

VHH抗体の構造と 熱安定性のモデリング

埼玉大学工学部情報工学科

松永康佑

ymatsunaga@mail.saitama-u.ac.jp

計算メディカルサイエンス ワークショップ2021

オンライン(Zoom) 2021年9月6日



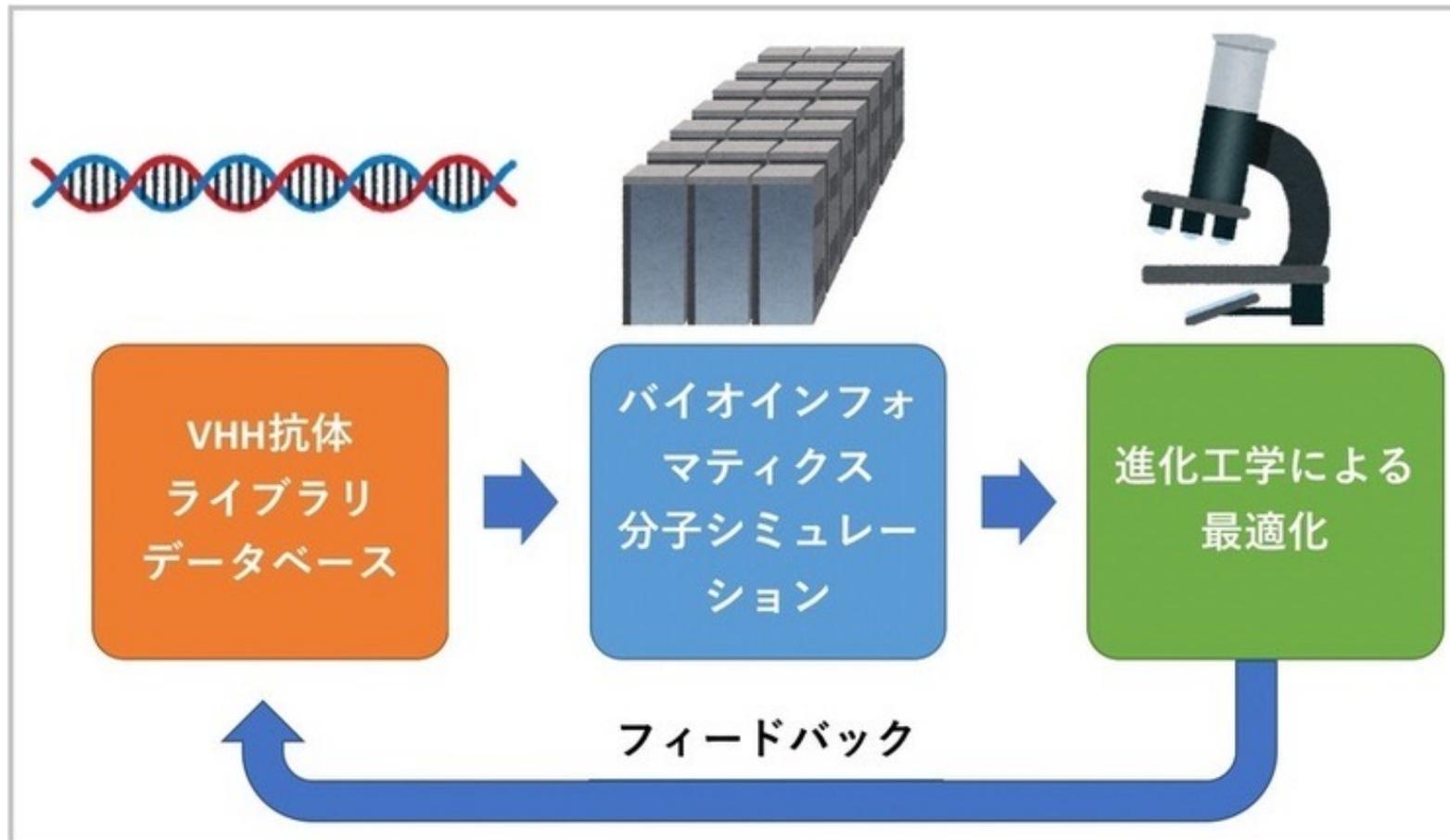
省略

省略

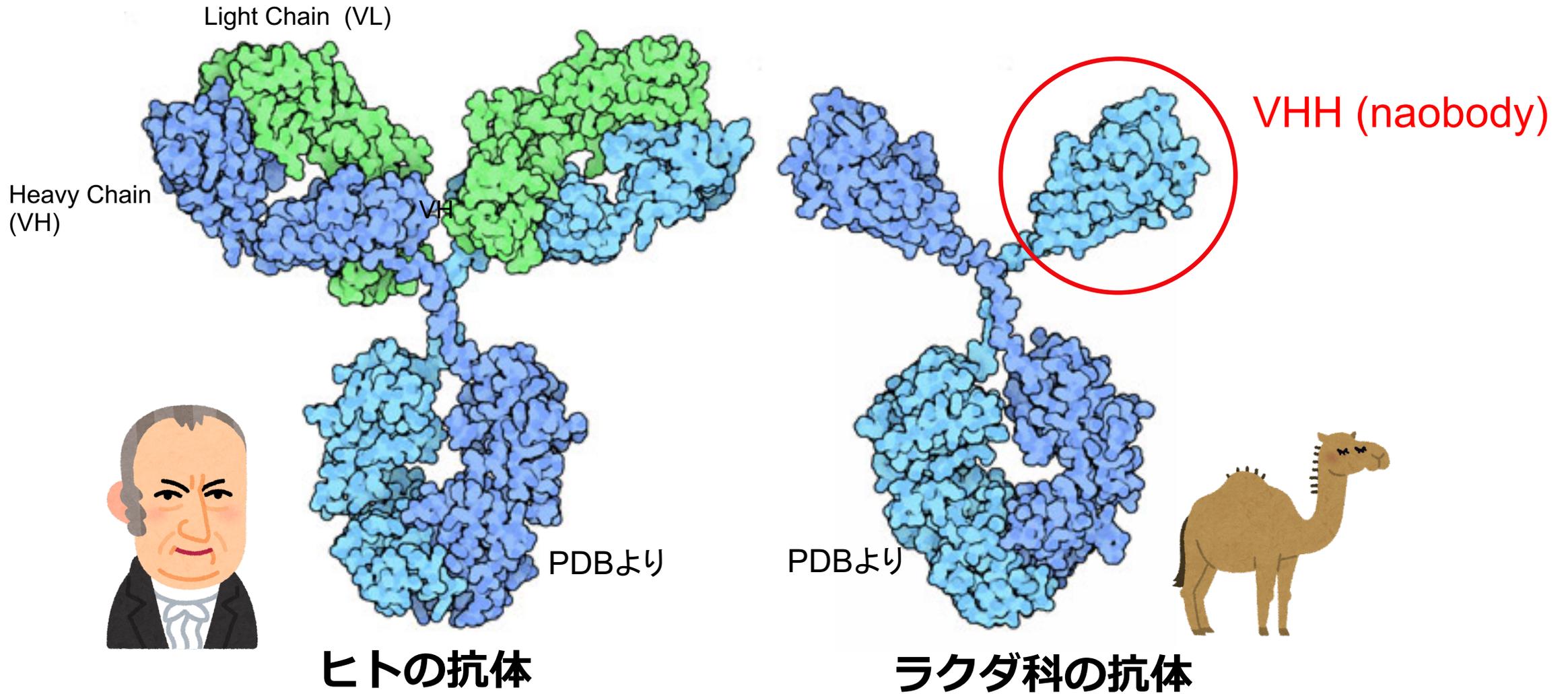
経産省サポイン事業「ITバイオと進化工学を融合した 高機能化人工次世代抗体VHHの開発」令和2年度9月～令和4年度

株式会社Epsilon Molecular Engineering、三井情報株式会社、埼玉大学との共同研究

内容「ラクダ科動物由来の一本鎖重鎖抗体VHHライブラリの多様化」

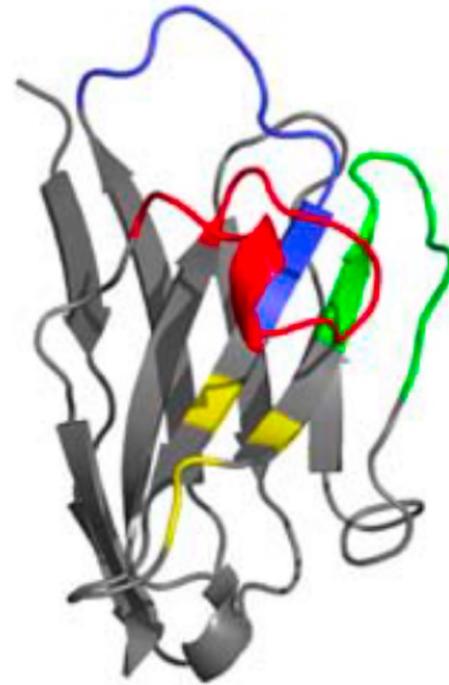
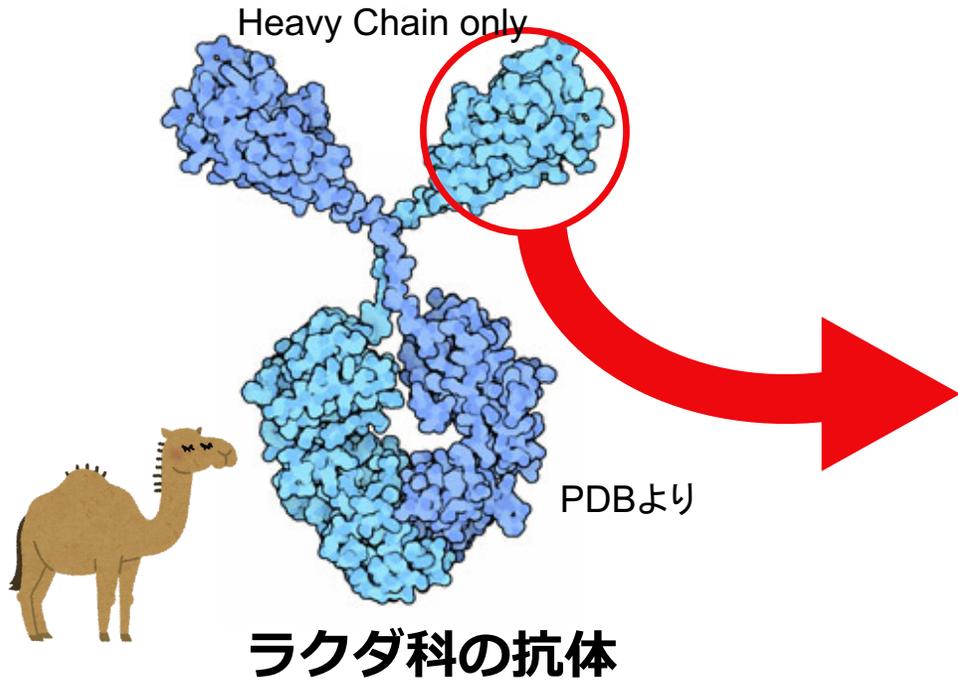


VHH(nanobody)とは？

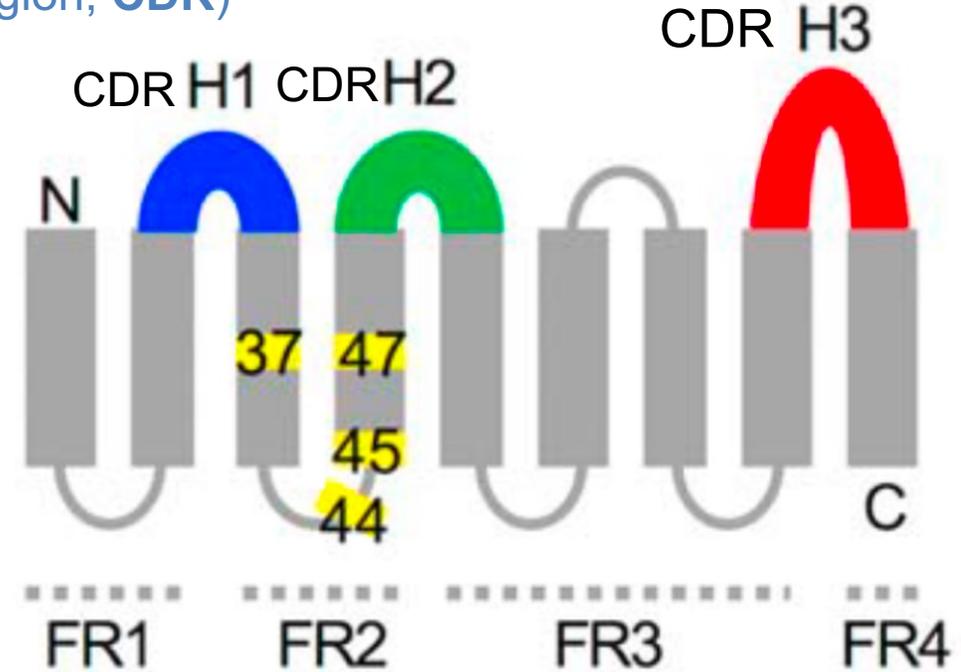


通常の抗体のVH/VLに比べて、分子量が小さい(扱いやすい)、構造が安定、中和能も同程度、これまで不可能だった抗原にも結合する、という特徴があり、新たな抗体創薬として注目されている

VHHの構造



相補性決定領域 (complementarity determining region; **CDR**)



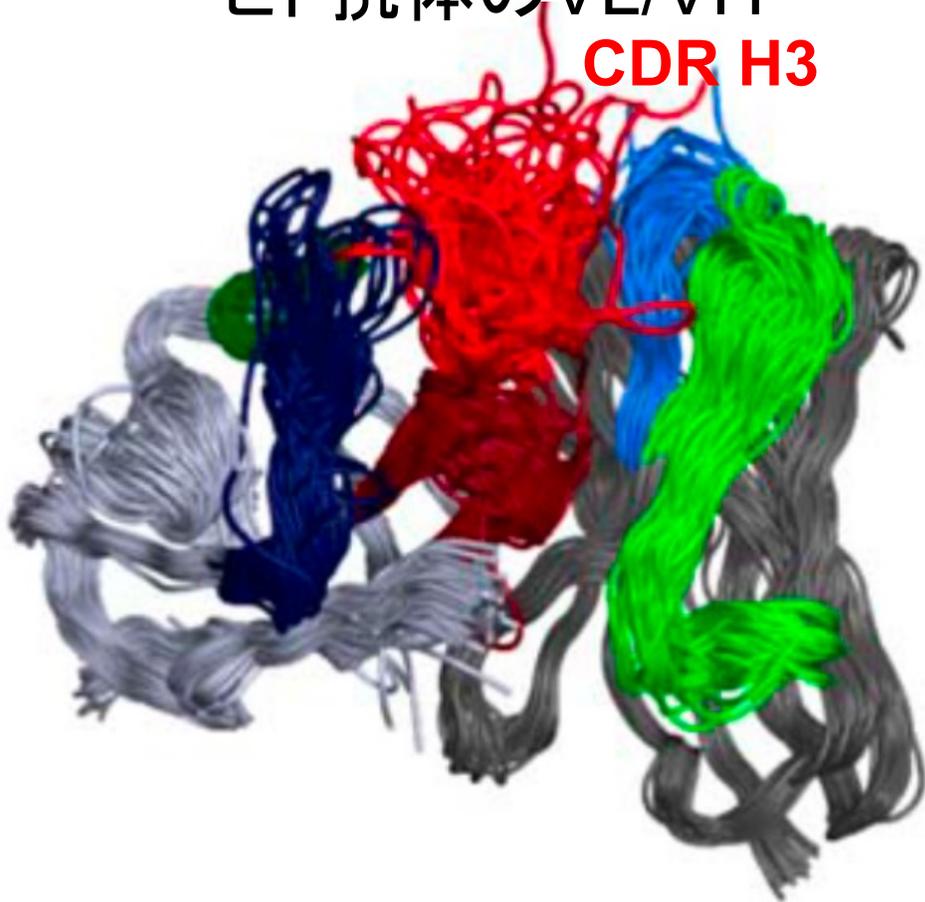
L. S. Mitchell and L. J. Colwell, "Comparative analysis of nanobody sequence and structure data," *Proteins*, vol. 86, no. 7, pp. 697–706 (2018)

CDRの中でも特に**CDR H3ループ**の構造が抗原結合にとって重要

CDR H3ループはVHHによって多様な構造をとる

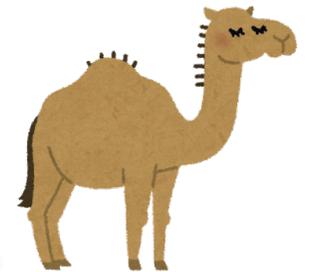
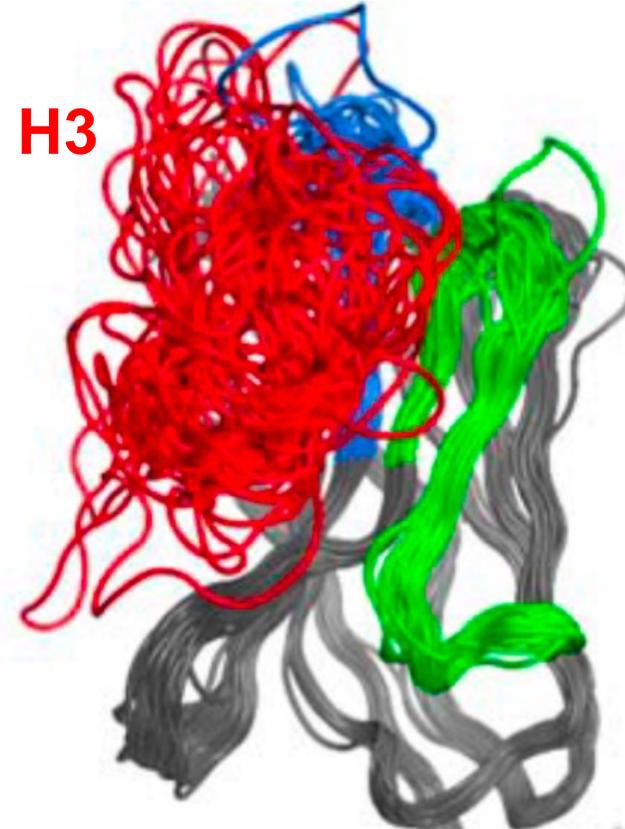
ヒト抗体のVL/VH

CDR H3



VHH

CDR H3



L. S. Mitchell and L. J. Colwell, "Comparative analysis of nanobody sequence and structure data," *Proteins*, vol. 86, no. 7, pp. 697–706 (2018)

CDRは可変領域であり、アミノ酸配列が変化することが可能。結果として様々な構造をとる
その中でも特に、H3 ループは構造の変化が大きい

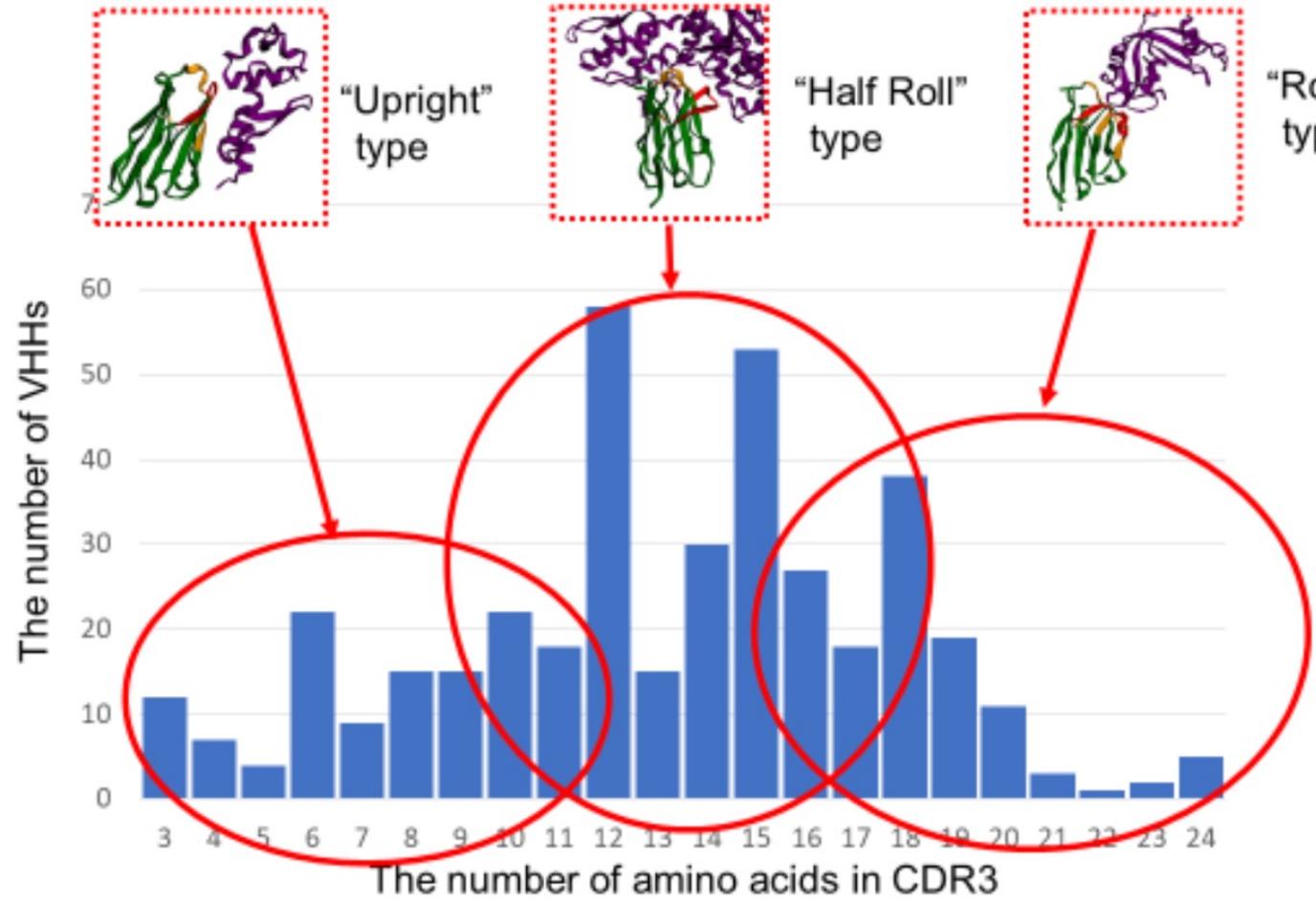
今日の内容

- 分子動力学シミュレーションによるCDR H3ループ構造のモデリング
 - レプリカ交換法を用いた効率的な探索
- 分子動力学シミュレーションによるVHH抗体の熱安定性の解析
 - 網羅的なAlchemical free energy perturbationによる高精度解析

今日の内容

- 分子動力学シミュレーションによるCDR H3ループ構造のモデリング
 - レプリカ交換法を用いた効率的な探索
- 分子動力学シミュレーションによるVHH抗体の熱安定性の解析
 - 網羅的なAlchemical free energy perturbationによる高精度解析

抗体ライブラリの**構造多様性**は抗原の様々な結合部位(エピトープ)へ最適化するために重要



VHHのCDR H3ループ構造は大まかに”Upright”, ”Roll” ”Half Roll”の3つのタイプに分類。

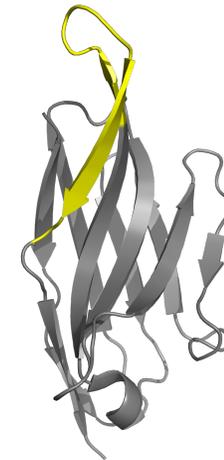
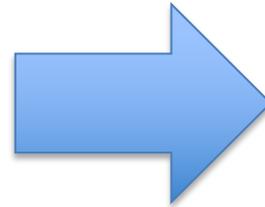
それぞれのタイプで、抗原の異なる結合部位へ結合する

良いライブラリを設計するためには、何らかの手段で 多様な構造が含まれているか検証することが必要

ライブラリから得た VHHのアミノ酸配列

>4KRN_1|Chain A|Nanobody/VHH domain
EgA1|Lama glama (9844)
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTF
SSYAMGWFRQAPGKQREFVAAIRWSGGYT
YYTDSVKGRFTISRDNKTTVYLQMNSLKP
EDTAVYYCAATYLSSDYSRYALPQRPLDYD
YWGQGTQVTVSSLEHHHHHH

実験 or
構造モデリング・予測



Upright型？



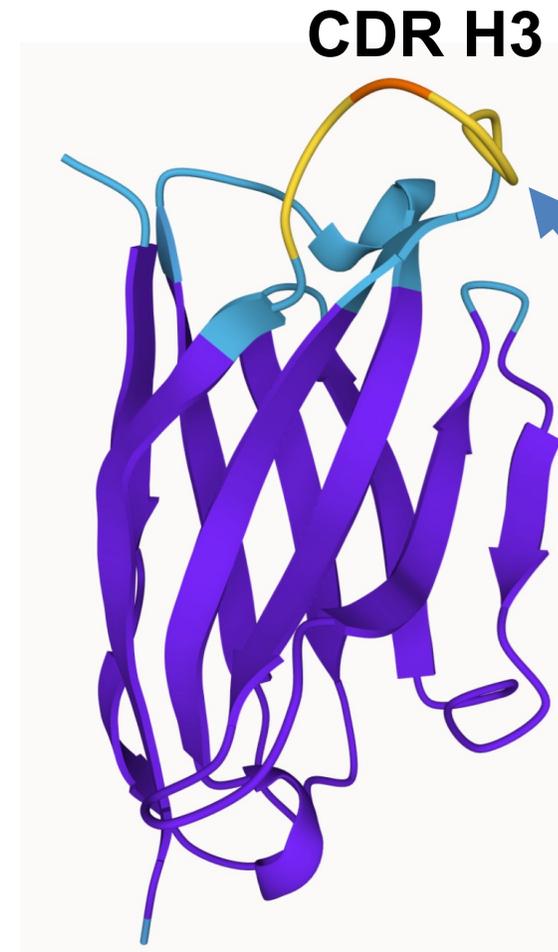
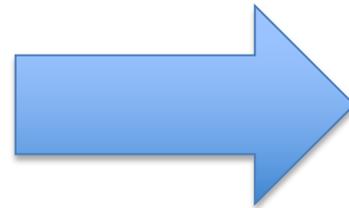
Roll型？

機械学習・AI によるCDR H3構造予測の限界

ライブラリから得た
VHHのアミノ酸配列

```
>4KRN_1|Chain A|Nanobody/VHH domain  
EgA1|Lama glama (9844)  
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTF  
SSYAMGWFRQAPGKQREFVAAIRWSGGYT  
YYTDSVKGRFTISRDNAAKTTVYLQMNSLKP  
EDTAVYYCAATYLSSDYSRYALPQRPLDYD  
YWGQGTQVTVSSLEHHHHHH
```

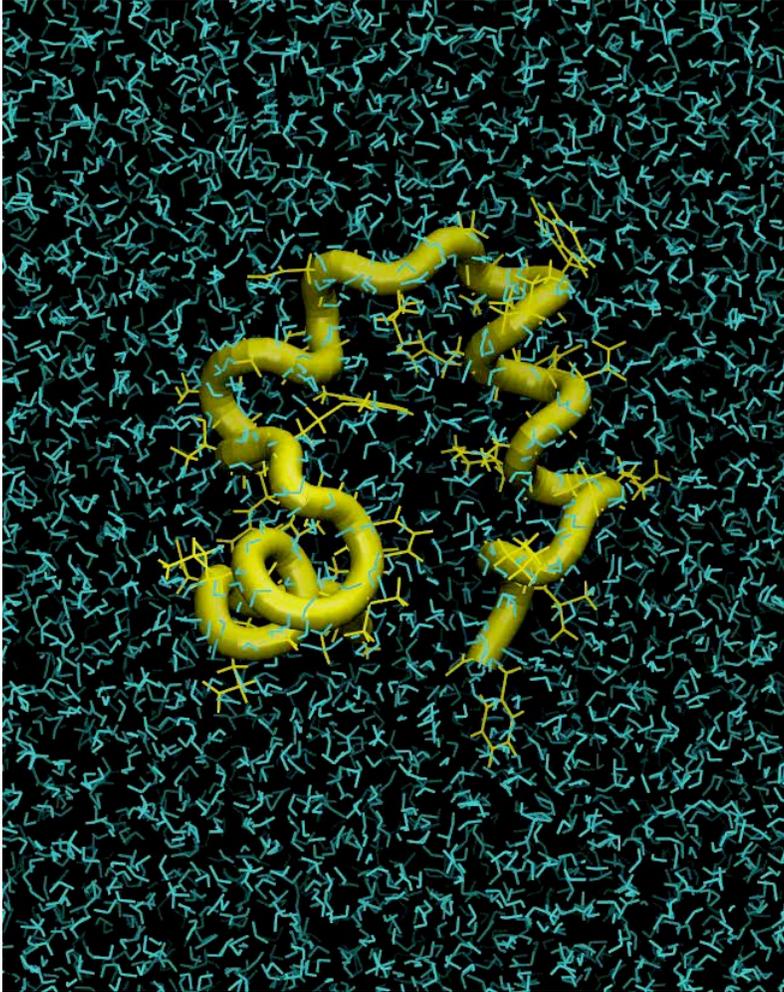
Alpha Fold2



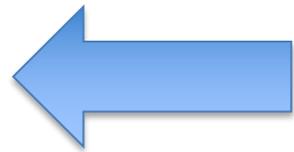
オレンジ色は、
この構造のconfidence
level (pLDDT)が
低いことを示す

CDR部位の構造は、機械学習・AIが利用している進化情報に基づいていないため、
構造予測が困難 (訓練データがない)

構造予測のもう一つのアプローチ： 分子動力学シミュレーション



分子シミュレーションではまずコンピュータの中にタンパク質構造を作る。
次に、物理法則をまねて原子を動かすことで原子の動きを観測する



ニュートンの第二法則

$$F = ma$$

原子の動きを観察

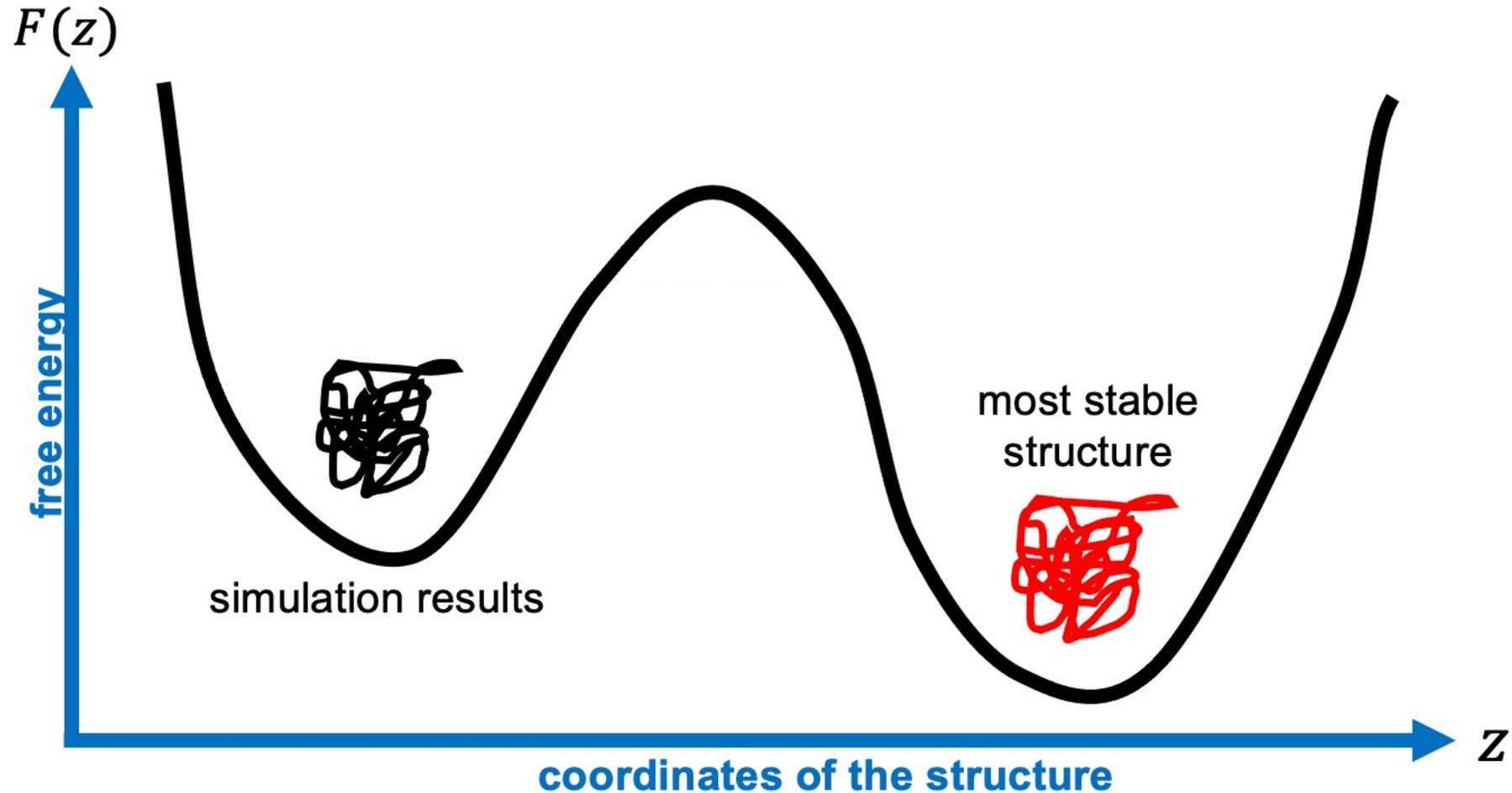
顔写真

M. Karplusらにより開発
2013年ノーベル化学賞
(nobelprize.orgより引用)

© Dr. Sugita (RIKEN)

物理法則の利点：訓練データがなくても原理的に予測が可能 (優れた汎用性)

分子動力学シミュレーションの欠点



シミュレーションが短いと、不安定な構造しかサンプルすることができない

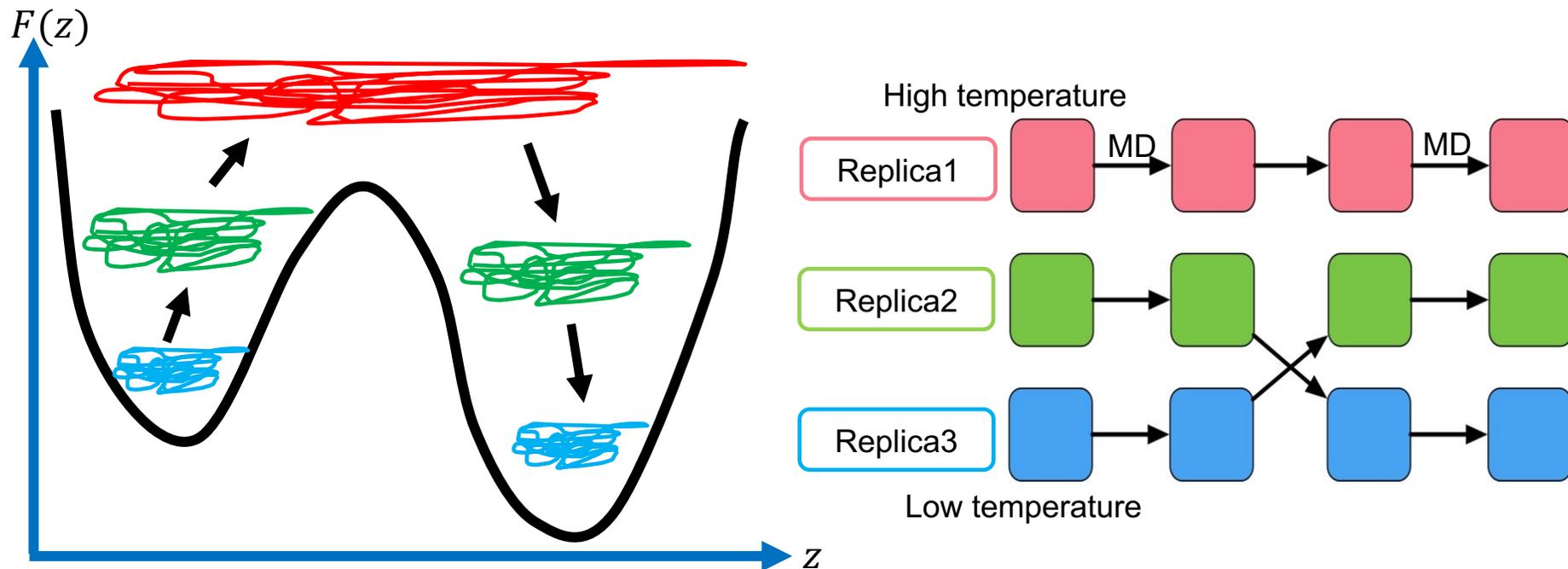
AntibodiesやVHHシミュレーションの先行研究

- **Multicanonical MD** sampling of CDR-H3 loop structures in antibodies
 - H. Shirai, N. Nakajima, J. Higo, A. Kidera, and H. Nakamura, *J. Mol. Biol.* **278**, 481 (1998).
 - S. T. Kim, H. Shirai, N. Nakajima, J. Higo, and H. Nakamura, *Proteins* **37**, 683 (1999).
- GPCR-nanobody binding by **accelerated MD** simulations.
 - Y. Miao and J. A. McCammon, *PNAS* **115**, 3036 (2018).
- **Metadynamics** simulations for sampling CDR-H3 loops in antibodies.
 - M. L. Fernández-Quintero, J. R. Loeffler, J. Kraml, U. Kahler, A. S. Kamenik, and K. R. Liedl, *Front Immunol.* **9**, (2019).
- Thermal stabilities of VHH investigated by MD simulations
 - G. Bekker, B. Ma, and N. Kamiya, *Protein Science* **28**, 429 (2019).
- Binding affinity estimations by MD simulations
 - M. A. Soler, S. Fortuna, A. de Marco, and A. Laio, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3438 (2018).
 - M. A. Soler, A. de Marco, and S. Fortuna, *Scientific Reports* **6**, 1 (2016).
 - X. Cheng, J. Wang, G. Kang, M. Hu, B. Yuan, Y. Zhang, and H. Huang, *International Journal of Molecular Science* **20**, 17 (2019)
- Response of antibody to antigen binding
 - K. Shinoda and H. Fujitani, *Scientific Reports* **7**, 1 (2017).

**Many enhanced sampling methods
have been applied so far**

Replica Exchange method

Sugita and Okamoto, *Chem. Phys. Lett.* **314**, 141-151 (1999)



しかし、系全体の温度を交換しようとするると、交換確率がとても小さくなってしまふ



一部の自由度に絞って温度交換を行うことができるか？

REST (Liu 2005), REST2 (Terakawa 2011), gREST (Kamiya and Sugita 2018)

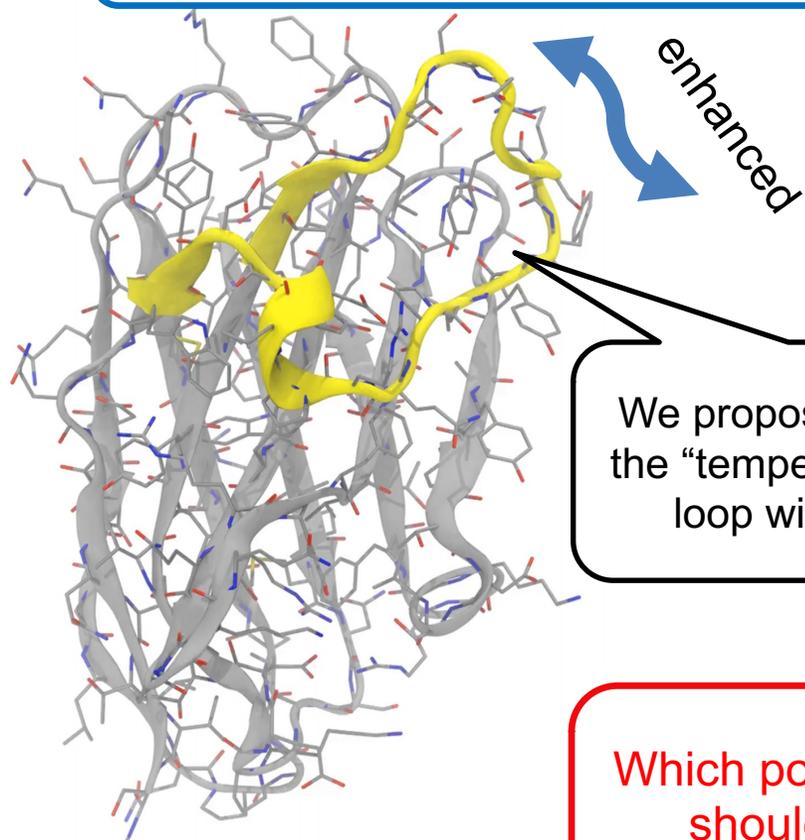
This study proposes to use gREST for enhanced sampling of H3 loop structure

Kamiya and Sugita, *J. Chem. Phys.* **149**, 72304 (2018)

gREST can change the “temperatures” of both local specific residues and potential energy terms

Local residues

Potential energy terms



$$V(\mathbf{r}) = \sum_{\text{bonds}} k_b (r_{i,i+1} - r_0)^2 \quad \text{Chemical bond potential energy}$$
$$+ \sum_{\text{angles}} k_a (\theta_{i,i+1,i+2} - \theta_0)^2 \quad \text{Angular potential energy}$$
$$+ \sum_{\text{torsions}} k_t \left[1 + \cos(n\phi_{i,i+1,i+2,i+3} - \omega) \right] \quad \text{Dihedral potential energy}$$
$$+ \sum_i \sum_{j>i} \varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad \text{Van der Waals interaction (LJ) potential energy}$$
$$+ \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad \text{Electrostatic interaction (Charge) potential energy}$$

Which potential energy terms should be selected for efficient sampling?

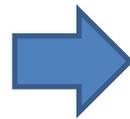
Purpose and computational protocols

Problem we address

gREST can selectively change the "temperature" of H3 loop region. But which potential energy terms should be selected for efficient sampling?

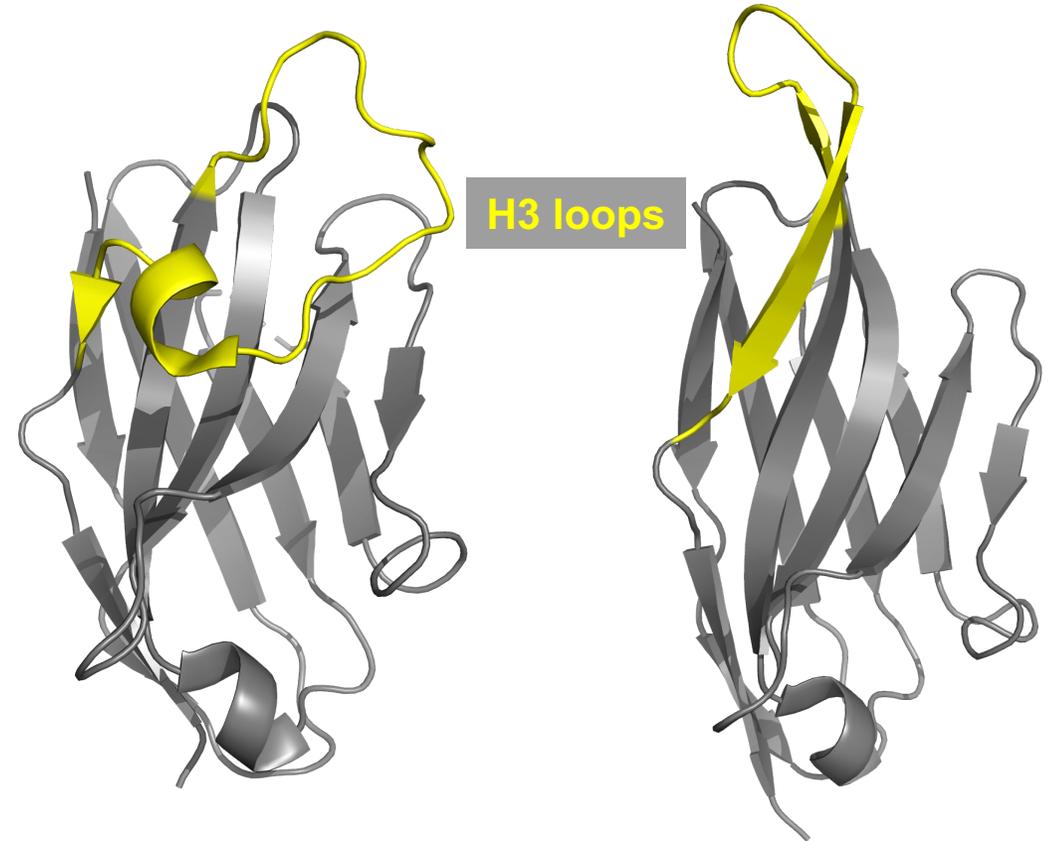
Computational Protocols

Homology modeling
from sequence with
SWISS-MODEL



Sampling of H3 loop
structure by gREST
simulations

Test systems (PDB ID: 4KRN, 4IDL)

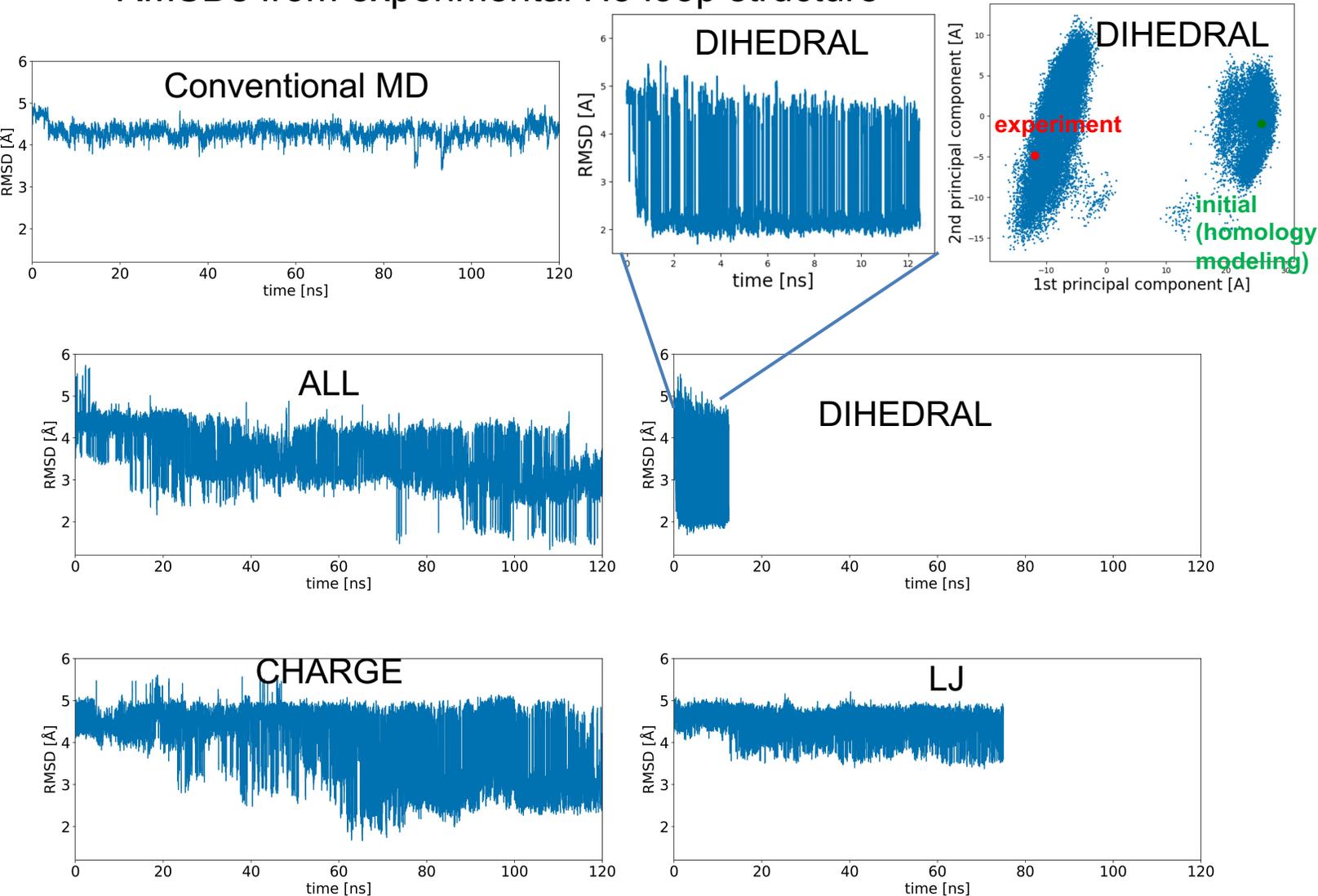


We apply gREST method to CDR H3 loop and examine the combinations of potential energy terms, ALL, DIHEDRAL, CHARGE, LJ, to evaluate which terms are effective for efficient sampling.

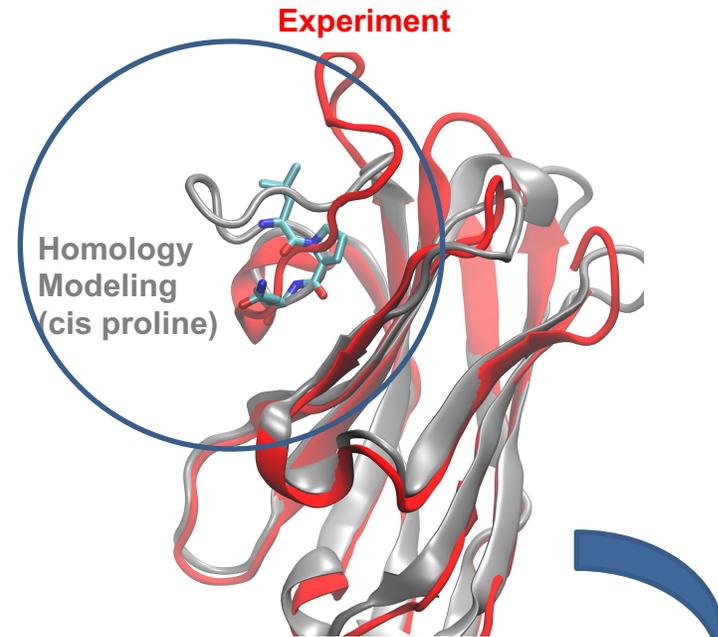
SWISS-MODEL used for homology modeling. GENESIS of RIKEN used for gREST simulation with 8 replicas.

Simulation results (PDB ID: 4KRN)

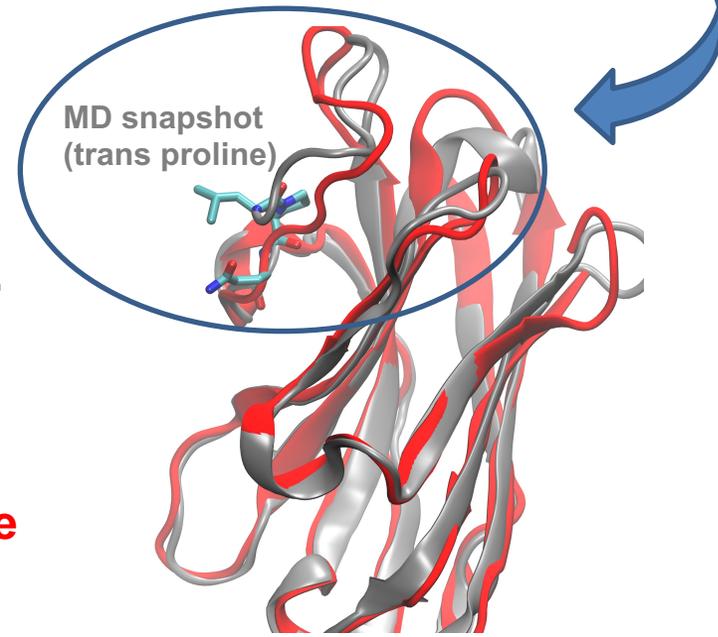
RMSDs from experimental H3 loop structure



Homology modeling



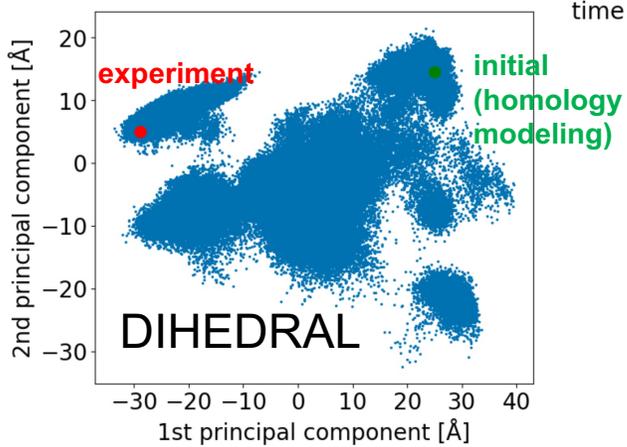
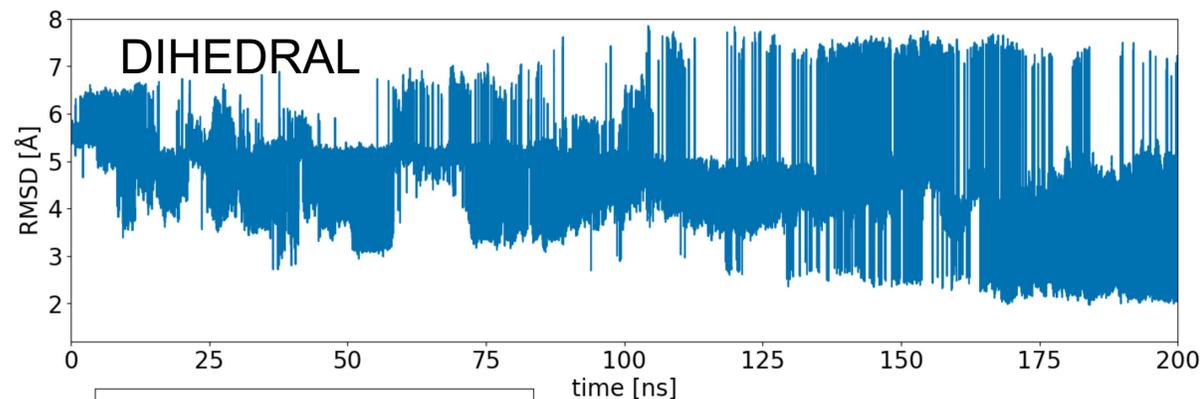
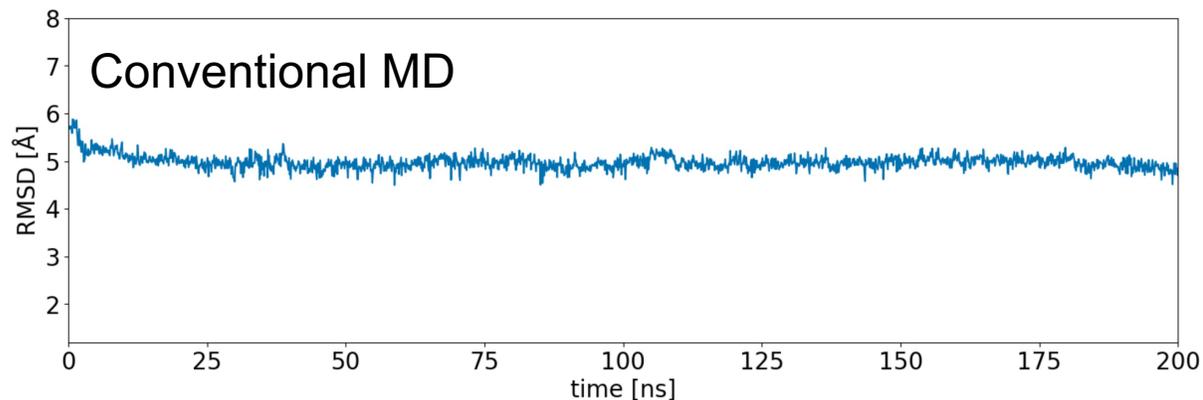
MD snapshot



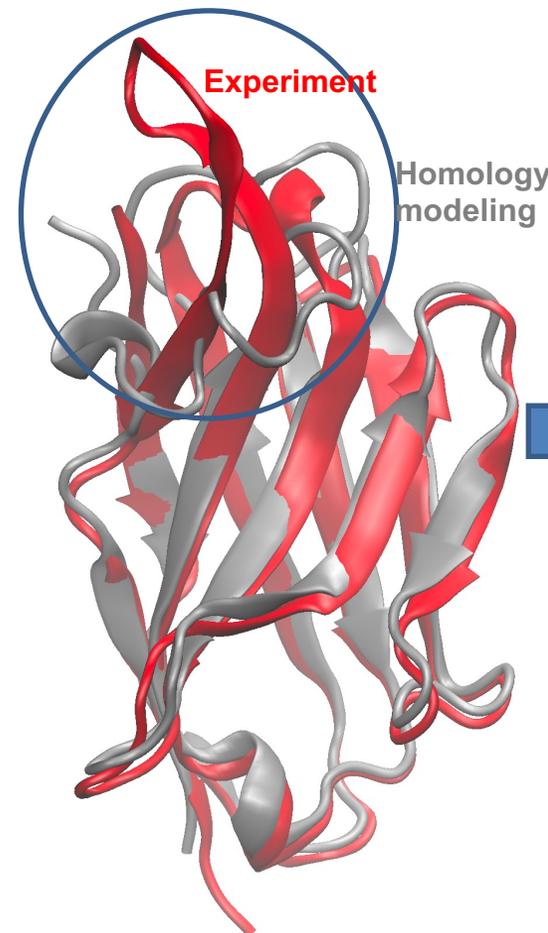
gREST with DIHEDRAL terms rapidly found the experimental structure

Simulation results (PDB ID: 4IDL)

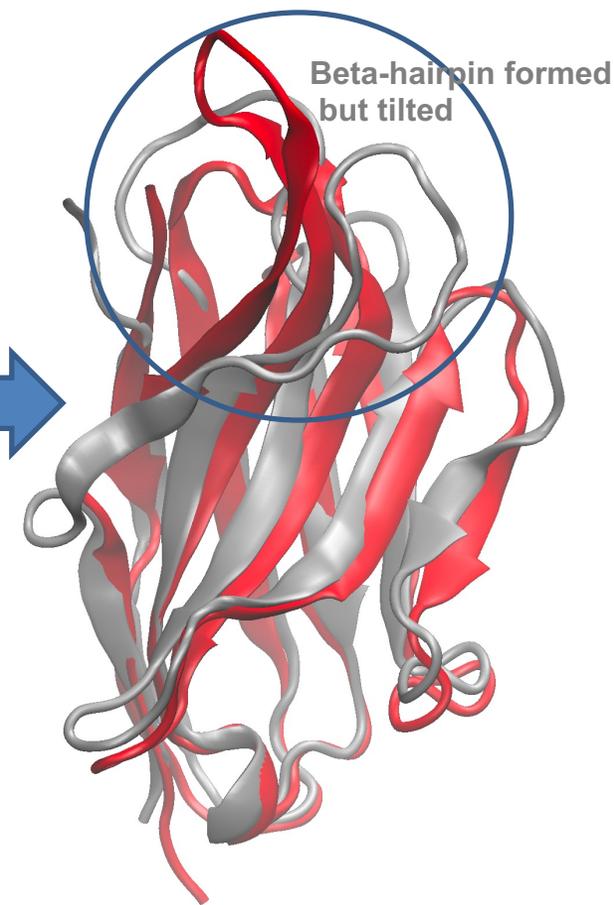
RMSDs from experimental H3 loop structure



Homology modeling



MD snapshot



gREST with DIHEDRL terms successfully forms the beta-hairpin structure. But the hairpin is still tilted compared to the experimental structure.

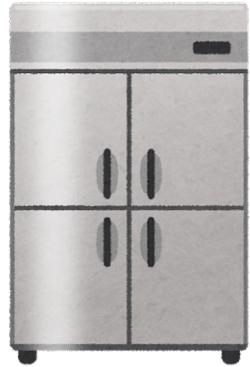
構築中のVHHライブラリから選んだ4つの代表配列に対する gRESTシミュレーション結果

非公開

今日の内容

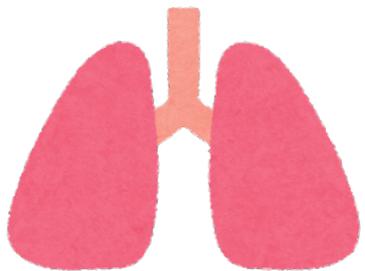
- 分子動力学シミュレーションによるCDR H3ループ構造のモデリング
– レプリカ交換法を用いた効率的な探索
- 分子動力学シミュレーションによるVHH抗体の熱安定性の解析
– 網羅的なAlchemical free energy perturbationによる高精度解析

VHHの構造安定性は創薬にとって重要



冷蔵庫

低温搬送しなければならない場合、市場流通のためのコストが跳ね上がる

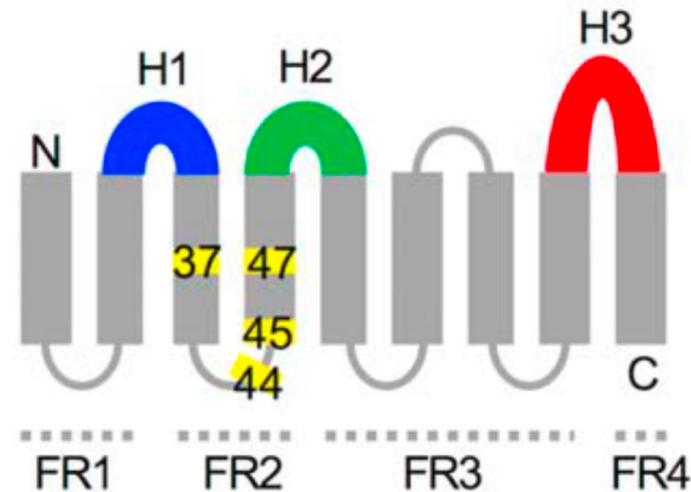


肺

構造の熱安定性が高ければ、例えばVHH抗体をエアロゾルで肺へ直接与えることができる



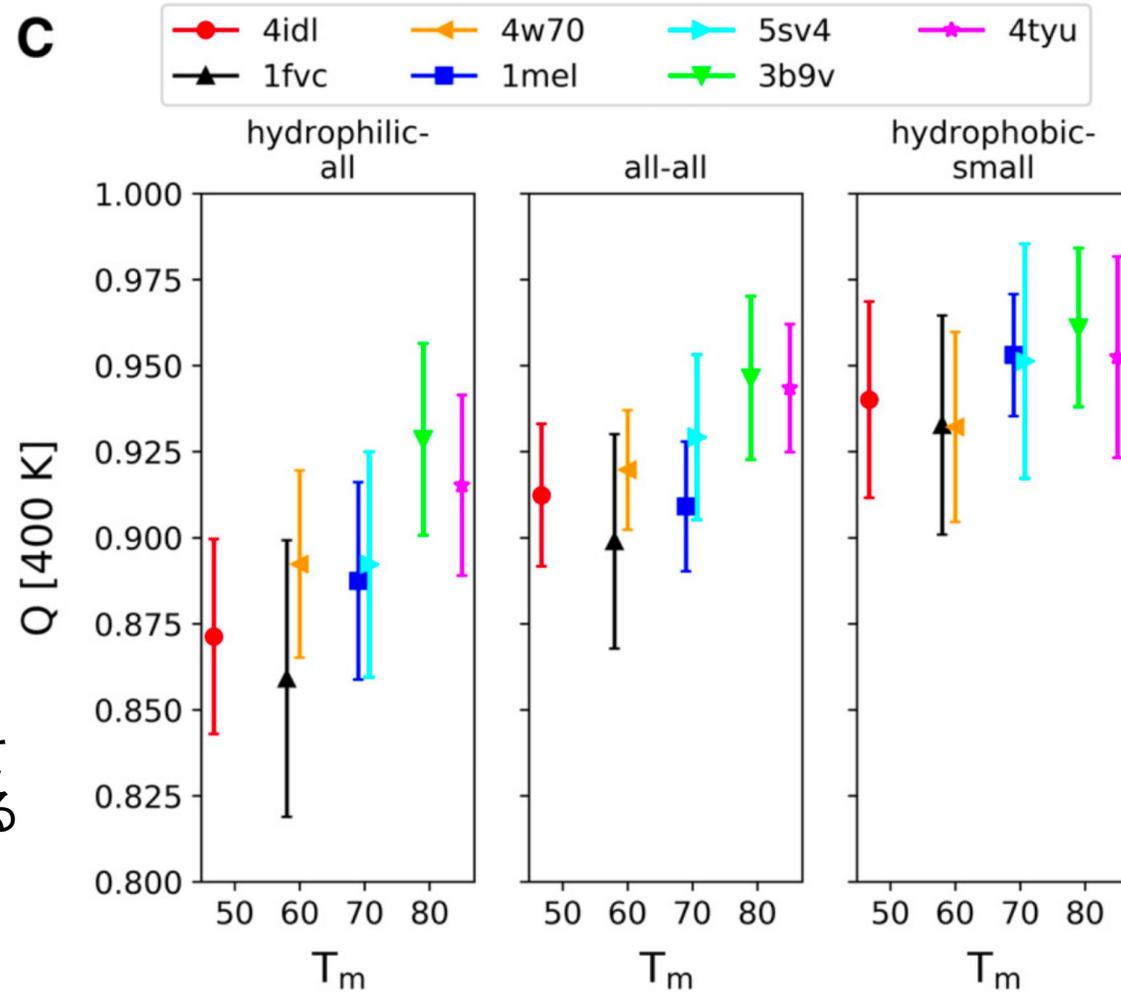
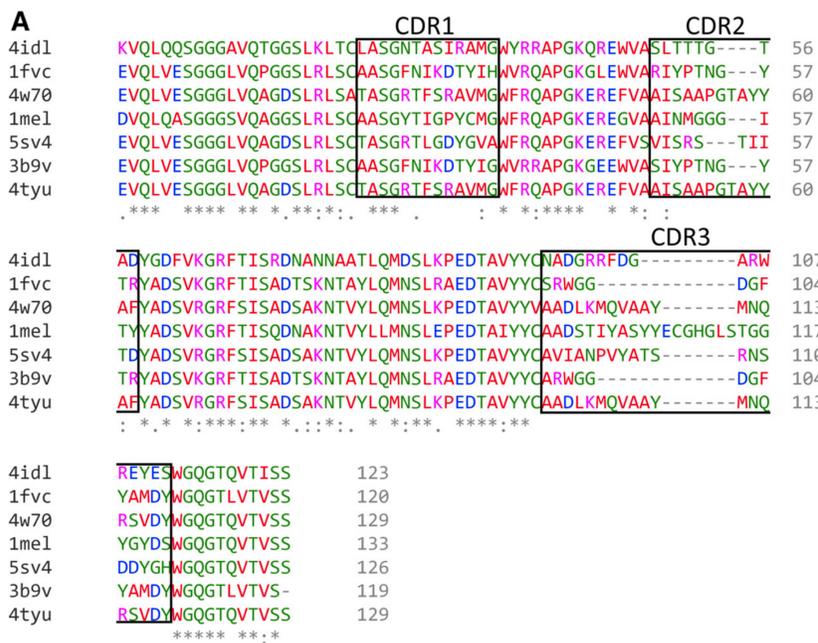
非公開



L. S. Mitchell and L. J. Colwell *Proteins*, vol. 86, no. 7, pp. 697–706 (2018)

CDR領域は可変なので、FR領域の配列を最適化することで熱安定性の高いVHHをデザインできないか？

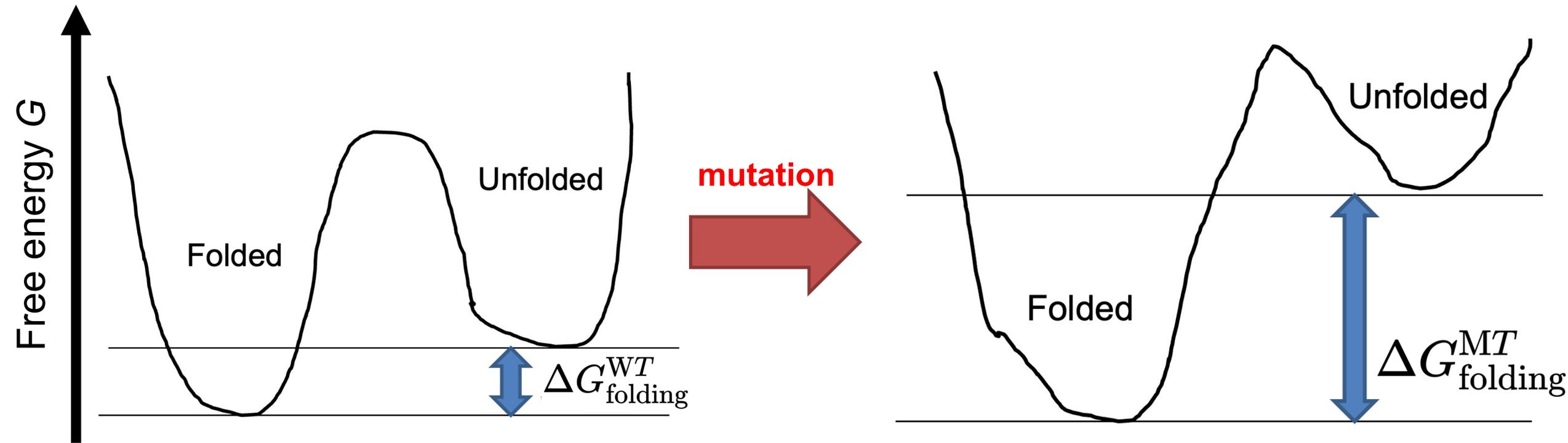
シミュレーションによる熱安定性解析の先行研究



実験的に変性温度(T_m)がわかっているいくつかのVHHについて分子動力学シミュレーションを行い、Q-value (天然構造におけるコンタクトの再現割合)と良い相関があることを示した

G. Bekker, B. Ma, and N. Kamiya, "Thermal stability of single-domain antibodies estimated by molecular dynamics simulations," *Protein Science*, vol. 28, no. 2, pp. 429–438, 2019

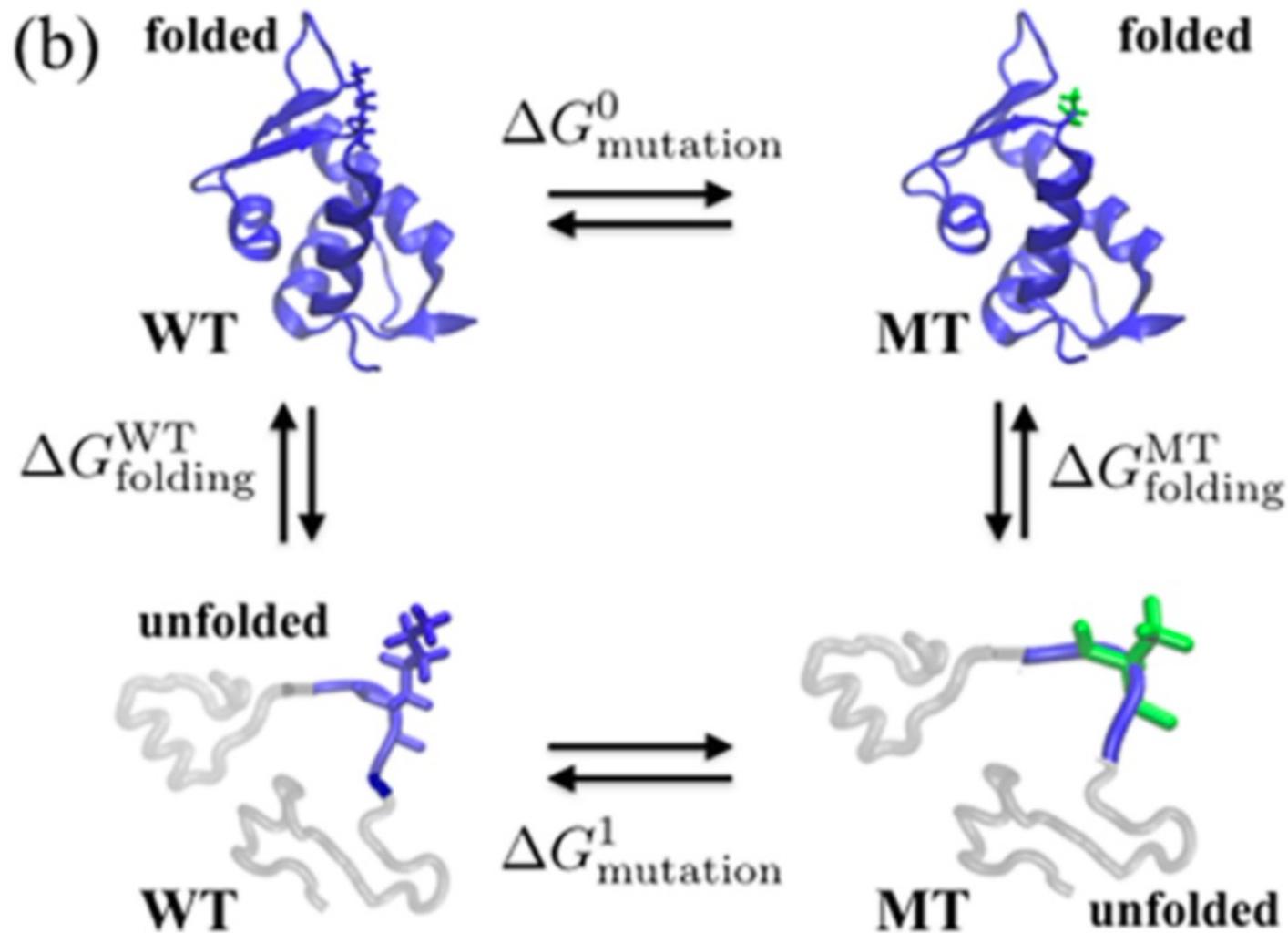
熱安定性を測る厳密な熱力学量: $\Delta\Delta G$



変異による熱安定性の変化

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{folding}}^{\text{MT}} - \Delta G_{\text{folding}}^{\text{WT}}$$

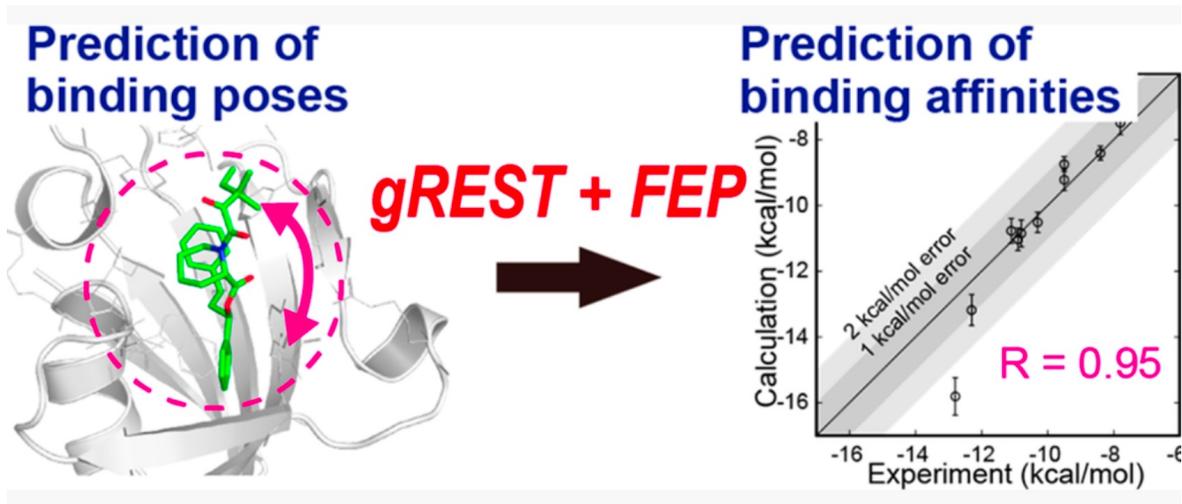
熱力学サイクルを考慮した $\Delta\Delta G$ 計算の置き換え



$$\begin{aligned}\Delta\Delta G &= \Delta G^{\text{MT}}_{\text{folding}} - \Delta G^{\text{WT}}_{\text{folding}} \\ &= \Delta G^0_{\text{mutation}} - \Delta G^1_{\text{mutation}}\end{aligned}$$

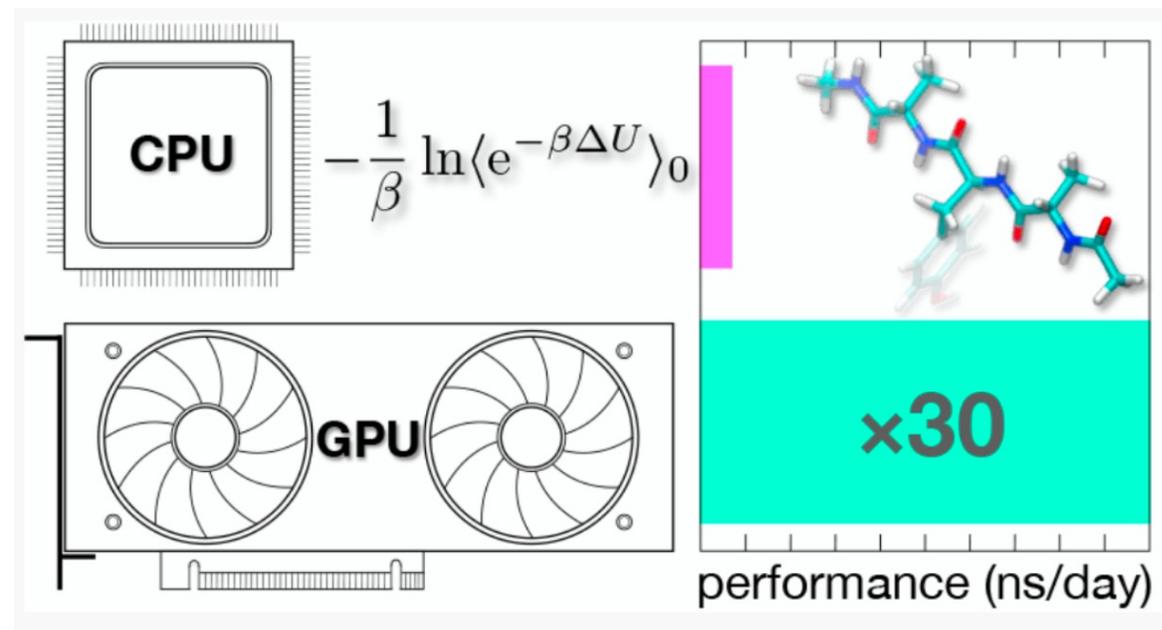
Alchemical FEPはモダンなソフトウェア実装により 低コスト化・高速化が実現しており、網羅的な計算が可能になりつつある

GENESISでのgRESTとの組み合わせ



H. Oshima, S. Re, and Y. Sugita, "Prediction of Protein–Ligand Binding Pose and Affinity Using the gREST+FEP Method," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 60, no. 11, pp. 5382–5394, 2020

NAMD version 3.0でのFEPのGPU化



H. Chen *et al.*, "Boosting Free-Energy Perturbation Calculations with GPU-Accelerated NAMD," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 60, no. 11, pp. 5301–5307, 2020

複数個のVHHについて、全てのアミノ酸を一つずつ
Alanineへ点変異させた時の $\Delta\Delta G$ (alanine scanning)

非公開

予備的結果： $\Delta\Delta G$ の結果を参考に表面電荷(GLU)を導入した変異体の高温でのシミュレーション結果

非公開

まとめ

- VHH抗体のCDR H3ループ構造をモデリングするための手法として、レプリカ交換法的一种であるgRESTを提案した。CDR H3ループと、DIHEDRAL項を温度変化させると効果的であることがわかった

非公開

- 今後、こうした「網羅的」なシミュレーションにより、抗体創薬により役立つ情報を提供できるよう手法開発を行なっていく

謝辞

- 経済産業省 戦略的基盤技術高度化支援事業 JPJ005698
- Epsilon Molecular Engineering, 三井情報株式会社の皆様
- 埼玉大学工学部松永研究室 東田さん、小田さん、岡田さん

