf}^{lig}$ , e  $\Delta S_{tor}^{lig}$ )
4. Interações intermoleculares ( $\Delta H_{inter}^{ptn-lig}$ )
  - 4.1. Ligações hidrogênio e pontes salinas
  - 4.2. Ligações halogênio
  - 4.3. Interações  $\pi$ - $\pi$
  - 4.4. Interações cátion- $\pi$
  - 4.5. Interações hidrofóbicas
5. eIF4E e análogos de m7GTP – Um exemplo do papel de diferentes contribuições na complexação Proteína-Ligante
6. Considerações finais

### 1. Introdução

O processo de complexação proteína-ligante (Figura 1) é extremamente complicado no qual diversas contribuições desempenham papel determinante na afinidade entre moléculas pequenas e seus alvos biológicos. A energia livre de

complexação ( $\Delta G_{bind}$ ) é resultado de um balanço sensível entre contribuições que se opõem à complexação e aquelas que a favorecem (Tabela 1). O conhecimento profundo destes efeitos é de fundamental importância na Química Medicinal já que permite ganhos em eficiência em ciclos de otimização de compostos líderes.



**Figura 1.** O processo de complexação proteína-ligante e a energia livre associada ( $\Delta G_{bind}$ )

A Tabela 1 resume os efeitos em jogo durante a complexação e organiza os que estão a seu favor em correspondência com os que a opõem. Do ponto de vista exclusivo do solvente, há um ganho entrópico e entálpico quando as moléculas de água ao redor do ligante e no sítio ativo da proteína são liberadas para se difundirem em solução e interagirem otimamente entre si. Estes ganhos são opostos por uma perda entálpica relacionada à perda de interações ligante-solvente e proteína-solvente. O próximo par de efeitos corresponde a perdas entrópicas translacionais e rotacionais do ligante e proteína ao se

complexarem que são atenuadas em parte pela entropia residual vibracional ganha no complexo. Finalmente, o ganho entálpico proveniente das interações intermoleculares proteína-ligante, talvez o efeito mais importante para afinidade e especificidade, é oposto pelas perdas entrópicas conformacionais, torcionais e vibracionais do ligante e proteína, além da perda entálpica relacionada a suas deformações no complexo. Eq 1 organiza as contribuições entálpicas e entrópicas para o processo de complexação descritas na Tabela 1 em azul (a favor) e vermelho (opostas).

**Tabela 1.** Contribuições entálpicas e entrópicas que favorecem e opõem a complexação proteína-ligante.

A favor	Opostas
Ganhos entrópico e entálpico do solvente devido ao efeito hidrofóbico ( $\Delta G_w$ )	Perda das interações ligante-solvente e proteína-solvente ( $\Delta H_{desolv}^{lig}, \Delta H_{desolv}^{ptn}$ )
Entropia residual no complexo proteína-ligante ( $\Delta S_{vib}^{ptn-lig}$ )	Perdas entrópicas translacionais e rotacionais para ligante e proteína ( $\Delta S_{trans}^{lig}, \Delta S_{rot}^{lig}, \Delta S_{trans}^{ptn}, \Delta S_{rot}^{ptn}$ )
Interações intermoléculas entre ligante e proteína ( $\Delta H_{inter}^{ptn-lig}$ )	Perda entálpica relacionada à deformação do ligante e da proteína no complexo ( $\Delta H_{intra}^{lig}, \Delta H_{intra}^{ptn}$ )
	Perdas entrópicas conformacionais, torcionais e vibracionais para ligante e proteína ( $\Delta S_{conf}^{lig}, \Delta S_{tor}^{lig}, \Delta S_{vib}^{lig}, \Delta S_{conf}^{ptn}, \Delta S_{tor}^{ptn}, \Delta S_{vib}^{ptn}$ )

$$\Delta G_{bind} = (\Delta G_w + \Delta H_{desolv}^{lig} + \Delta H_{desolv}^{ptn}) + (-T\Delta S_{vib}^{ptn-lig} - T\Delta S_{trans}^{lig} - T\Delta S_{rot}^{lig} - T\Delta S_{trans}^{ptn} - T\Delta S_{rot}^{ptn}) + (\Delta H_{inter}^{ptn-lig} + \Delta H_{intra}^{lig} + \Delta H_{intra}^{ptn} - T\Delta S_{conf}^{lig} - T\Delta S_{tor}^{lig} - T\Delta S_{vib}^{lig} - T\Delta S_{conf}^{ptn} - T\Delta S_{tor}^{ptn} - T\Delta S_{vib}^{ptn}) \quad (1)$$

A intenção das próximas subseções não é analisar todas as contribuições descritas acima, mas sim aquelas sobre as quais o Químico Medicinal possui maior controle e compreensão. Por exemplo, contribuições relacionadas exclusivamente à proteína, sejam elas entálpicas ou entrópicas, são difíceis de prever e estimar através de métodos computacionais já que envolvem muitos átomos (incerteza entálpica) e graus de liberdade (incerteza entrópica).

## 2. O efeito hidrofóbico ( $\Delta G_w$ )

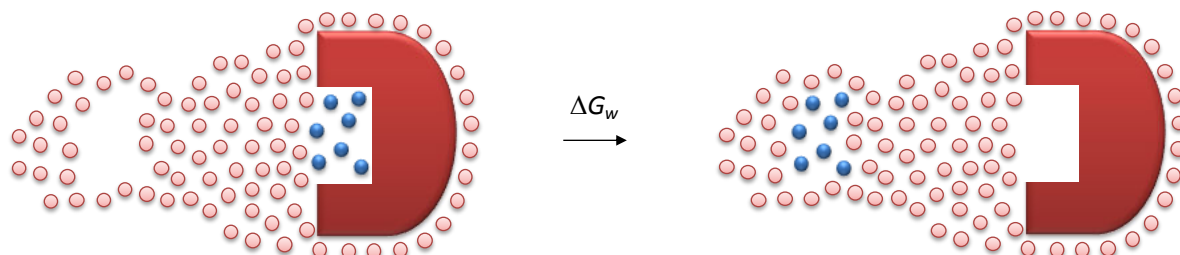
Moléculas de água desempenham um papel crucial no processo de complexação proteína-ligante. Algumas são liberadas do sítio ativo de proteínas para a cavidade existente em solução, previamente

ocupada pelo ligante, quando do processo de complexação (Figura 2). Do ponto de vista exclusivo das interações entre moléculas de água, fica claro que sítios de hidratação em cavidades dentro de proteínas (em azul na Figura 2) estão fadados a ligações hidrogênio subótimas e a um menor número de maneiras de se organizarem em relação a moléculas de água em solução. Desta forma, a liberação de águas de sítios ativos de proteína, particularmente das regiões mais hidrofóbicas, resulta em grandes ganhos entálpicos e entrópicos ( $\Delta G_w$ ) para  $\Delta G_{bind}$ . Este efeito é mais comumente conhecido como efeito hidrofóbico.  $\Delta G_w$  também é favorável quando moléculas de águas que se encontram em regiões polares de proteínas são liberadas para solução; nenhum ambiente é mais propício para moléculas de água interagirem entre si do que a solução. Porém, tal ganho é oposto por uma grande contribuição

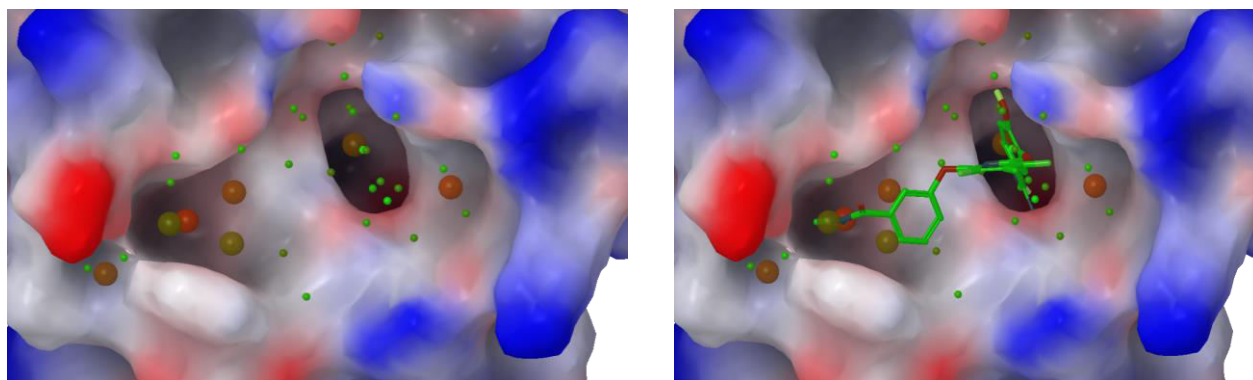
entálpica desfavorável proveniente da perda de interações proteína-solvente ( $\Delta H_{dissolv}^{pm}$ ).

Embora sítios de hidratação em proteínas sejam identificados por cristalografia de raio-X, o experimento não fornece nenhuma informação em relação a suas propriedades termodinâmicas. A habilidade de prever computacionalmente as propriedades estruturais e termodinâmicas de moléculas de água em sítios ativos de proteínas tem sido objeto de pesquisa de vários grupos.<sup>1-9</sup> Os primeiros estudos foram baseados em simulações que computam a energia-livre de complexação de moléculas de água em localizações específicas do sítio ativo.<sup>1-5</sup> O maior obstáculo era o grande número de simulações necessárias. Para resolver essa ineficiência, Michel e colaboradores desenvolveram um método chamado JAWS.<sup>7</sup> Dentre outros esforços mais recentes, vale destacar o método WaterMap de Abel e colaboradores.<sup>8</sup> Nele, os sítios de hidratação são obtidos por simulações de dinâmica molecular de moléculas de água no sítio ativo de proteínas e uma técnica de *clustering*. As propriedades estruturais e termodinâmicas dos sítios de hidratação, especificamente suas entalpias e entropias em relação a água em solução, são obtidas pelo cálculo das interações solvente-solvente e proteína-solvente

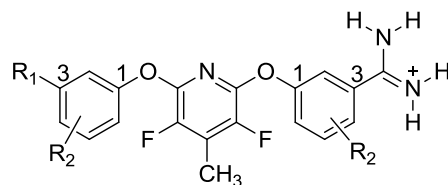
e emprego da teoria de solvatação inhomogênea, respectivamente. Desta forma, a energia livre de liberação estimada por WaterMap ( $\Delta G_{WM}$ ) quando um ligante desloca as moléculas de água do sítio ativo para a solução inclui tanto  $\Delta G_w$  quanto  $\Delta H_{dissolv}^{pm}$ . WaterMap fornece mapas como o mostrado na Figura 3 para a enzima Fator Xa. As águas mais avermelhadas e de tamanho maior estão entre as mais desfavoráveis; estes sítios de hidratação são pelo menos +2.5 kcal/mol mais desfavoráveis que água em solução. O inibidor na Figura 3 desloca quase todas essas águas ao se complexar e portanto possui o mais favorável valor  $\Delta G_{WM}$  (ponto vermelho na Figura 4). Ele é também o mais potente da série congênere na Tabela 1.<sup>10,11</sup> A extensão do cálculo WaterMap aos demais inibidores mostra que os valores  $\Delta G_{WM}$  possuem ótima correlação com os valores experimentais de inibição de atividade enzimática do Fator Xa (Figura 4), sugerindo que o efeito hidrofóbico nesse caso desempenha um papel importante na determinação da afinidade pela enzima.<sup>12</sup> Esses mapas são muito úteis no *design* de novos análogos porque permitem a identificação das águas mais desfavoráveis e com maior potencial de gerarem ganhos em afinidade quando deslocadas para a solução.



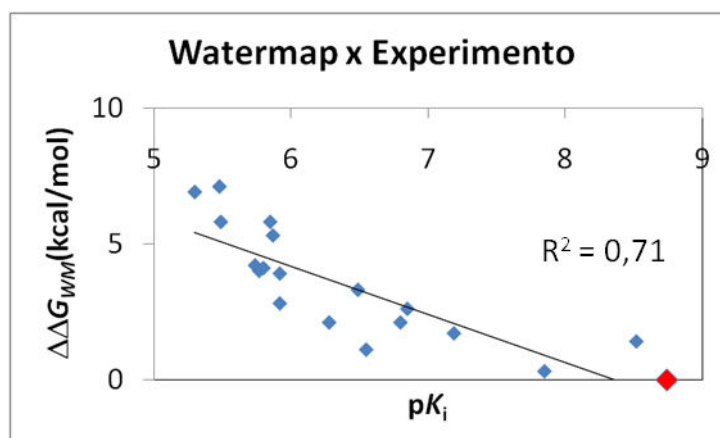
**Figura 2.** Representação esquemática da liberação de moléculas de água (em azul) do sítio ativo de uma proteína para a cavidade existente em solução, previamente ocupada pelo ligante



**Figura 3.** Mapa das águas no sítio ativo do Fator Xa gerado por WaterMap e superposição com o inibidor mais potente (Tabela 1)

**Tabela 1.** Atividade enzimática de alguns inibidores do Fator Xa

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	K <sub>i</sub> (nM) <sup>a</sup>
CONH <sub>2</sub>	H	H	280
CONHMe	H	H	1200
COMe	H	H	1400
NH <sub>2</sub>	H	H	3300
NMe <sub>2</sub>	H	H	160
NHEt	H	H	530
OMe	H	H	1350
OCF <sub>3</sub>	H	H	1800
F	H	H	3200
Cl	H	H	1700
OH	H	H	5000
CF <sub>3</sub>	H	H	1600
CONMe <sub>2</sub>	5-OMe	H	140
NMe <sub>2</sub>	2-Me	H	320
CONMe <sub>2</sub>	H	6-NH <sub>2</sub>	14
CONMe <sub>2</sub>	H	6-OH	1.8
NMe <sub>2</sub>	H	6-Me	1200
NMe <sub>2</sub>	H	6-NH <sub>2</sub>	64
NMe <sub>2</sub>	H	6-OH	3

<sup>a</sup>Ref. 10, 11.**Figura 4.** Correlação entre valores experimentais de inibição de atividade enzimática do Fator Xa e a energia livre de liberação estimada por WaterMap ( $\Delta G_{WM}$ )

### 3. Perdas entálpicas e entrópicas do ligante ( $\Delta H_{intra}^{lig}$ , $\Delta S_{conf}^{lig}$ , e $\Delta S_{tor}^{lig}$ )

Esta seção trata de algumas das contribuições para a complexação relacionadas exclusivamente ao ligante. Ela tenta quebrar certos mitos em Química

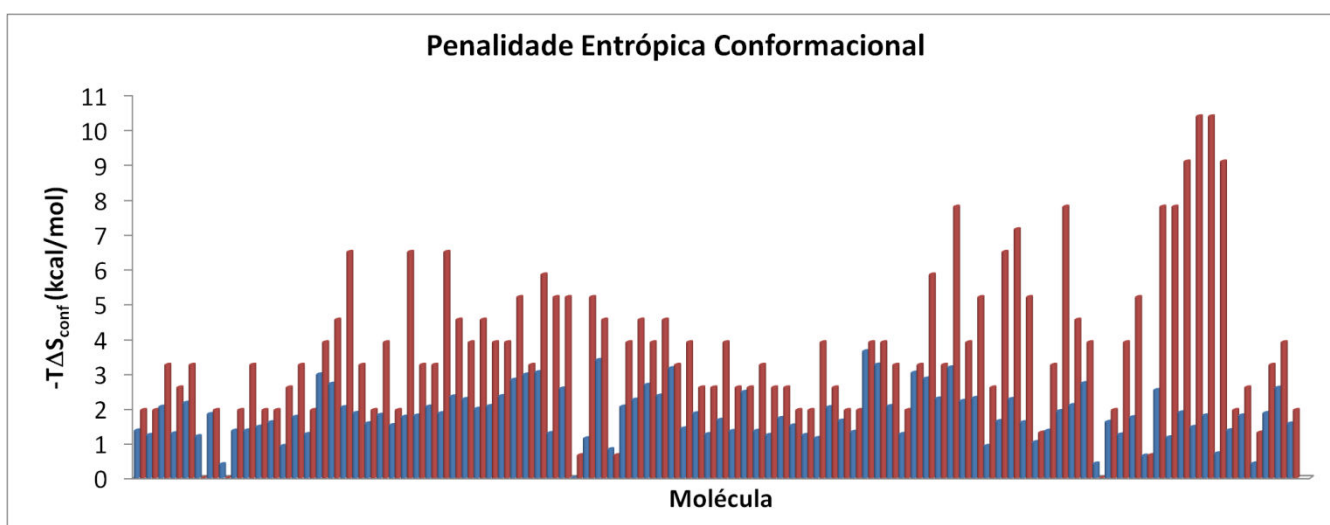
Medicinal sobre a origem de ganhos em  $\Delta G_{bind}$  quando uma molécula é “rigidificada” por meio de substituições ou ciclizações que reduzam sua flexibilidade torcional. Muitos químicos medicinais associam tais ganhos à redução da perda entrópica conformacional ( $\Delta S_{conf}^{lig}$ ). Isto pode ser atribuído a uma aproximação grosseira que tem contaminado a literatura por muito tempo.<sup>13</sup> Ela assume que cada

diedro tem 3 conformações degeneradas, o que resulta num total de  $3^N$  conformações, todas iguais em energia, para uma molécula com  $N$  diedros restritos dentro da proteína. Isto gera uma penalidade entrópica de  $0,65N$  kcal/mol. A origem deste valor pode ser demonstrada através de Eq 2 quando  $n = 3N$ ,  $k_B T = 0,592186$  kcal/mol e  $P_i = 1/3$  de acordo com a sequência em Eq 3. Esta aproximação é claramente não razoável porque, ao assumir que todas as conformações tem a mesma energia, superestima a entropia conformacional de um ligante. Isto é demonstrado pela Figura 5 que compara  $-T\Delta S_{conf}^{lig}$  estimada pela aproximação  $0,65N$  (vermelho) com a calculada de uma distribuição de Boltzmann (em azul) obtida por análise conformacional usando um campo de força e efeitos de solvente (OPLS\_2005-GB/SA). As

moléculas selecionadas para gerar a Figura 5, inibidores de Cox-2 (4), CDK2 (18), Fator Xa (13), HIV-RT (18), p38 (14), trombina (16), GSK3 (5), HIV-1 protease (6) e DHFR (6), são bem diversas conformacionalmente, com número de diedros que varia de 0 a 16.<sup>14</sup> Por exemplo, o inibidor de HIV-1 protease (PDB ID: 3AID) com 14 diedros no Esquema 1 possui  $-T\Delta S_{conf}^{lig}$  de 9,1 kcal/mol calculada pela aproximação  $0,65N$ . A obtida da distribuição de Boltzmann é de apenas 0,7 kcal/mol. Embora esta molécula seja aparentemente flexível com quase 100 conformações dentro de uma faixa de 5 kcal/mol, as probabilidades das duas conformações mais estáveis são de 73% e 14% devido a estabilização proveniente de ligação hidrogênio intramolecular.

$$-T\Delta S_{conf}^{lig} = -k_B T \sum_i^n P_i \ln P_i \quad (2)$$

$$-T\Delta S_{conf}^{lig} = -k_B T \sum_i^n P_i \ln P_i = -k_B T \sum_i^{3N} P_i \ln P_i = -k_B T 3N P_i \ln P_i = 0,65N \quad (3)$$



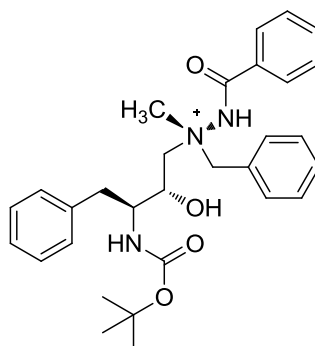
**Figura 5.** Estimativa para perda entrópica conformacional ( $-T\Delta S_{conf}^{lig}$ ) de 100 inibidores diversos conformacionalmente usando a aproximação  $0,65N$  ( $N$ , diedros do ligante restritos dentro da proteína) (barras vermelhas) e a distribuição de Boltzmann (barras azuis)

Usando a distribuição de Boltzmann para o cálculo de  $-T\Delta S_{conf}^{lig}$ , a Figura 6 mostra uma faixa de apenas 3,5 kcal/mol para os ligantes discutidos acima, que variam tremendamente em número de diedros e *scaffold*. Ela mostra ainda que a entropia conformacional não aumenta necessariamente com o número de diedros. Se isto ocorre para moléculas mais diversas quimicamente, é plausível que a redução da flexibilidade conformacional em uma série congênere leve a ganhos bem mais modestos em  $\Delta G_{bind}$ . Na verdade, observamos que a contribuição entrópica proveniente de rigidificação conformacional em uma série congênere gera tipicamente um ganho

de apenas 10 vezes na afinidade.<sup>14</sup> Por outro lado, a rigidificação conformacional leva a ganhos entálpicos bem mais significativos em  $\Delta G_{bind}$ .  $\Delta H_{intra}^{lig}$ , a perda entálpica relacionada à deformação do ligante no complexo, foi obtido pela comparação da energia intramolecular da conformação do ligante adotada no complexo e a energia média intramolecular da distribuição de Boltzmann em solução, dominada pela(s) conformação(ões) mais estáveis. Usando os mesmos 100 inibidores, a Figura 6 revela que  $\Delta H_{intra}^{lig}$  tende a ficar mais desfavorável conforme o número de diedros aumenta; a probabilidade do ligante adotar a mesma conformação em solução e na

proteína (ou pelo menos com energias semelhantes) diminui sensivelmente com o aumento da flexibilidade conformacional. Além disto, ligantes com mais diedros são mais facilmente deformados pela proteína a fim de maximizar as interações intermoleculares, o que acarreta numa penalidade entálpica adicional em  $\Delta H_{intra}^{lig}$ . É importante ressaltar que embora o ganho entálpico proveniente de rigidificação conformacional supere o ganho entrópico, a faixa de 30 kcal/mol para  $\Delta H_{intra}^{lig}$  parece

exagerada. Isto pode ser entendido pelo uso de um campo de força para o cálculo de  $\Delta H_{intra}^{lig}$ . A função de energia aproximada de campos de força são relativamente acuradas na comparação de energia entre mínimos mas tende a superestimar barreiras. Como as conformações adotadas por ligantes no sítio ativo não se encontram num mínimo na superfície de energia potencial já que são deformadas pela proteína, a perda entálpica estimada pode ser superestimada.



Esquema 1. Inibidor de HIV-1 Protease (PDB ID: 3AID)

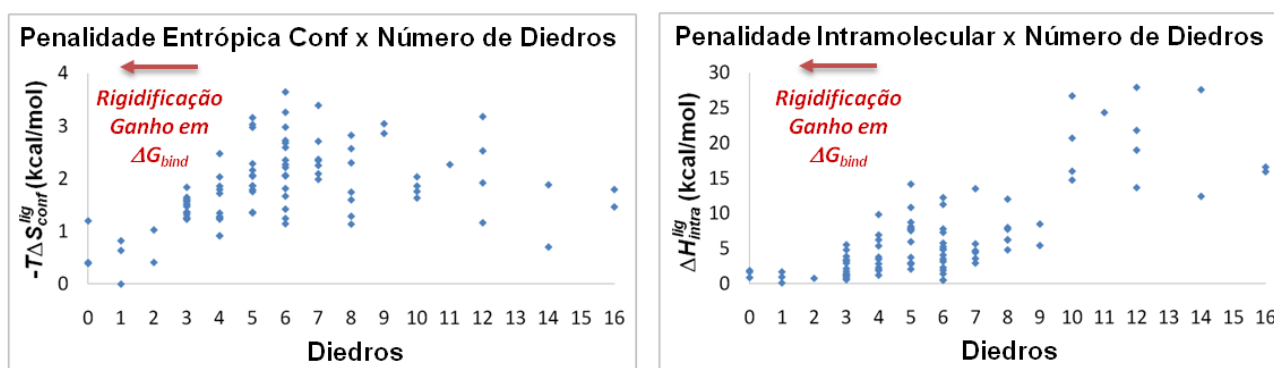


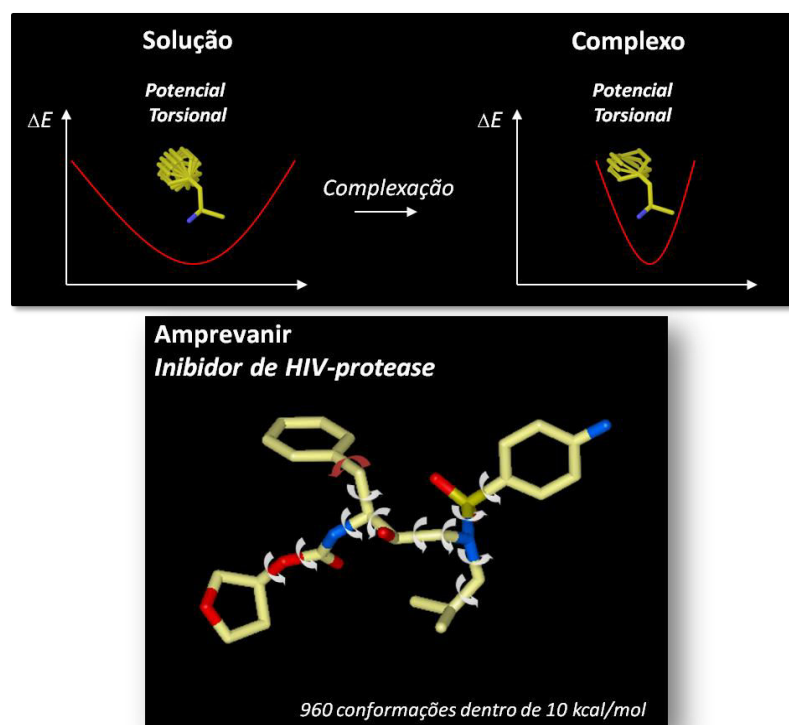
Figura 6. Perdas entálpicas ( $\Delta H_{intra}^{lig}$ ) e entrópicas ( $-T\Delta S_{conf}^{lig}$ ) para ligantes durante o processo de complexação e impacto da rigidificação conformacional na redução de tais perdas

Recentemente, Gilson e colaboradores<sup>15</sup> demonstraram que existe uma contribuição entrópica frequentemente negligenciada em Química Computacional e Medicinal mas que talvez seja a que forneça os maiores ganhos em  $\Delta G_{bind}$  quando o ligante é rigidificado conformacionalmente. Esta contribuição é associada ao estreitamento do perfil de energia potencial torcional quando o ligante é transferido da solução para a proteína ( $\Delta S_{tor}^{lig}$ ). É importante não confundir este efeito com a perda entrópica conformacional ( $\Delta S_{conf}^{lig}$ ). A última refere-se a redução do número de conformações acessíveis ao ligante quando da complexação. No caso de  $\Delta S_{tor}^{lig}$ , os diedros de um ligante perdem amplitude de rotação dentro do ambiente restrito protéico em comparação à solução e, portanto, trata-se de uma perda entrópica

vibracional. A Figura 7 usa o inibidor de HIV-1 protease Amprevanir para ilustrar esse ponto. Assumindo que Amprevanir exista em apenas uma conformação dentro da enzima, Gilson e colaboradores estimaram uma perda entrópica conformacional de apenas 1,8 kcal/mol. Apesar de a análise conformacional ter gerado 960 conformações dentro de uma faixa de energia de 10 kcal/mol, a distribuição de Boltzmann mostra que a conformação mais estável em solução tem uma probabilidade de 23%, as 6 conformações mais estáveis tem uma probabilidade combinada de 51% e as 45 mais estáveis 91%, gerando uma pequena perda conformacional quando estes valores são usados em Eq 2. Entretanto, usando o método *Mining Minima* Gilson e colaboradores estimaram uma perda

entrópica vibracional de 7 kcal/mol proveniente da restrição do movimento torcional ( $-T\Delta S_{tor}^{lig}$ ) dos diedros de Amprevenir. A Figura 7 ilustra hipoteticamente a restrição torcional para o diedro conectado ao grupo fenila (seta vermelha). Neste exemplo, as conformações adotadas em solução e na proteína são idênticas (mesmo mínimo nos perfis de energia torcional). A diferença encontra-se na amplitude do movimento torcional, menor na proteína. Esta seção ilustrou portanto que ganhos em

$\Delta G_{bind}$  quando ligantes são rigidificados conformacionalmente tem sua origem basicamente na redução da (i) penalidade entálpica  $\Delta H_{intra}^{lig}$  ao diminuir o *gap* energético entre a conformação mais estável em solução e a conformação bioativa e (ii) entrópica  $-T\Delta S_{tor}^{lig}$  por meio da restrição do movimento torcional em solução. Como mostrado acima, a redução da penalidade entrópica conformacional  $-T\Delta S_{conf}^{lig}$  desempenha papel secundário.



**Figura 7.** O inibidor de HIV-1 protease Amprevenir é usado como exemplo. Sua perda entrópica vibracional ao ser inserido no meio protéico proveniente da redução da amplitude torcional para diedros ( $-T\Delta S_{tor}^{lig} = 7$  kcal/mol) é mais relevante que a perda entrópica conformacional ( $-T\Delta S_{conf}^{lig} = 1,8$  kcal/mol)

#### 4. Interações intermoleculares ( $\Delta H_{inter}^{ptn-lig}$ )

O ganho entálpico proveniente das interações intermoleculares talvez seja o efeito mais importante para afinidade e especificidade entre ligante e proteína. Interações intermoleculares são classificadas em muitos tipos, *e.g.*, ligações hidrogênio, pontes salinas, ligações halogênio, interações  $\pi$ - $\pi$ , interações cátion- $\pi$  e interações hidrofóbicas. Estas interações são na verdade resultado de uma combinação de 3 contribuições fundamentais, eletrostática, polarização e van der Waals, com pesos diferentes para as mesmas em cada uma das interações acima

A contribuição eletrostática caracteriza-se pela interação entre distribuições de carga permanente de

moléculas, que dependem da geometria, nível de simetria, estado de protonação e composição atômica. Estas distribuições dão origem a momentos multipolos de diferentes ordens. A Figura 8 ilustra as interações monopolo-monopolo, monopolo-dipolo e dipolo-dipolo entre moléculas hipotéticas. As equações abaixo são derivadas da lei de Coulomb. Ao generalizá-las, a energia de interação eletrostática  $V$  entre duas moléculas torna-se inversamente proporcional a  $r^{n+m-1}$  onde  $n$  e  $m$  são as ordens dos seus primeiros momentos multipolos não nulos (monopolo = 1, dipolo = 2, etc.).<sup>16</sup>

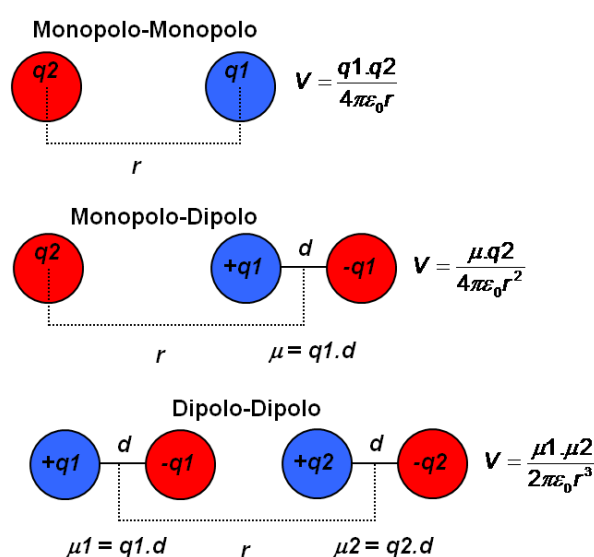
O efeito de polarização ocorre quando a distribuição de carga permanente de uma molécula é modificada por um campo elétrico externo, gerado por moléculas vizinhas (íons ou neutras com dipolos permanentes). Ao ser polarizada, a molécula passa a



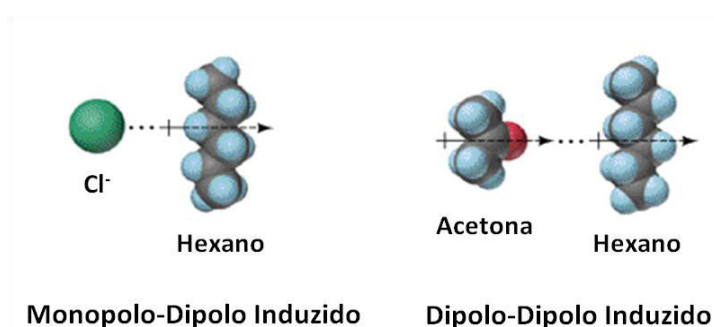
ter um momento dipolo induzido cuja magnitude depende da polarizabilidade de seus átomos e do campo elétrico.<sup>17</sup> Átomos maiores são mais polarizáveis que átomos menores porque os elétrons no primeiro caso são menos atraídos por seus núcleos. Alcanos estão entre as moléculas mais polarizáveis. A Figura 9 ilustra a polarização de uma molécula de hexano por um íon cloreto e uma molécula de acetona e a consequente interação monopolo-dipolo induzido e dipolo-dipolo induzido, respectivamente.

O último efeito, o de van der Waals, é composto por um componente repulsivo e outro atrativo, como mostrado na Figura 10. O primeiro, chamado energia

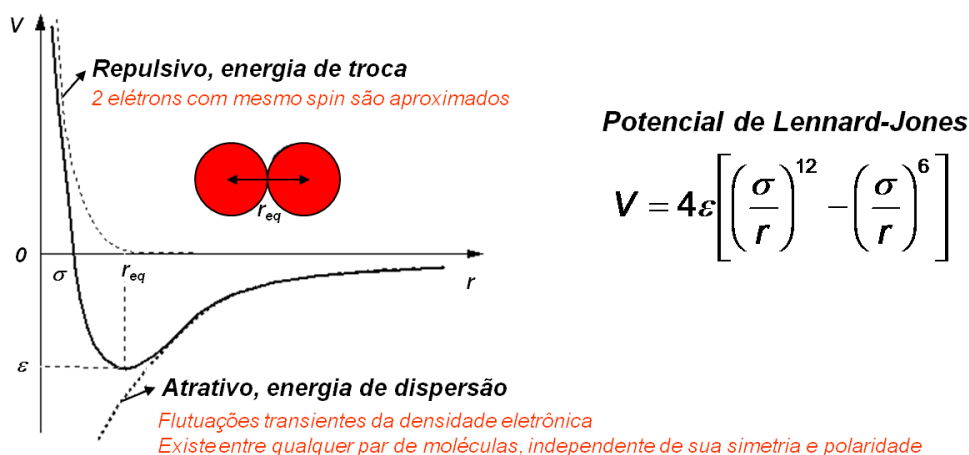
de troca ou repulsão de Pauli, entra em ação quando dois elétrons com mesmo spin aproximam-se.<sup>18</sup> O componente atrativo, chamado de energia de dispersão, tem origem nas flutuações transientes da densidade eletrônica devido a presença de uma segunda molécula e a consequente formação de dipolos instantâneos que interagem entre si.<sup>19</sup> Esta interação é operante mesmo entre moléculas não polares. O potencial de Lennard-Jones (Figura 10) descreve aproximadamente os componentes repulsivo e atrativo do efeito de van der Waals e é frequentemente usado em simulações de biomoléculas.<sup>20</sup>



**Figura 8.** As equações que calculam a energia eletrostática das interações entre dois monopolos, um monopolo e um dipolo, e entre dois dipolos



**Figura 9.** Polarização de uma molécula de hexano por distribuições de carga permanente, monopolo do íon cloreto e dipolo da acetona, e a consequente interação monopolo-dipolo induzido e dipolo-dipolo induzido, respectivamente



**Figura 10.** A representação aproximada dos componentes repulsivo (energia de troca ou repulsão de Pauli) e atrativo (energia de dispersão) da interação de van der Waals pelo potencial de Lennard-Jones

O conhecimento da força relativa dos diversos tipos de interação que podem ser estabelecidos entre proteína e ligante é fundamental em ciclos de otimização de compostos líderes. Ele leva ao *design* de análogos que possuam modificações estruturais com maior potencial de gerar ganhos em  $\Delta G_{bind}$ . Devido à complexidade e tamanho do sistema proteína-ligante, uma estratégia para obter maior compreensão sobre as diferentes interações é fazer uso de modelos simplificados que contenham subestruturas do ligante e de aminoácidos em que cálculos acurados de QM possam ser utilizados.

#### 4.1. Ligações hidrogênio e pontes salinas

Ligações hidrogênio e pontes salinas são de natureza eletrostática com um forte componente de polarização. Elas tendem a ser lineares para minimizar a repulsão entre as cargas parciais negativas ( $-\delta$ ) dos átomos eletronegativos participantes e tornam-se cada vez mais lineares quanto mais negativas forem as cargas e menor a distância entre doador (D) e aceptor (A) (Figura 11). Por isso, pontes salinas  $\text{ArgH}^+ \dots \text{Asp}^-$  e  $\text{ArgH}^+ \dots \text{Glu}^-$  são extremamente direcionais. Existem basicamente 3 tipos de ligação hidrogênio em relação à posição do próton entre A e D (Figura 11). Na normal, é energeticamente mais favorável para o próton ficar mais próximo a D. Na de pequena barreira, o próton não tem preferência entre D e A e os dois mínimos de energia são separados por uma pequena barreira. Este é o caso para o composto ilustrado na Figura 11. Na curta, o próton prefere localizar-se em uma posição quase que equidistante entre D e A, como no caso da ligação hidrogênio entre o íon fluoreto e o ácido fluorídrico (Figura 11).<sup>21</sup> As

ligações hidrogênio de pequena barreira e curta estão entre as mais favoráveis por causa das pequenas distâncias próton...D e próton...A e, portanto, maior caráter covalente entre eles. A ligação hidrogênio de pequena barreira, por exemplo, desempenha papel importantíssimo no aumento da eficiência catalítica de serina proteases através da estabilização do estado de transição devido à interação entre  $\text{HisH}^+$  e  $\text{Asp}^-$ ; ao ser protonado pelo resíduo Ser durante a catálise,  $\text{HisH}^+$  passa a ter  $\text{p}K_a$  semelhante a  $\text{Asp}^-$ .<sup>22</sup>

A Figura 12 revela a energia de interação calculada em fase gás em alto nível de teoria (LMP2/6-311G\*\*+//B3LYP/6-31G\*)<sup>23</sup> para complexos envolvendo grupos frequentemente usados em Química Medicinal. A energia de interação para os complexos neutros, onde a molécula de metanol atua como doadora de ligação hidrogênio, varia de *ca.*  $-7$  kcal/mol a  $-2$  kcal/mol. A ligação hidrogênio com o sistema  $\pi$  do benzeno vale apenas  $-1,1$  kcal/mol. Interações envolvendo espécies carregadas são bem mais favoráveis devido a contribuição eletrostática de um monopolo interagindo com um dipolo ou dois monopolos de carga oposta interagindo entre si, como no caso da ponte salina entre o grupos guanidino e carboxilato (Figura 12). Porém, existem outros efeitos que atenuam estas interações. Um deles é a blindagem das ligações hidrogênio entre o ligante e a proteína pelo solvente e resíduos vizinhos no sítio ativo. Outro é a perda das interações ligante-solvente e proteína-solvente ( $\Delta H_{desolv}^{lig}$ ,  $\Delta H_{desolv}^{ptn}$ ) em solução. Tais efeitos são particularmente pronunciados para espécies polares e carregadas. Em muitos casos, eles cancelam ou superam o ganho entálpico proveniente das ligações hidrogênio formadas entre a proteína e ligante causando perda parcial ou total de afinidade.

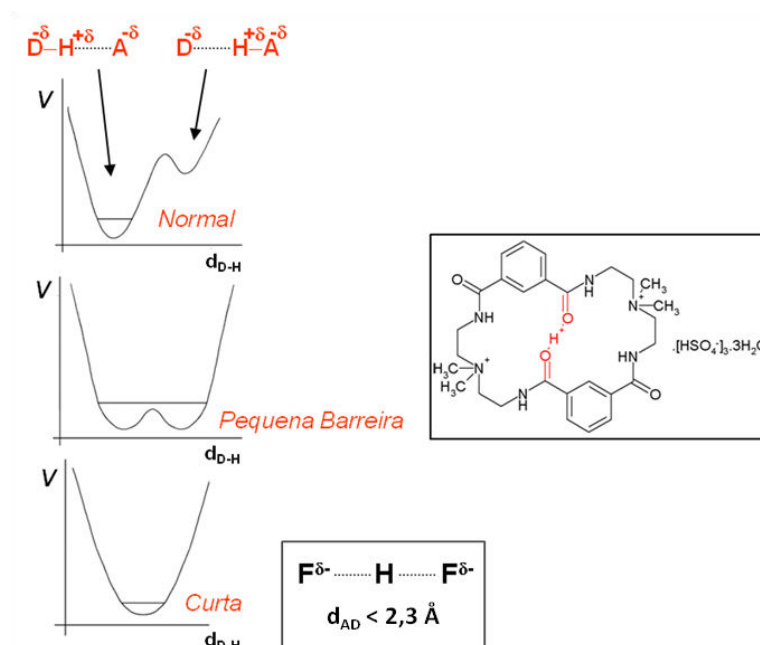


Figura 11. Perfil de energia potencial para 3 tipos de ligações hidrogênio, normal, de pequena barreira e curta

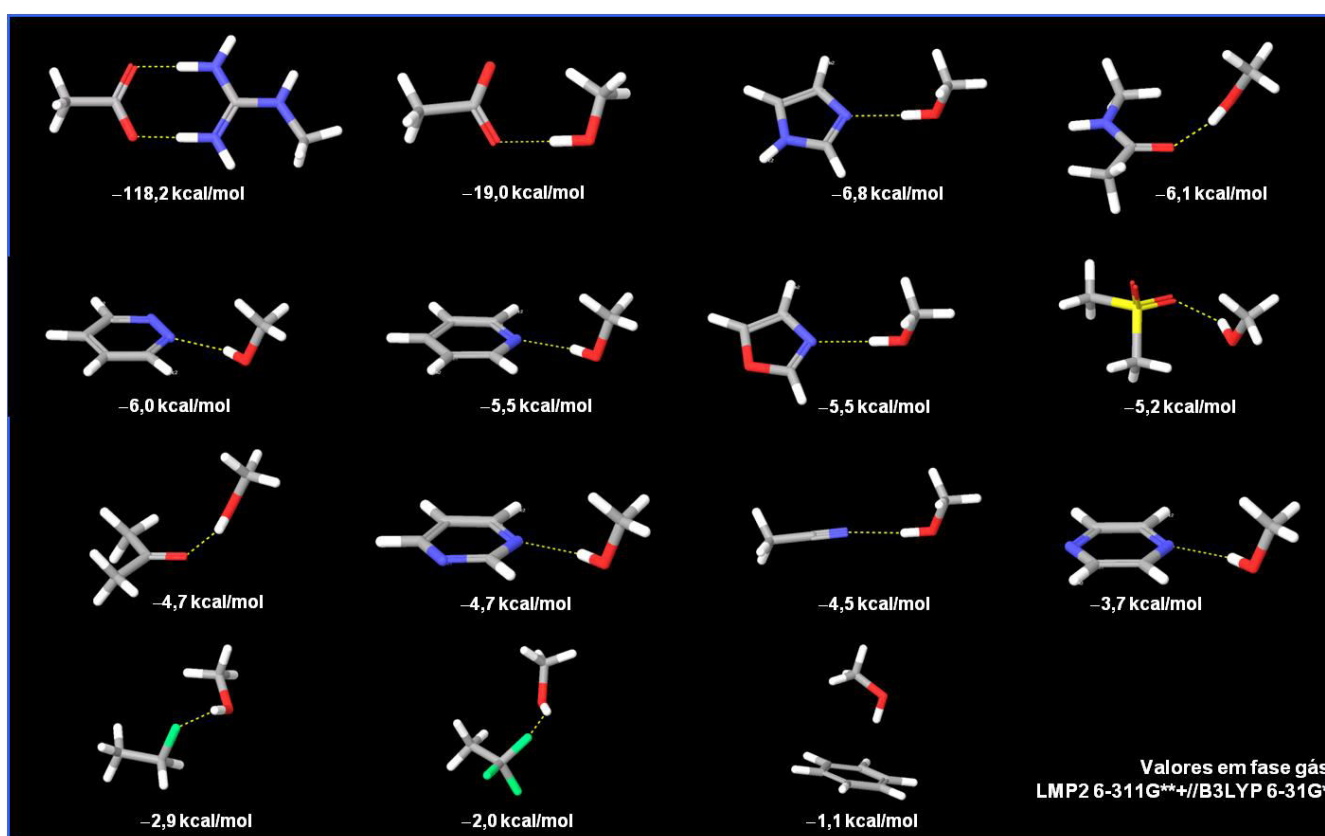


Figura 12. Energias de interação calculadas em fase gás em alto nível de teoria (LMP2/6-311G\*\*+//B3LYP/6-31G\*) para complexos envolvendo grupos frequentemente usados em Química Medicinal

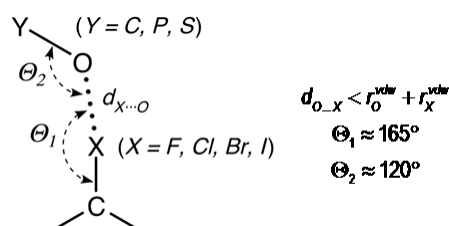
#### 4.2. Ligações halogênio

A ligação halogênio ocorre entre um átomo de halogênio e uma base de Lewis. São interações

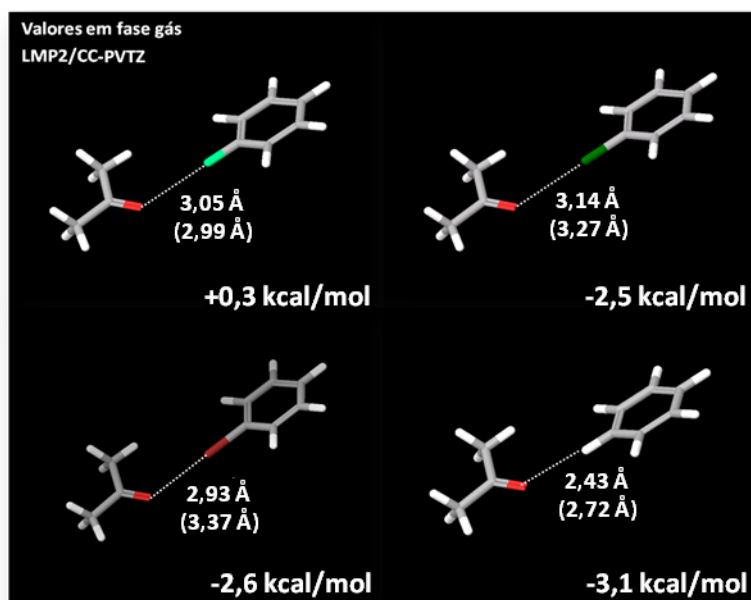
direcionais que dão origem a geometrias bem definidas, como mostrado na Figura 13. Aufinger e colaboradores demonstraram que estas interações existem em sistemas biológicos através da análise de estruturas cristalográficas.<sup>24</sup> Embora a grande maioria

destas interações ocorra entre oxigênio e um halogênio, contatos com nitrogênio e enxofre também foram observados. As ligações halogênio são dominadas por efeitos eletrostáticos, mas polarização e dispersão também são importantes. Conforme o halogênio aumenta de tamanho e, portanto, torna-se mais polarizável, menor é a influência que seu núcleo exerce nos elétrons. Desta forma, regiões de potencial eletrostático positivo aparecem no topo do halogênio, mais precisamente no lado oposto à ligação covalente com o átomo de carbono (Figura 13).<sup>25</sup> Estas interagem favoravelmente com a base de Lewis, mais comumente oxigênio. Entre os halogênios, somente interações com Cl, Br e I foram observadas em complexos proteína-ligante; o átomo de flúor é muito eletronegativo e pouco polarizável. No caso do oxigênio, as interações existem com carbonilas de *backbone* e hidroxilas e carboxilatos de cadeias laterais. As distância interatômicas entre O e

X na Figura 13 nos complexos proteína-ligante são menores que a soma dos raios de van der Waals.<sup>24</sup> A Figura 14 revela a energia de interação calculada em fase gás em alto nível de teoria (LMP2/CC-PVTZ)<sup>23</sup> para complexos entre acetona e fenilas substituídas pelos halogênios F, Cl e Br. A ligação hidrogênio com CH do benzeno é incluída para comparação. A interação com flúor é repulsiva como pode ser visto pelo valor de energia de interação e a distância entre O e F, maior que a soma dos raios de van der Waals, entre parêntesis na Figura 14. No caso de Cl e Br, as interações são atrativas mas nenhuma delas é mais favorável que a ligação hidrogênio com CH do benzeno. Por outro lado, há que se considerar que Cl e Br são mais hidrofóbicos e, portanto, podem ter sua desolvatação facilitada resultando num ganho em  $\Delta G_{bind}$  em relação a hidrogênio quando ambos os efeitos são considerados.



**Figura 13.** Geometria para ligação halogênio. A distância entre O e X (X = Cl, Br, I) é menor que some dos raios de van der Waals



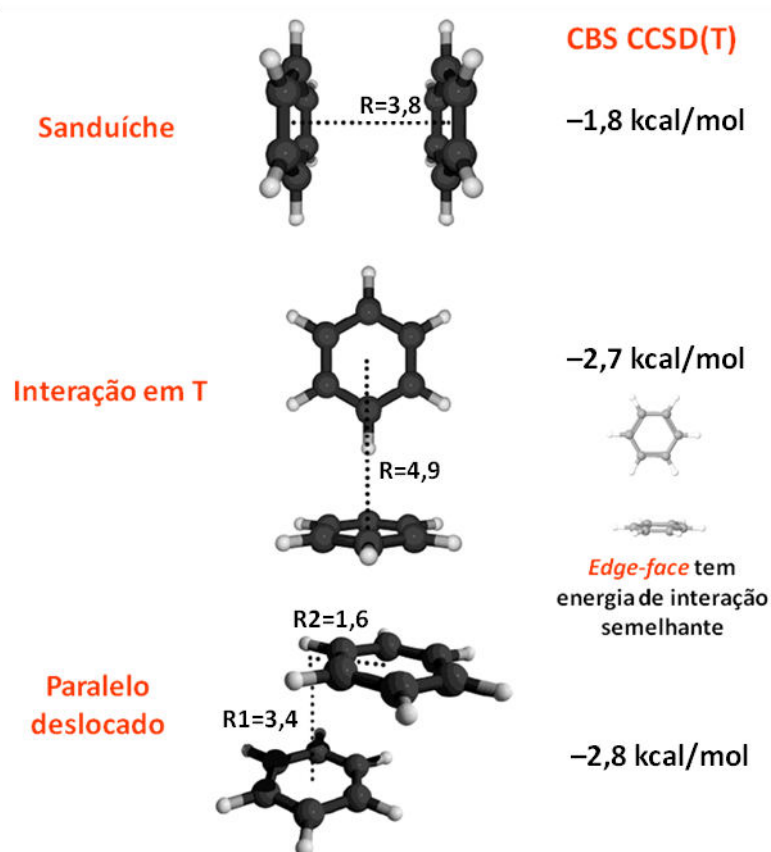
**Figura 14.** Energias de interação calculadas em fase gás em alto nível de teoria (LMP2/CC-PVTZ) para complexos entre acetona e benzeno e acetona e fenilas substituídas pelos halogênios F, Cl e Br. Os valores em parêntesis correspondem à soma dos raios de van der Waals

### 4.3. Interações $\pi$ - $\pi$

A interação  $\pi$ - $\pi$  refere-se a interação não covalente entre anéis aromáticos. Estas interações são importantes em DNA *stacking*, enovelamento de proteínas e reconhecimento molecular. O sistema prototípico para o estudo de interações  $\pi$ - $\pi$  é o dímero do benzeno. A Figura 15 mostra 3 orientações para o dímero e as respectivas energias de interação calculadas em alto nível de teoria (CBS CCSD(T)).<sup>26</sup> Embora não possua um dipolo permanente, o benzeno tem um quadrupolo bem forte; os sistemas  $\pi$  (parcialmente negativos) acima e abaixo do anel (parcialmente positivo) geram dois dipolos que se cancelam, dando origem ao quadrupolo. A contribuição eletrostática é favorável em todas as orientações, mas especialmente na interação em T devido à melhor orientação entre os quadrupolos. Porém, a contribuição dominante em todas as orientações é a de dispersão; o sistema  $\pi$  é altamente

polarizável.<sup>26</sup> Apesar disto, a contribuição de polarização é menos significativa já que quadrupolo, de menor alcance que dipolo, é o primeiro multipolo não nulo no benzeno. O efeito de substituintes doadores e retiradores de elétrons na energia de interação das diferentes orientações do dímero de benzeno pode ser encontrado na ref. 27.

McGaughey e colaboradores<sup>28</sup> conduziram uma análise de estruturas cristalográficas de proteínas para determinar as orientações preferidas para interações entre as cadeias laterais aromáticas de Phe, Tyr, His e Trp. Neste contexto, eles verificaram que a orientação mais prevalente em proteínas é a em paralelo deslocado. Cálculos quanto-mecânicos adicionais revelaram que esta orientação é de -0,5 a -1 kcal/mol mais estável que a interação em T. Em Química Medicinal, como a síntese de moléculas contendo anéis aromáticos é mais trivial do que moléculas com mais centros  $sp^3$ , interações  $\pi$ - $\pi$  são frequentemente observadas em complexos proteína-ligante no *Protein Data Bank*.<sup>29-31</sup>

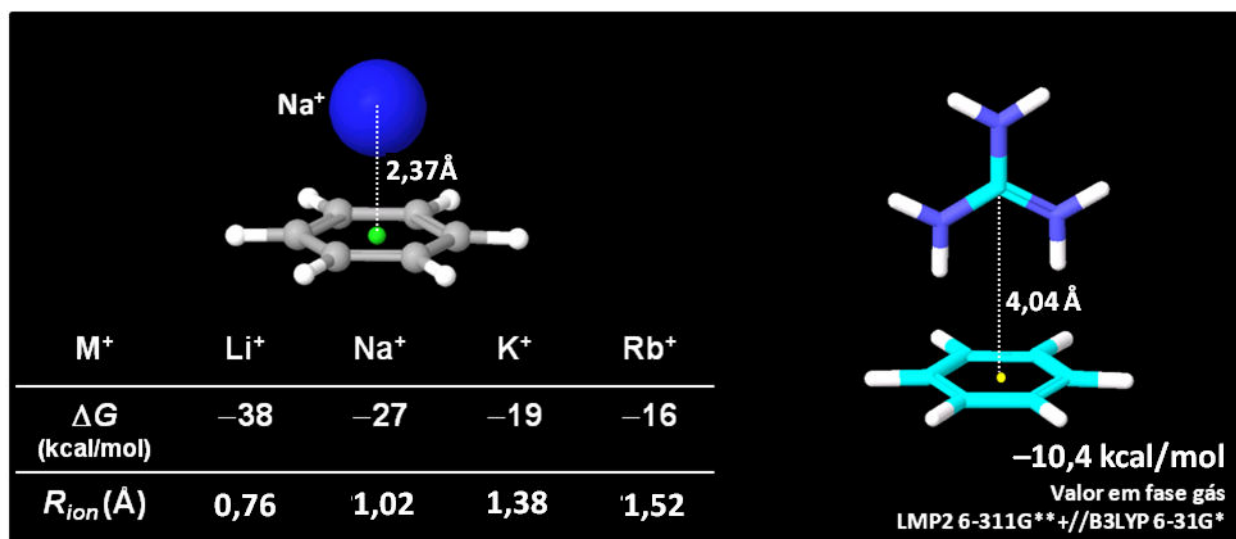


**Figura 15.** O dímero do benzeno em 3 orientações diferentes e as respectivas energias de interação em fase gás calculadas em alto nível de teoria (CBS CCSD(T))

#### 4.4. Interações cátion- $\pi$

A interação cátion- $\pi$  é uma interação não covalente entre a face de um sistema  $\pi$  rico em elétrons e um cátion adjacente, *e.g.*,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ .<sup>32</sup> A contribuição eletrostática proveniente de um monopolo (cátion) interagindo com um quadrupolo (anel aromático) domina a interação, mas é óbvio que a contribuição de polarização é significativa também por tratar-se de uma carga positiva próxima de um sistema altamente polarizável como o sistema  $\pi$ . Cálculos quanto-mecânicos para sistemas mais simples<sup>33</sup> revelam que íons menores e mais carregados positivamente possuem interações mais favoráveis (Figura 16). Interações cátion- $\pi$  são da mesma ordem de magnitude de ligações hidrogênio fortes e desempenham papel importante no reconhecimento molecular.<sup>32</sup> Cadeias laterais de

aminoácidos aromáticos são capazes de ligarem-se a espécies catiônicas como íons metálicos e cadeias laterais carregadas positivamente como Arg e Lys. No caso da complexação proteína-ligante, é preciso ter cuidado com a grande penalidade de desolvatação se o ligante for a espécie catiônica da interação já que aminoácidos como Trp, Tyr e Phe encontram-se geralmente no seio de proteínas. Potencial para sucesso é maior se o ligante, com um sistema  $\pi$  rico em elétrons, agir como “ceptor” da interação cátion- $\pi$  de resíduos como Arg e Lys (ou His protonada), e que os mesmos não estejam na superfície da proteína onde a solvatação é mais pronunciada. A energia de interação para o complexo entre guanidido e benzeno na orientação T calculada em fase gás usando alto nível de teoria (LMP2/6-311G\*\*+//B3LYP/6-31G\*)<sup>23</sup> é de  $-10,4$  kcal/mol. Essa orientação é mais estável em fase gás do que o complexo em sanduíche.<sup>34</sup>



**Figura 16.** A interação do benzeno com diferentes cátions. A energia de interação com os íons metálicos foi obtida em fase gás com o método CBS CCSD(T). No caso da interação com o guanidino, o nível de teoria LMP2/6-311G\*\*+//B3LYP/6-31G\*) foi usado

#### 4.5. Interações hidrofóbicas

A interação hidrofóbica ocorre entre grupos não polares. Ela é também chamada de interação de van der Waals já que essa contribuição domina a energia de interação; grupos não polares possuem dipolos insignificantes e, portanto, as contribuições eletrostática e de polarização são desprezíveis. A Figura 17 ilustra os dímeros de metano e neopentano e suas energias de interação (LMP2/6-311G\*\*+).<sup>23</sup> Devido à simetria, o primeiro multipolo não nulo de metano e neopentano é o octupolo. Os dímeros

abaixo, portanto, isolam a contribuição de dispersão das contribuições eletrostática e de polarização; a interação entre dois octupolos é muito fraca e de curto alcance. Embora as interações hidrofóbicas sejam relativamente fracas comparadas às descritas acima, elas acabam tendo grande relevância no processo de complexação já que os sítios ativos de proteínas e ligantes são compostos em sua maioria por grupos hidrofóbicos. Por exemplo, a energia de interação do dímero de neopentano é *ca.*  $-0,6$  kcal/mol mais favorável que a do dímero de metano devido à presença de mais átomos de carbono na interação.

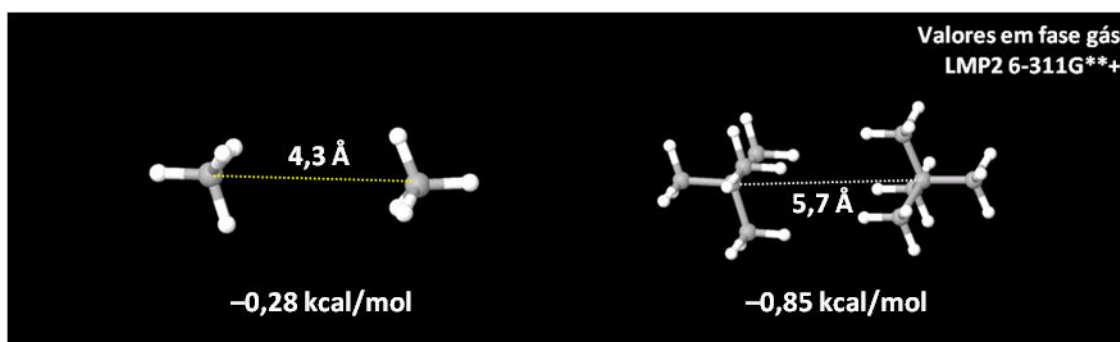
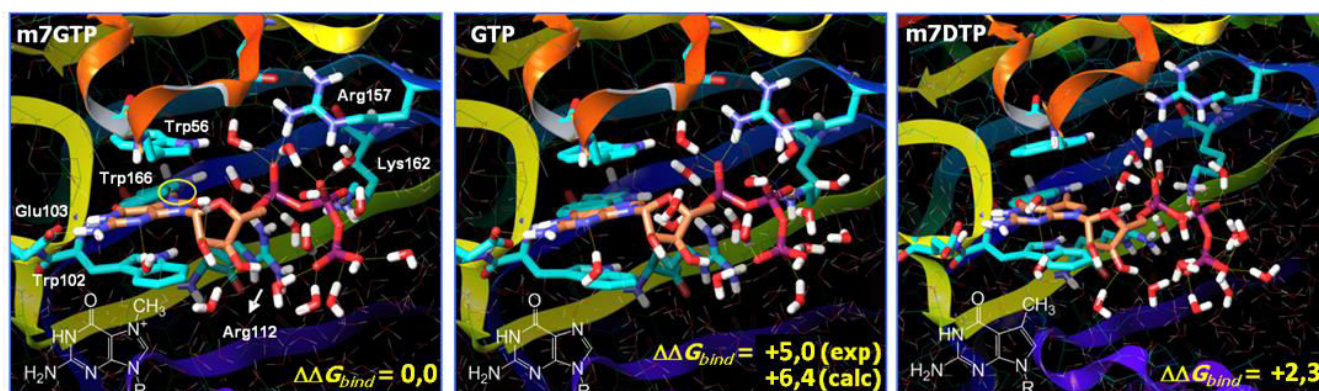


Figura 17. Os dímeros de metano e neopentano e suas energias de interação em fase gás (LMP2/6-311G\*\*+)

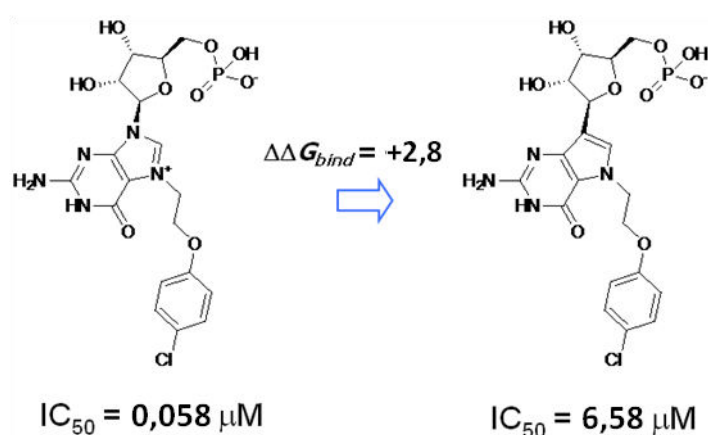
## 5. eIF4E e análogos de m7GTP – Um exemplo do papel de diferentes contribuições na complexação Proteína-Ligante

A iniciação da tradução de mRNA requer a interação direta entre a estrutura terminal do mRNA (m7GTP-X, onde X é o primeiro nucleotídeo transcrito) e o fator eucariótico de iniciação da tradução 4E (eIF4E). A desregulação da síntese proteica dependente de eIF4E é frequentemente observada em vários tipos de tumores.<sup>35</sup> Estudos biofísicos da associação entre eIF4E e vários análogos da estrutura terminal do mRNA demonstraram que m7GTP liga-se à proteína *ca.* -5 kcal/mol mais favoravelmente que o análogo não metilado, GTP (Figura 18).<sup>36</sup> Este ganho foi originalmente atribuído inteiramente às interações cátion- $\pi$  entre a carga positiva gerada pela metilação do nitrogênio da posição 7 da guanina e os anéis aromáticos de Trp56 e Trp 102. Esta interpretação motivou a realização de cálculos de perturbação de energia livre (FEP) da complexação entre eIF4E e 3 análogos, m7GTP, GTP e um terceiro análogo, m7DTP (7-deazaguanosina 5'-trifosfato).<sup>37</sup> Este terceiro análogo é mais apropriado para verificar o papel da interação cátion- $\pi$  na afinidade por eIF4E já que a única diferença em

relação a m7GTP é a troca de um átomo de nitrogênio por carbono e a consequente perda da carga positiva no anel. Os cálculos FEP revelaram que m7GTP complexa-se mais favoravelmente que m7DTP por apenas -2,3 kcal/mol. Desta forma, as interações cátion- $\pi$  com Trp56 e Trp102 fornecem um *boost* para afinidade bem mais modesto do que o originalmente atribuído para a diferença entre m7GTP e GTP. Além disso, é importante ressaltar que a diferença de -2,3 kcal/mol provavelmente inclui uma desolvatação mais favorável para m7GTP, já que a mesma tem uma carga molecular de -2 e, portanto menor que m7DTP (-3 e); a solvatação de espécies iônicas é proporcional ao quadrado da carga molecular.<sup>38</sup> Os cálculos FEP entre m7GTP e GTP sugerem que a diferença entre eles é na verdade resultado de 3 outras contribuições além da interação cátion- $\pi$ ; a metila em m7GTP (i) interage favoravelmente com Trp166 através de interações hidrofóbicas, (ii) elimina a penalidade de desolvatação do nitrogênio na posição 7 e, como dito anteriormente, (iii) reduz a carga molecular de -3 e para -2 e, o que facilita ainda mais a desolvatação de m7GTP. Este resultado motivou a síntese dos 2 inibidores de eIF4E mostrados na Figura 19. Dados experimentais de inibição de eIF4E mostram que o inibidor com a carga positiva no anel guanina é 113 vezes (-2,8 kcal/mol) mais potente que o análogo com o anel neutro, em acordo com a predição para a diferença entre m7GTP e m7DTP.



**Figura 18.** Estruturas extraídas das simulações de energia livre ilustrando os complexos entre eIF4E e m<sup>7</sup>GTP, GTP e m<sup>7</sup>DTP



**Figura 19.** Inibidores de eIF4E. A introdução da carga positiva no anel guanina fornece um ganho de -2,8 kcal/mol (interações cátion- $\pi$  e desolvatação mais favorável para o composto à esquerda)

## 6. Considerações finais

Este trabalho pretendeu detalhar as diversas contribuições para o processo de complexação proteína-ligante, salientando principalmente as contribuições sobre as quais o Químico Medicinal possui maior controle e compreensão, *e.g.*, deformação intramolecular, perdas entrópicas e desolvatação do ligante, o efeito hidrofóbico, e as interações intermoleculares proteína-ligante. O conhecimento profundo destas contribuições e a utilização de métodos computacionais que auxiliem nas suas quantificações são essenciais em Química Medicinal. Eles permitem não só a interpretação retrospectiva de relações estrutura-atividade, mas principalmente o *design* prospectivo de análogos mais promissores em ciclos de otimização de compostos líderes. Ganhos em eficiência neste processo são altamente desejáveis já que o desenvolvimento de novos fármacos é extremamente longo e caro.

## Referências Bibliográficas

- Wade, R. C.; Mazor, M. H.; McCammon, J. A.; Quioco, F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7057. [[CrossRef](#)]
- Zhang, L.; Hermans, J. *Proteins* **1996**, *24*, 433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gilson, M. K.; Given, J. A.; Bush, B. L.; McCammon, J. A. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hamelberg, D.; McCammon, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Barillari, C.; Taylor, J.; Viner, R.; Essex, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Abel, R.; Young, T.; Farid, R.; Berne, B. J.; Friesner, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Michel, J.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 13337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



- <sup>8</sup> Beuming, T.; Farid, R.; Sherman, W. *Protein Sci.* **2009**, *18*, 1609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>9</sup> Clausen, R. P.; Naur, P.; Kristensen, A. S.; Greenwood, J. R.; Strange, M.; Brauner-Osborne, H.; Jensen, A. A.; Nielsen, A. S. T.; Geneser, U.; Ringgaard, L. M.; Nielsen, B.; Pickering, D. S.; Brehm, L.; Gajhede, M.; Krogsgaard-Larsen, P.; Kastrup, J. S. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>10</sup> Phillips, G.; Davey, D. D.; Eagen, K. A.; Koovakkat, S. K.; Liang, A.; Ng, H. P.; Pinkerton, M.; Trinh, L.; Whitlow, M.; Beatty, A. M.; Morrissey, M. M. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>11</sup> Phillips, G.; Guilford, W. J.; Buckman, B. O.; Davey, D. D.; Eagen, K. A.; Koovakkat, S.; Liang, A.; McCarrick, M.; Mohan, R.; Ng, H. P.; Pinkerton, M.; Subramanyam, B.; Ho, E.; Trinh, L.; Whitlow, M.; Wu, S.; Xu, W.; Morrissey, M. M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>12</sup> Guimaraes, C. R. W.; Mathiowetz, A. M. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>13</sup> Salaniwal, S.; Manas, E. S.; Alvarez, J. C.; Unwalla, R. *J. Proteins* **2007**, *66*, 422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>14</sup> Guimarães, C. R. W.; Cardozo, M. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>15</sup> Chang, C. A.; Chen, W.; Gilson, M. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>16</sup> Atkins, P. De Paula, J. *Atkins' Physical Chemistry*, Seventh Edition, 2002, Oxford University Press, cap. 21.
- <sup>17</sup> Rick, S. W.; Stuart, S. J. *Rev. Comp. Chem.* **2002**, *18*, 89. [[CrossRef](#)]
- <sup>18</sup> Söderhjelm, P.; Karlström, G.; Ryde, U. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 244101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>19</sup> London, F. *Trans. Faraday Soc.* **1937**, *33*, 8. [[CrossRef](#)]
- <sup>20</sup> Lennard-Jones, J. E. *Proc. R. Soc. Lond. A* **1924**, *106*, 463. [[CrossRef](#)]
- <sup>21</sup> Emsley, J. *Chem. Soc. Rev.* **1980**, *9*, 91. [[CrossRef](#)]
- <sup>22</sup> Schiøtt, B.; Iversen, B. B.; Madsen, G. K. H.; Larsen, F. K.; Bruice, T. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>23</sup> Jaguar, version 7.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011.
- <sup>24</sup> Auffinger, P.; Hays, F. A.; Westhof, E.; Ho, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>25</sup> Lommerse, J. P. M.; Stone, A. J.; Taylor, R.; Allen, F. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3108. [[CrossRef](#)]
- <sup>26</sup> Sinnokrot, M. O. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>27</sup> Sinnokrot, M. O. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>28</sup> McGaughey, G. B.; Gagne, M.; Rappe, A. K. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>29</sup> Boehr, D. D.; Farley, A. R.; Wright, G. D.; Cox, J. R. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>30</sup> Sanders, J. M. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 9205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>31</sup> Di Fenza, A.; Heine, A.; Koert, U.; Klebe, G. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>32</sup> Ma, J. C.; Dougherty, D. A. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303. [[CrossRef](#)]
- <sup>33</sup> Amicangelo, J. C.; Armentrout, P. B. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 11420. [[CrossRef](#)]
- <sup>34</sup> Cabaleiro-Lago, E. M.; Rodríguez-Otero, J.; Peña-Gallego, Á. *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*, 214301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>35</sup> Gingras, A. -C.; Raught, B.; Sonenberg, N. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>36</sup> Niedzwiecka, A.; Marcotrigiano, J.; Stepinski, J.; Jankowska-Anyszka, M.; Wyslouch-Cieszynska, A.; Dadlez, M.; Gingras, A. -C.; Mak, P.; Darzynkiewicz, E.; Sonenberg, N.; Burley, S. K.; Stolarski, R. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 615. [[CrossRef](#)]
- <sup>37</sup> Guimarães, C. R. W.; Kopecky, D. J.; Mihalic, J.; Shen, S.; Jeffries, S.; Thibault, S. T.; Chen, X.; Walker, N.; Cardozo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>38</sup> Born, M. *Zeitschrift fur Physik* **1920**, *1*, 45. [[CrossRef](#)]