

DISCOVERY STUDIO®を 使用した抗体開発

抗体は、感染症、がん、慢性炎症性疾患、循環器疾患、免疫障害といった多くの重要な疾患の治療に効果的であることが実証されています¹。このため、抗体は現在、ヒトへの治療薬では最も急成長を遂げている分野の1つとなっています^{2,3}。Discovery Studioでは、抗体の構造モデル作成に必要なツールを使いやすい環境で使用できるだけでなく、治療薬としての効果を高め、開発を最適化するのに必要なサイエンスを活用できます。

新しい治療用抗体の開発において 業界が直面している課題

以下に示すように、薬剤としての抗体の開発には、設計および開発において特有の課題が数多く存在します。

- ・ 抗体構造のモデリング
 - V_H および V_L テンプレート構造の特定
 - 完全長のIgG1構造モデル
 - FabまたはFvドメイン (V_{HL}) フレームワークモデル
 - CDRループの正確なモデリング
 - モデルの精密化とシミュレーション
- ・ 親和性と特異性の最適化
 - 抗原エピトープ/抗体パラトープの同定
 - 抗体の親和性と特異性の最適化
- ・ 安定性の最適化
 - 温度およびpHの変化に対する安定性
 - タンパク質凝集性向の予測
- ・ 抗体のヒト型化
 - 動物由来CDRのヒト型抗体フレームワークへの移植
 - ヒト型化プロセスをサポートするための安定化変異の予測

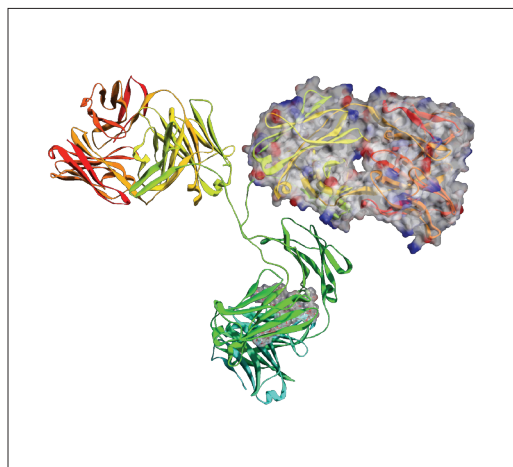


図1: 欠損のない完全長抗体の構造の例 [PDB: 1IGT]

Discovery Studioが提供するサイエンスとテクノロジーにより、このような設計上の課題を解決することが可能になります。

抗体のモデリング

Discovery Studio は、CDR ループのコンフォメーション予測ツールを含む、抗体構造モデリング専用のツール群による包括的なポートフォリオを提供します。

1) 抗体ドメインおよびCDRループのアノテーション

- 抗体の配列や構造の変異/定常ドメインを、隠れマルコフモデル HMM (Hidden Markov Model) を使用して自動的に同定します。
- 変異ドメインについては、Chothia、Kabat、IMGT、Honegger といった広く使用されている定義に基づいて CDR ループをレポートします。

2) テンプレートの特定

- Blast を用いて PDB およびキュレートした PDB 抗体データベースを検索し、各鎖やドメインに最適なテンプレートを特定します。
- 特定の種を指定してフィルタリングすることにより、テンプレート選択の精度を高めます。

3) 配列のアラインメント

- 多重構造アラインメントと多重配列アラインメントのアルゴリズムを使用して、構造を構築したい配列の、テンプレートに対するアラインメントを迅速かつ正確に実行します。
- 軽鎖および重鎖のアラインメントを同時にかつ個別に実施します。



図2: 抗体Fabドメインの軽鎖/重鎖配列アラインメントの例 (PDB: 1V7Mおよび1SBS)

4) ホモロジー モデルの構築

Discovery Studio では、業界標準の MODELER^{4,5,6} を使用し、抗体のホモロジー モデルを自動構築します。

- 抗体フレームワークモデリング: 軽鎖や重鎖に対してそれぞれ異なるテンプレートを指定し、簡単にハイブリッド モデルを構築できます。フレームワーク用のテンプレート構造を使用して、2本の鎖の相対的な空間的配置を決定します。

- 完全長抗体のモデリング: 免疫グロブリン ガンマ アイソタイプ (IgG: Immunoglobulin Gamma Isotype) の完全長モデルを、IgG1/IgG2 テンプレート構造に基づいて構築します。

5) CDRループの同定と精密化

- 既知の抗体のデータベースをBLAST検索し、抗体構造の CDR ループを自動的に同定します。個々のループ領域に最適なテンプレートを見つけ、必要に応じてループのテンプレートを基にモデルを構築します。
- 手動によるループの移植: ループコンフォメーションをテンプレート構造から対象の抗体モデルへコピーします。
- 力場計算によるループの精密化: LOOPER アルゴリズム⁷ によって主鎖のコンフォメーションを系統的に探索し、これに対してCHARMm力場^{8,9}を使用した最適化とランク付けを行います。

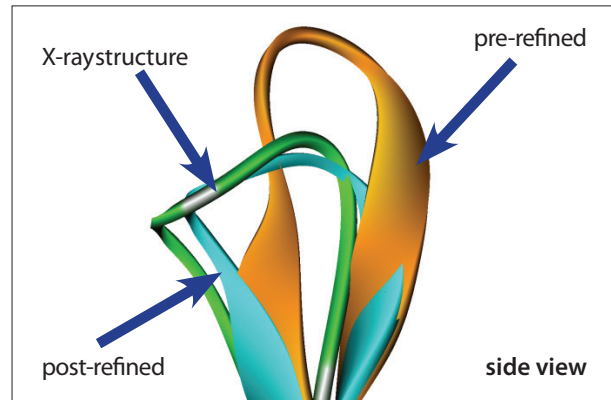


図3: 抗体構造におけるループの精密化 (PDB: 2AAB)

6) モデル分析

Discovery Studio は、抗体モデルの品質の詳細な分析を支援するツールとプロトコルを提供します。

- Verify Protein (Profiles 3D) は、各残基がタンパク質中の特定の3次元環境で見つかる確率を算出します。予測される Verify Score はモデルの品質の指標になります。
- Verify Protein (MODELER) は、統計ポテンシャルを使用してモデルのコンフォメーションをスコア付けします。
- ラマチャンドラン プロットにより、アミノ酸のPhi (ϕ) 角と Psi (ψ) 角の分布を検証します。
- 主鎖角コンフォメーションの確認や、ロータマライブラリからの側鎖の偏差の確認など、さまざまな参照機能が用意されています。

カ場ベースのタンパク質モデリング

アミノ酸側鎖最適化、全体の構造最適化、分子動力学法を含むさまざまな手法でモデルの精密化を行います。

1) 側鎖の精密化

- アミノ酸側鎖のコンフォメーションをCHARMmシミュレーション¹⁰を使用して系統的に最適化します。

2) タンパク質のイオン化とアミノ酸pK値の予測

- 新しい自社開発の計算手法¹¹をCHARMm^{12,13,14}のGeneralized-Born溶媒モデルと共に利用して、タンパク質のイオン化を迅速かつ正確に算出します。プロトン結合の平衡に、反復的なモバイル クラスターリング アプローチ¹⁵を導入しています。
- プロトンが解離し得るアミノ酸残基のpK(解離定数)と滴定曲線を予測します。
 - pHの関数としてタンパク質の総電荷を算出し、等電点(pI)を予測します。
 - pHの関数としてフォールディングの自由エネルギーに対する静電的な寄与を算出します。
 - 予測されたpK値に基づき、与えられたpHに応じて残基をプロトン化します。

3) 抗体構造シミュレーションの実施

- CHARMmを使用してImplicit Solventモデルを用いた分子動力学(MD)シミュレーションを行います。
- NAMD¹⁶に接続し、水分子を露わに扱って完全な抗体構造のシミュレーション*を行うことも可能です。

親和性と選択性の最適化

Discovery Studio には、抗原の抗体に対する結合部位であるエピトープの特定や抗体Fabドメインの結合親和性の予測を行う研究者を支援する、一連のツールが搭載されています。

1) 抗原-抗体ドッキング

- ZDOCK^{17,18}を使用してタンパク質-タンパク質相互作用パターンを網羅的かつ効率的に検索し、可能性のあるドッキング ポーズを出力します。
- ZRANKスコアリング関数¹⁹を使用して、ドッキング ポーズのランキングの精度を高めます。

2) 結合親和性の予測

- 選択した一連のアミノ酸残基に対する系統的な変異導入を行い、結合親和性に対する点変異の影響を評価します。

安定性の最適化

1) タンパク質安定性の最適化

- 任意の温度でのタンパク質安定性に対する点変異の影響を算出します。
- 指定した変異導入箇所リストから、タンパク質構造を最も安定化する2部位/3部位の変異箇所を予測します。

2) “Spatial Aggregation Propensity”アルゴリズム

- マサチューセッツ工科大学のTrout教授が開発し、実験によって検証された“Spatial Aggregation Propensity”アルゴリズムをライセンス使用しています^{20,21,22}。
- 抗体上の凝集しやすい部位の大きさと場所を特定します。
 - 安定性の強化につながる変異導入箇所を予測します。
 - パラトープ、Fc 受容体、Protein A、Protein G の結合領域など、その他のタンパク質-タンパク質認識部位も予測可能です²³。

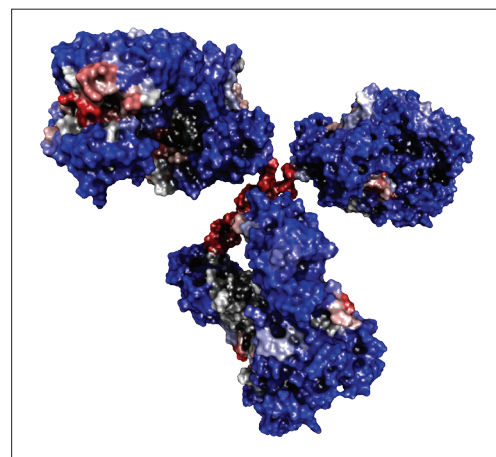


図4: 予測される凝集箇所を赤で示したIgG1のタンパク質凝集マップの例 [PDB: 1IGT]

*NAMD は、イリノイ大学アーバナ シャンペーン校が提供しています。 <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>

抗体のヒト型化

異種由来のモノクローナル抗体の免疫原性を抑制することにより、ヒト免疫系への抗体投薬効果を高めます。

- 1) フレームワーク ホモロジー モデリング ツールを使用して、げっ歯類のCDRをヒト型フレームワーク構造に移植します。
- 2) “Calculate Mutation Energy (Binding)” ツールと “Calculate Mutation Energy (Stability)” ツールを組み合わせることにより、ヒト型化のための変異残基の選択に対する優先順位付けを行うことも可能です。

Discovery Studioの詳細については次のURLを参照して下さい。

<http://accelrys.co.jp/products/discovery-studio/>

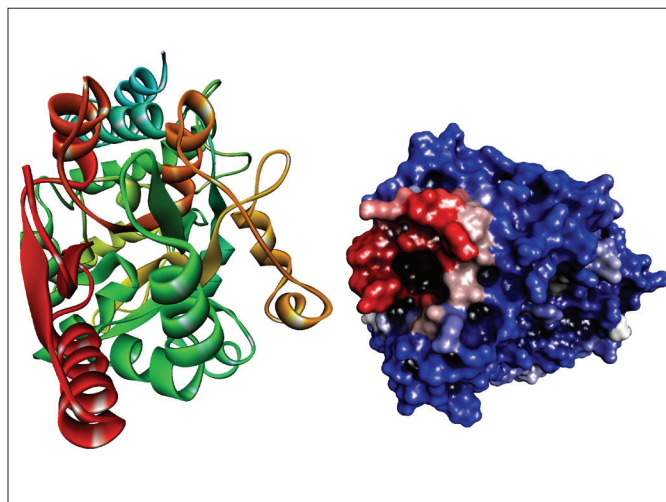


図5: 抗体のFabドメインとその抗原の結合部位の「ホットスポット」 [PDB: 3PGF]

参考文献:

1. Reichert J. and Pavlou A., Nat. Rev. Drug. Discov., **2004**, 3, 383–384.
2. Carter P.J., Nat Rev Immunol., **2006**, 6, 343–357.
3. Aggarwal S, Nat. Biotechnol., **2007**, 25, 1097–1104.
4. N. Eswar, M. A. Marti-Renom, B. Webb, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Shen, U. Pieper, A. Sali. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc., **2006**, Supplement 15, 5.6.1–5.6.30.
5. Fiser, A. Sali, A. Methods in Enzymology, **2003**, 374, 463–493.
6. Sanchez, R. Sali, A. Protein Structure Prediction: Methods and Protocols, **2000**, 97–129.
7. Spassov, V.Z., Flook, P.K., Yan, L. Prot. Eng., Design & Selection, **2008**, 21, 91–100.
8. Brooks B. R., Brooks III C. L., Mackerell A. D., Nilsson L., Petrella R. J., Roux B., Won Y., Archontis G., Bartels C., Boresch S., Caflich A., Caves L., Cui Q., Dinner A. R., Feig M., Fischer S., Gao J., Hodoscek M., Im W., Kuczera K., Lazaridis T., Ma J., Ovchinnikov V., Paci E., Pastor R. W., Post C. B., Pu J. Z., Schaefer M., Tidor B., Venable R. M., Woodcock H. L., Wu X., Yang W., York D. M., Karplus M. J. Comp. Chem., **2009**, 30, 1545–1615.
9. Brooks B. R., Brucoleri R. E., Olafson B. D., States D. J., Swaminathan S., Karplus M. J. Comp. Chem., **1983**, 4, 187–217.
10. Spassov, V., Yan, L. Flook, P. Protein Science, **2007**, 16(3), 494–506.
11. Spassov V.Z, Yan L Protein Science, **2008**, 17, 1955–1970.
12. Still, W. C., Tempczyk, A., Hawley, R. C., Hendrickson, T., J. Amer. Chem. Soc., **1990**, 112, 6127.
13. Dominy, B., Brooks, C.L. III., J. Phys. Chem. B, **1999**, 103, 3765–3773.
14. Spassov, V.Z., Yan, L., Szalma, S. J. Phys. Chem. B, **2002**, 106, 8726–8738.
15. Spassov V.Z., Bashford D. J.Comp.Chem.,**1999**, 20, 1091–1111.
16. Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kale L, Schulten K. J. Comp. Chem., **2005**, 26, 1781–1802.
17. Pierce B., Weng Z. Proteins, **2008**, 72(1), 270–279.
18. Chen R., Weng Z. Proteins, **2003**, 52, 80–87.
19. Pierce B, Weng Z. Proteins, **2007**, 67(4), 1078–1086.
20. Chennamsetty N., Vayonov V., Kayser V., Helk B. and Trout B. L. J. Phys. Chem. B, **2010**, 114(19), 6614–6624.
21. Chennamsetty N., Vayonov V., Kayser V., Helk B. and Trout B. L., Proc. Nat. Acad. Sci., **2010**, 106(29), 11937–11942.
22. Chennamsetty N, Helk B., Trout B. L, Vayonov V., Kayser V. PCT/US2009/047954. Filed 19th June, **2009**.
23. Chennamsetty N., Vayonov V., Kayser K., Helk B., Trout B.L. Proteins, **2011**, 79, 888–897.