

定性試験により確認した。結晶の安定性は2度上昇することが判明した(論文リスト1)。また、レーザーアブレーションによる結晶核の発生法やマイクロクリスタルを生成して種結晶化に用いる方法などについて review にまとめた。

#### D. 考察

C.研究結果の欄に記載。

#### E. 結論

- 抗体の最適化には、Hot Spotの位置を確認し、遠隔の位置での変異導入が有効である。
- ゲル上での溶液攪拌は結晶化に有効である。

#### F. 健康管理情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Aoki Y. et al. : A new practical technique for high quality protein crystallization with the solution stirring technique at the interface between high-concentrated hydrogel and solution., Jpn. J. Appl. Phys., 53 : 065502, 2014.
- ② H. Y. Yoshikawa et al. : Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding., Chem. Soc. Rev., 43 : 2147-2158, 2014.
- ③ Nakayama T. et al. : Structural features of interfacial tyrosine residue in ROBO1 fibronectin domain-antibody complex: Crystallographic, thermodynamic, and molecular dynamic analyses, Protein Science., 24, 328-340, 2014.
- ④ Kawato T. T. et al. : Crystal structure of a streptavidin mutant with low

immunogenicity., Journal of Bioscience and Bioengineering., S1389-1723(14), 2014.

- ⑤ Kawato T. et al. : Structure-based design and synthesis of a bivalent iminobiotin analogue showing strong affinity toward a low immunogenic streptavidin mutant., Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1, 1-3, 2015.
- ⑥ Kawato T. et al : Structure-based design of a streptavidin mutant specific for an artificial biotin analogue., J. Biochemistry, 2015, in press.

##### 2. 学会発表

- ① 杉山成 (他 12 名):難水溶性化合物,標的蛋白質との複合体結晶作製へ向けた新規技術開発., 日本結晶学会., 東京大学, 2014年11月
- ② 川戸達矢 (他 6 名) :人工ビオチンアナログを特異的に認識するストレプトアビジン改変体の開発., 第 14 回蛋白質科学会., 2014年6月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

無し

##### 2. 実用新案登録

PCT/JP2015/054431

「ビオチン改変体、ストレプトアビジン変異体およびその利用」(出願日 2015.2.17) 出願人: サヴィッド・セラピューティックス株式会社

##### 3. その他

無し

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

熱力学的解析技術の最適化とリード抗体の構造安定性予測

分担研究者 津本浩平 東京大学大学院工学系研究科

抗体の合理的な親和性向上を目指し、熱力学的な解析を基盤に、抗体-抗原複合体の安定な構造の予測・評価を試みる。モデルとなる複合体について、提案している設計指針の一般性を示した。遷移状態における熱力学の理解が重要であることを示した。

**A. 研究目的**

抗体の合理的な親和性向上を目指し、熱力学的な解析を基盤に、抗体-抗原複合体の安定な構造の予測・評価を試みる。研究を迅速に推進するため、熱力学的な解析基盤のさらなる向上を図る。また、他の研究班と連携することで、抗原と抗体の複合体構造の安定性予測の精度を最適化し、診断薬に資する高親和性抗体の創製に貢献する。

**B. 研究方法**

熱力学的解析技術の最適化

既構造情報が入手可能なモデルとなる単鎖抗体(scFv) 2種類について、Ala- Scanning ならびに変異体を用いた抗原との相互作用に関する熱力学的情報を獲得した。

**C. 研究結果**

熱力学的解析技術の最適化

本解析から、相互作用に関与する各アミノ酸残基のエネルギー的、構造的知見に関して今まで得られてきた以下の知見がより一般的に適用されることを明らかにした。① Hot-Spot への Ala 変異により、単変異で想定される親和性の低下に比して顕著な低下が見られる、これは発熱量の大幅な減少に現れる、②それ以外の部位は熱力学的相補、すなわち発熱量の変化がエントロピー変化量の変化により相殺されることにより。Ala 変異導入の効果がほとんど現れない、③Ala への変異導入により親和性が向上する部位が存在する、

それは Hot-Spot の構造を変化させないような相互作用界面の端に存在する部位である。以上は、特に蛋白質性抗原において、抗原抗体相互作用が面-面相互作用として性格付けできることによる。また、相互作用の遷移状態解析について、Eyring-Plot により実施することで、上記①~③について遷移状態におけるエンタルピー、エントロピー変化量を理解することの重要性を指摘することができた。

**D. 考察**

C.研究結果の欄に記載。

**E. 結論**

- モデルとなる複合体について、提案している複合体の安定性に関する設計指針の一般性を示した。
- 遷移状態における熱力学の理解が重要であることを示した。

**F. 健康管理情報**

該当無し

**G. 研究発表**

**1. 論文発表**

無し

**2. 学会発表**

無し

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

**1. 特許取得**

無し

**2. 実用新案登録**

無し

**3. その他**

無し

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

候補抗体の取得・評価とリード抗体に対するデザイン

分担研究者 向 洋平 独立行政法人 医薬基盤研究所 抗体スクリーニングプロジェクト

本申請課題は、大腸がんにおける血行性転移を事前予測し得る新規バイオマーカー候補「膜型C4.4A」を特異検出可能なモノクローナル抗体を「ファージ抗体ライブラリ技術」により取得し、我が国発の転移再発予測体外診断薬を実用化しようとするものである。

膜型C4.4Aの発現が大腸がんに対する血行性転移のマーカーと成り得ることは、分担者の森らにより見出されているが、膜型C4.4Aを特異検出するためのモノクローナル抗体が単離できておらず、本診断技術は実用化されていない。この点、我々は抗体の高速単離技術として、130億種類の多様性を有するファージヒト型抗体ライブラリの構築に成功するなど、あらゆるシーズに対する抗体を僅か2週間で単離可能な体制を樹立済みである。本研究の目的を達成するためには、膜型C4.4Aに対する抗体を複数クローン取得し、スクリーニングすることで目的の抗体を取得する必要がある。

そこで、本年度では我々が有しているファージ抗体ライブラリを用いて膜型C4.4Aに対する複数のモノクローナル抗体候補の取得を試みた。

**A. 研究目的**

大腸がんの確定診断は、術後の切除腫瘍を用いた病理診断によって行われている。この病理診断において患者の再発率に最も影響を与えるのが、中間ステージがん（stage II、III）の治療方針の決定である。

中間ステージがんでは、現在、リンパ節転移の有無により治療方針が決定されている。例えば、リンパ節転移無し（stage II：再発率15%）では原則無治療であり、リンパ節転移有り（stage III：再発率35%）には転移再発を事前予測できないという理由から、再発しない患者も含めた全例に術後化学療法が実施されている。このように現在では、stage II、stage IIIの治療方針に再発率が加味されておらず、非常に不合理な治療が行われており、患者に優しい医療の実現を目指す我が国では、早急に克服すべき課題となっている。従って、中間ステージがんにおいては、転移再発の予測精度を向上させることで、①転移再発例（高危険度群）を早期に予測し適切な先制医療（予防医療）を施すこと、②転移再発のリスクが

低い患者には、不要な化学療法を避け、患者のQOLの向上に努めること、即ち患者背景に応じた個別医療の推進が求められている。

この点、分担者の森らは、がんの転移に関与するGPIアンカー蛋白質：C4.4Aの「細胞膜への局在」が、未だバイオマーカーが存在しない血行性転移を予測し得ることを見出しており、これは既存のリンパ節転移と合わせることで、新規大腸がん転移再発予測診断に繋がる可能性を示すものであった。

これまでの森らの検討では、リンパ節転移陰性（stage II）かつ膜型C4.4A陰性であった患者は9.1%であるのに対し、リンパ節転移陽性（stage III）かつ膜型C4.4A陽性であった患者は、実に64.3%の確率で再発することが明らかとなった。一方で、同じリンパ節転移陽性（stage III）であっても、C4.4Aが陰性であれば、再発率は16.7%とstage IIの再発率と大差がないことも明らかとなった（Table 1）。即ち、膜型C4.4Aの発現による転移再発診断は、既存のリンパ節転移による転移再発診断の確度をさらに向上させ、大腸がんの先

制医療による死亡率の軽減、さらには、術後化学療法の適正化による患者QOLの向上の双方に貢献できる新たな診断技術となる。しかしながら、膜型C4.4Aを特異検出するためのモノクローナル抗体が単離できておらず、本診断技術は実用化されていない。

本研究では、如何にして膜型C4.4Aを特異検出できる抗体を取得するかがポイントとなる。これまで森らは、C4.4AのN末端近傍に対するポリクローナル抗体が細胞全体を染色すること、一方でGPIアンカー近傍の断片ペプチドに対するポリクローナル抗体が細胞膜を強く染色することを明らかとしている。この免疫染色の結果から、C4.4AのGPIアンカー近傍領域の18アミノ酸の中には、膜型C4.4Aを特異的に認識できる結合領域（エピトープ）が含まれることが強く示唆されるものの、その部位は明らかでない。通常モノクローナル抗体のエピトープは5-8アミノ酸とされ、この18アミノ酸の中にも複数のエピトープの存在が示唆されるため、膜型C4.4Aを特異認識できるモノクローナル抗体の同定には、この18アミノ酸を中心として、エピトープが異なる抗体を複数単離し、その中から膜型C4.4Aを特異認識できるクローンをスクリーニングする必要がある。

この点、我々は独自のファージ表面提示法を有効活用し、あらゆるシーズに対するヒト型抗体およびヒト型低分子抗体を取得可能な、130億種類のファージ抗体ライブラリを構築済みであり、通常の抗体作成法では取得困難なリン酸化ペプチド特異抗体をも複数単離した実績を有するなど、本申請課題における抗体単離を円滑に実施できる基盤を保有している。上記でも記載したように、これまでの森らの検討から、GPIアンカー近傍領域に対するポリクローナル抗体中に膜型C4.4Aを染色する抗体が含まれると予想される。そのため、GPIアンカー近傍に対する抗体を複数取得し、スクリーニングすることで目的の抗体を選別することが、本研究の目的を達成できると考えられる。

そこで、本年度では我々が有しているファ

ージ抗体ライブラリを用いて膜型C4.4Aに対する複数のモノクローナル抗体候補の取得を試みた。

**Table 1 : 中間ステージがん患者の再発率(n=82) 森ら**

		膜型C4.4A		
		(+)	(-)	
リンパ節転移	(+)stage III	34.2%	64.3%	16.7%
	(-)stage II	13.6%	27.3%	9.1%

## B. 研究方法

### ペプチド結合タンパク質の合成

GenScript 社に依頼し、下記に示す①~④のペプチド結合タンパク質を合成した。

- ①AGHQDRSNSGQYPAKGC 結合 KLH
- ②SGQYPAKGGPQQPHNKGK 結合 KLH
- ③AGHQDRSNSGQYPAKGC 結合 BSA
- ④SGQYPAKGGPQQPHNKGK 結合 BSA

以降、AGHQDRSNSGQYPAKGC は C4.4A<sub>301</sub>、SGQYPAKGGPQQPHNKGK は C4.4A<sub>309</sub> と略称する。

### タンパク質定量

タンパク質の定量には、BCA protein assay kit (Pierce) を使用した。

### イムノチューブによるパンニング

各ペプチド結合 BSA ( C4.4A<sub>301</sub>-BSA:11.38 mg/ml 、 C4.4A<sub>309</sub>-BSA : 3.36 mg/ml) をビカルボネートバッファー (pH 9.6) で C4.4A<sub>301</sub>-BSA は 1000 倍、C4.4A<sub>309</sub>-BSA 300 倍に希釈し、10 µg/ml の溶液を調製後、Nunc イムノチューブ (Thermo SCIENTIFIC) に添加して、室温で 12 時間静置し、固相化した。2% スキムミルク/PBS 5 ml 添加して、室温で 2 時間静置し、ブロッキングした。ブロッキング後のイムノチューブに合成ファージ抗体ライブラリ 1 ml、PBS 600 µl、4% スキムミルク/PBS 2 ml、10 mg/ml BSA/PBS 400 µl を添加して、室温で 30 分間回転、30 分間静置し、抗原とファージを結合させた。0.1% Tween 20/PBS (0.1% PBST) と PBS で各々 10 回洗浄後、100 mM triethylamine (pH 11)

を 1 ml 添加して、5 分間転倒混和し、out put ファージ溶液を回収した。回収した out put ファージ溶液に 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 500  $\mu$ l を添加して、中和した。out put ファージは予め 2YT 培地で OD<sub>600</sub>=0.4~0.5 まで培養しておいた大腸菌 TG1 株に 37°C で 30 分間感染させた。out put ファージが感染した大腸菌 TG1 株の一部を使用して、原液、100 倍希釈液、10000 倍希釈液を、100  $\mu$ l/ml ampicillin、2% glucose 含有 LB 培地プレートに播種し、タイターを測定した。残り的大腸菌 TG1 株は 4°C、3300 $\times$ g で 10 分間遠心後、2YT 培地で再懸濁した。その後、上記のプレートに播種した。タイター測定用のプレートは 37°C で 12 時間、その他のプレートは 30°C で 12 時間培養した。

#### 大腸菌 TG1 株感染ファージの増幅

培養プレートに 10% glycerol 含有 2YT 培地 5 ml 添加して、スプレッダーで穏やかに剥がした。剥がした大腸菌の一部を ampicillin (終濃度 100  $\mu$ g/ml)、2% glucose 含有 2YT 培地に添加して、200 rpm、37°C で OD<sub>600</sub>=0.4~0.5 まで培養した。その後、培養液 10 ml にヘルパーファージ ( $2 \times 10^{12}$  pfu/ml) 200  $\mu$ l を添加して、37°C、30 分間感染させた。3300 $\times$ g、10 分間遠心して、ampicillin (終濃度 100  $\mu$ g/ml)、kanamycin (終濃度 50  $\mu$ g/ml) 含有 2YT 培地で再懸濁し、30°C、200 rpm で 12 時間培養することで、ファージを産生させた。

#### ファージの回収

大腸菌培養液を 3300 $\times$ g、4°C で 30 分間遠心して、上清 40 ml に対して 20% PEG/2.5 M NaCl 10 ml 添加し、攪拌後に氷上で 30 分間静置した。その後、上記の条件で遠心して、ペレットを超純水 40 ml、20% PEG/2.5 M NaCl 10 ml で再懸濁し、氷上で 30 分間静置した。再度、上記の条件で遠心して、ペレットを PBS/10% Glycerol 2 ml に再懸濁し、11600 $\times$ g、4°C で 2 分間遠心後に上清を回収した。以後は、上記のイムノチューブによる

パンニング、大腸菌 TG1 株感染ファージの増幅、ファージの回収を 2 回繰り返した。

#### 大腸菌培養上清を用いた ELISA によるスクリーニング

パンニング後に回収したファージを大腸菌 TG1 株に感染させ、生じたコロニーを予め ampicillin (終濃度 100  $\mu$ g/ml)、2% glucose 含有 2YT 培地を添加しておいた 96 well deep プレートにピックアップし、1000 rpm、37°C で 2 時間培養した。培養液の一部に 50% Glycerol を添加し、-80°C で保存した。残りの培養液に 5 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加して、1000 rpm、30°C で 12 時間培養し、培養上清中に一本鎖抗体 (scFv-FLAG tag) を産生させた。その後、1800 $\times$ g、10 分で遠心し、培養上清を回収した。

別途 96 well プレート (Thermo SCIENTIFIC) に各ペプチド結合 BSA (C4.4A<sub>301</sub>-BSA:11.38 mg/ml、C4.4A<sub>309</sub>-BSA:3.36mg/ml) をジカルボネートバッファー (pH 9.6) で C4.4A<sub>301</sub>-BSA は 1000 倍、C4.4A<sub>309</sub>-BSA 300 倍に希釈し、10  $\mu$ g/ml の溶液を調製後、96 well プレートに添加して、室温で 12 時間静置し、固相化した。その後、PBS で 3 回洗浄して、4% スキムミルク/PBS 200  $\mu$ l 添加し、室温で 2 時間静置した。ブロッキングの後、100 倍希釈した Monoclonal Anti-FLAG M2 (SIGMA-ALDRICH) と上記で回収した培養上清を各 20  $\mu$ l、80  $\mu$ l ずつ添加して、室温で 2 時間静置し、反応させた。0.1% PBST、PBS で各 3 回ずつ洗浄して、10000 倍希釈した Goat Anti-mouse IgG-HRP conjugated (Abcam) を添加し、室温で 1 時間静置する。再度、0.1% PBST、PBS で各 3 回ずつ洗浄して、TMB+Substrate-chromogen (Dako) 100  $\mu$ l 添加し、室温で静置し、反応させた。その後、1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50  $\mu$ l 添加し、反応を停止させ、OD<sub>450</sub> で吸光度を測定した。

#### シークエンス解析による塩基配列決定

タカラバイオ株式会社に依頼し、シークエンス解析を行った。

#### 可溶性 scFv の産生誘導

まず、ELISA によるスクリーニングにより、各ペプチドに対して結合性を有するポジティブクローンの可溶性 scFv を産生誘導した。scFv の産生誘導に関しては、上記 scFv の産生誘導と同様の方法で行った。その後、大腸菌 TG1 株培養液を 7000 rpm、4℃で 15 分間遠心し、上清を 0.45 µm PES フィルターで濾過した。また、ペリプラズム画分にある scFv を回収するために、残ったペレット 1 g につき高浸透圧バッファー (500 mM スクロース、30 mM Tris-HCl、1 mM EDTA) 40 ml を添加して、懸濁後に 3500×g、10℃で 30 分間遠心した。遠心後、上清を捨て、ペレット 1 g につき冷やした超純水 25 ml 添加して、懸濁後に 10000×g、4℃で 30 分間遠心した。上清を 0.45 µm PES フィルターで濾過して、最初に回収した上清と混合し、タンパク質精製に供した。

#### 可溶性 scFv の精製

Ultra-linked rProteinA resin (Sino Biological) を使用し、可溶性 scFv を精製した。まず、超純水 100 ml を流して、resin を洗浄し、PBS 100 ml で平衡化した。平衡化後に回収した可溶性 scFv 溶液を流して、PBS 100 ml、0.1% PBST 100 ml、PBS 100 ml の順で洗浄した。その後、0.1 M Glycine-HCl (pH 2.7) を Protein A カラムに添加して、scFv を 1.2 ml ずつ 5 画分に溶出し、1 M Tris-HCl (pH 8.0) 300 µl で中和した。

#### scFv のゲル濾過

scFv のゲル濾過には AKTA Pure (GE Healthcare) を使用し、カラムは HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 Prep grade (Amesham Bioscience) を使用した。マー

カーとしてニワトリ卵白アルブミン (OVA : 40 kDa) を使用し、単量体画分のみを回収した。

#### マウスへの免疫

BALB/c、MRL/MpJmsSlc-lpr/lpr マウス (6 week, ♀) は、日本 SLC より購入した。各マウスに Titer Max Gold とペプチド結合 KLH を混合し、抗原 50 µg/mice を 1 週間おきに 4 回マウスの頸部皮下、大腿四頭筋内に各 50 µl ずつ (大腿四頭筋内には片足 25 µl ずつ) 免疫した。

#### 免疫マウスの抗原特異的抗体価測定

96 well プレート (Thermo SCIENTIFIC) にビカルボネートバッファーで 10 µl/ml に調製した各ペプチド結合 KLH を添加し、室温で 12 時間静置した。その後、PBS で 3 回洗浄して、4% ブロックエース 200 µl 添加し、室温で 2 時間静置した。ブロッキングの後、0.4% ブロックエースで 2 倍ずつ 6 段階に希釈 (2<sup>7</sup>, 2<sup>8</sup>, 2<sup>9</sup>, 2<sup>10</sup>, 2<sup>11</sup>, 2<sup>12</sup>, 2<sup>13</sup> 倍希釈) した血漿を添加し、室温で 1 時間静置した。0.05% PBST で 3 回洗浄した。その後、0.4% ブロックエースで 10000 倍希釈した Anti-mouse IgG-HRP conjugated (Abcam) 100 µl 添加し、室温で 1 時間静置した。0.05% PBST で 3 回洗浄した。洗浄後に、TMB+Substrate-chromogen (Dako) 100 µl 添加し、発色させた。発色後、2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 µl 添加し、反応を停止させ、OD<sub>450</sub> で吸光度を測定した。

### **C. 研究結果**

#### ペプチド結合 BSA に対する抗体取得

本年度では、2 種類の C4.4A の GPI アンカー近傍のペプチドに結合する scFv クローンの取得を目的とし、各ペプチド結合 BSA に対して合成ファージ抗体ライブラリを利用して、膜型 C4.4A に対するモノクローナル抗体候補の取得を試みた。これまでに C4.4A の GPI アンカー近傍に対するポリクローナル抗体が膜型 C4.4A を認識することが報告されていることから、森らがポリクローナル抗体の取

得に使用した断片ペプチドを使用した。また、これまでの検討により、GPI アンカー近傍に膜型 C4.4A を特異的に認識できるエピトープが含まれることが強く示唆されることから、より GPI アンカー近傍の断片ペプチドも使用した。合成ファージ抗体ライブラリを用いて 3 回のパンニングを行い、3<sup>rd</sup> パンニングの output ファージ感染大腸菌をモノクローン化し、その培養上清を用いた ELISA により C4.4A<sub>301</sub>, C4.4A<sub>309</sub> に結合性を有するポジティブクローンをスクリーニングした。吸光度が 0.5 以上であるクローン数を評価した結果、C4.4A<sub>301</sub>、C4.4A<sub>309</sub> に対して結合性を有する可能性のあるポジティブクローンはそれぞれ 69、32 個であった (Fig. 1)。その後、シーケンス解析により、候補クローンの塩基配列を決定したところ、C4.4A<sub>301</sub> に対して 4 種類、C4.4A<sub>309</sub> に対して 8 種類の scFv クローンを取得した。

#### マウスへの免疫

免疫マウスの脾臓から免疫ファージ抗体ライブラリを構築するために、まず C4.4A<sub>301</sub>、C4.4A<sub>309</sub> 結合 KLH を各マウス (BALB/c、MRL/MpJMsSlc-lpr/lpr) に免疫した。ヒトの C4.4A とマウスの C4.4A の相同性が高いことから、C4.4A に対する抗体価が上昇しない可能性が考えられたため、本検討では通常モノクローナル抗体の取得に使用される BALB/c マウスの他に自己免疫疾患マウスである MpJMsSlc-lpr/lpr マウスを使用した。各マウスに 4 回免疫後の抗原特異的抗体価の上昇を評価したところ、両マウスにおいて十分な上昇が認められた (Fig. 2)。今回は、免疫ファージ抗体ライブラリを構築するために抗体価を確実に上昇させるためにマウスへ 4 回免疫した。しかし、一般的に免疫回数を増やすことにより、マウス体内での親和性成熟が進み抗体の種類が減少することが考えられている。そのため、C4.4A に対する抗体をより複数取得するためには、マウスへの免疫回数を最適化する検討が必要であるかもしれないため、今後その点に関しても検討していく。

#### D. 考察

C. 研究結果の欄に記載。

#### E. 結論

当該年度は以下の知見を得た。

- 非免疫ファージ抗体ライブラリを用いて、C4.4A の細胞膜近傍のペプチドに対する抗体の取得を試みた結果、目的のペプチドに結合する可能性を有する 12 種類のクローンを取得した。

#### F. 健康管理情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

無し

##### 2. 学会発表

- ① 向 洋平, 小椋健正, 三里一貴, 永野貴士, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 新規非免疫ヒト型ファージ抗体ライブラリの構築とその品質評価., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本), 2014 年 3 月.
- ② 小椋健正, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 非免疫ファージ抗体ライブラリからの抗体取得の最適化に関する基礎検討., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本), 2014 年 3 月.
- ③ 向 洋平, 小椋健正, 三里一貴, 永野貴士, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央., 新規非免疫ファージ抗体ライブラリの構築とその品質評価., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京 (東京), 2014 年 7 月.
- ④ 三里一貴, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 独自に構築した非免疫ヒト型ファージ抗体ライブラリの品質評



価., 日本薬学会第 135 年会., 神戸(兵庫), 2015 年 3 月. (発表予定)

- ⑤ Mukai Y., Ogura T., Misato K., Nagano T., Higashisaka K., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Creation of a novel non-immune phage human antibody library which consists of four stable VH-VL pairs., 5<sup>th</sup> FIP Pharmaceutical Sciences World Congress ( PSWC ) , Melbourne (Australia), 13-16 April, 2014.
- ⑥ Mukai Y., Ogura T., Misato K., Nagano T., Higashisaka K., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Creation of a novel non-immune phage human antibody library comprising four stable VH-VL pairs., 2014 AAPS National Biotechnology Conference, San Diego (USA) , 19-21 May, 2014.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

無し

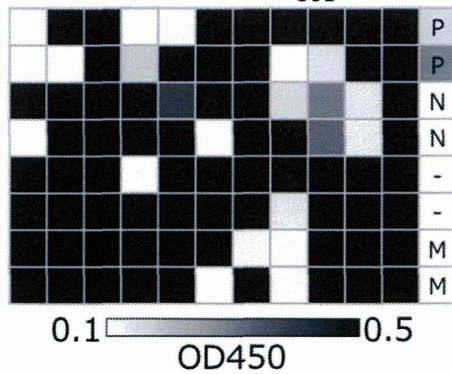
##### 2. 実用新案登録

無し

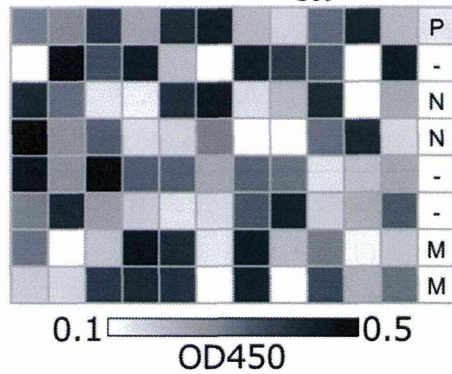
##### 3. その他

無し

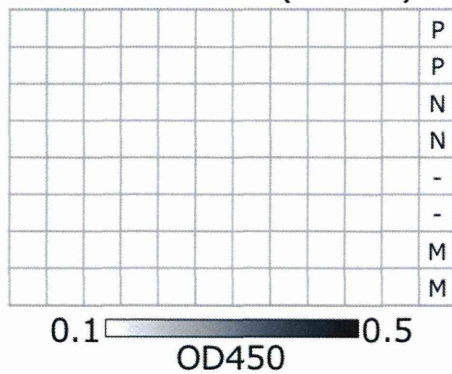
固相化抗原：C4.4A<sub>301</sub>-BSA



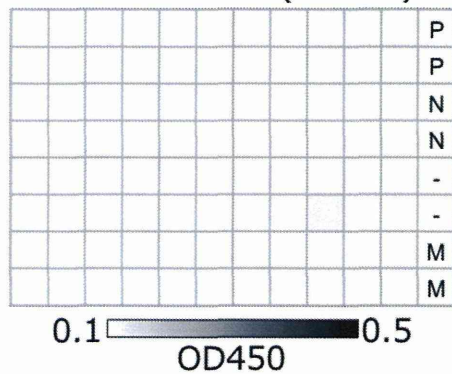
固相化抗原：C4.4A<sub>309</sub>-BSA



固相化抗原：BSA (control)



固相化抗原：BSA (control)



M : medium only、 N : Negative control of sup.、 P : sup. With anti C4.4A scFv

図1 ELISAによる親和性評価

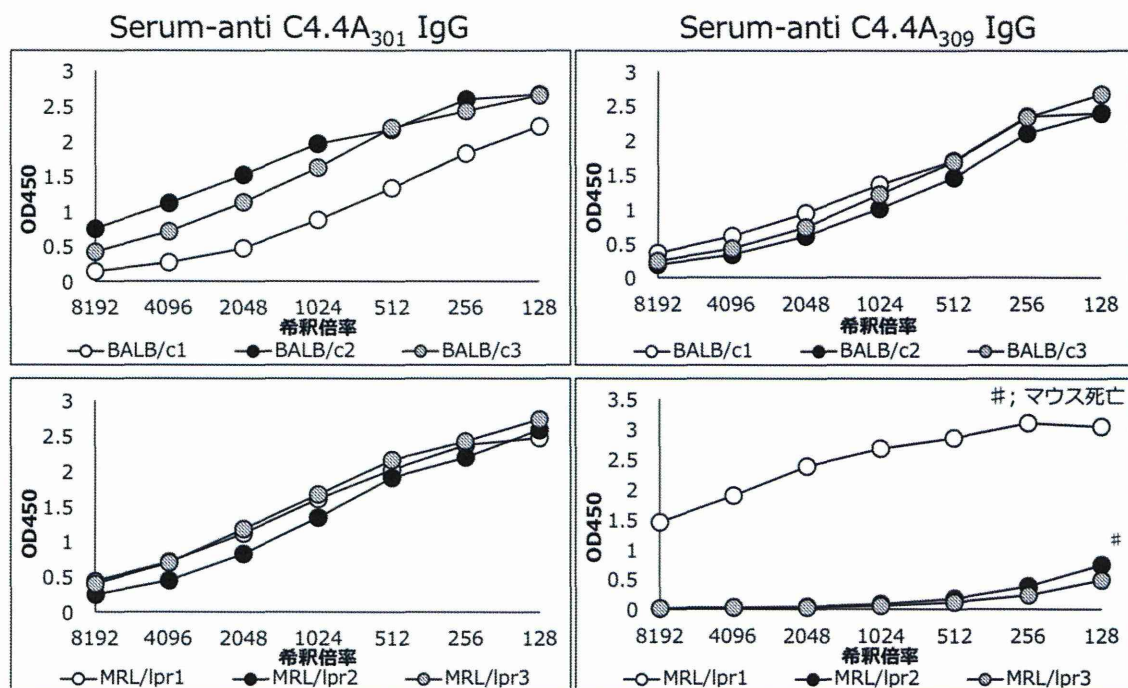


図2 免疫したマウスの血中抗体価測定

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「膜型C4.4Aを標的とした大腸がんに対する転移再発予測診断技術の開発」

機関名 国立大学法人大阪大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
分子動力学法による抗原抗体解離過程の自由エネルギー地形に関する研究(口頭)	山下雄史	分子科学討論会	2014年9月	国内
分子動力学計算で見る抗体改変の影響(口頭)	山下雄史	日本生化学会	2014年10月	国内
膜タンパク質抗体の作製とドラッグデザイン(口頭)	浜窪隆雄	日本薬学会第135年会	2015年3月(発表予定)	国内
難水溶性化合物, 標的蛋白質との複合体結晶作製へ向けた新規技術開発(口頭)	杉山成, 垣乃内啓介, 松村浩由, 安達宏昭, 丸山美帆子, 高橋義典, 吉川洋史, 吉村政志, 高野和文, 村山 聡, 井上 豪, 村田道雄, 森 勇介	日本結晶学会	2014年11月	国内
人工ビオチンアナログを特異的に認識するストレプトアビジン改変体の開発(ポスター)	川戸達矢, 溝端栄一, 杉山 暁, 土居洋文, 津本浩平, 児玉龍彦, 井上 豪	第14回蛋白質科学会	2014年6月	国内

新規非免疫ヒト型ファージ抗体ライブラリの構築とその品質評価 (口頭)	向 洋平, 小椋健正, 三里一貴, 永野貴士, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央	日本薬学会 第134年会	2014年3月	国内
非免疫ファージ抗体ライブラリからの抗体取得の最適化に関する基礎検討 (ポスター)	小椋健正, 向洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央	日本薬学会 第134年会	2014年3月	国内
新規非免疫ファージ抗体ライブラリの構築とその品質評価(口頭)	向 洋平, 小椋健正, 三里一貴, 永野貴士, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央	第30回 日本DDS学会	2014年7月	国内
独自に構築した非免疫ヒト型ファージ抗体ライブラリの品質評価 (ポスター)	三里一貴, 向洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央	日本薬学会 第135年会	2015年3月 (発表予定)	国内
Creation of a novel non-immune phage human antibody library which consists of four stable VH-VL pairs (ポスター)	Mukai Y., Ogura T., Misato K., Nagano T., Higashisaka K., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	5 <sup>th</sup> FIP Pharmaceutical Sciences World Congress	13-16 April, 2014	国外

<p>Creation of a novel non-immune phage human antibody library comprising four stable VH-VL pairs (ポスター)</p>	<p>Mukai Y., Ogura T., Misato K., Nagano T., Higashisaka K., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.</p>	<p>AAPS National Biotechnology Conference</p>	<p>19-21 May, 2014.</p>	<p>国外</p>
<p>Keynote lecture 「診断・治療のための小分子化抗体の設計について」(口頭)</p>	<p>浜窪隆雄</p>	<p>次世代バイオ医薬品創出に向けた設計・基盤技術最前線 (ダイアローグ株式会社主催)</p>	<p>2014年10月</p>	<p>国内</p>

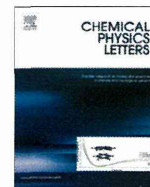
2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文 (発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外 の別
On Accurate Calculation of the Potential of Mean Force between Antigen and Antibody : A Case of the HyHEL-10-Hen Egg White Lysozyme System.	Yamashita T. and Fujitani H.	Chem. Phys. Lett. , 609 : 50-53	2014	国外
Structural features of interfacial tyrosine residue in ROBO1 fibronectin domain-antibody complex: Crystallographic, thermodynamic, and molecular dynamic analyses.	Nakayama T., Mizohata E., Yamashita T., Nagatoishi S., Nakakido M., Iwanari H., Mochizuki Y., Kado Y., Yokota Y., Satoh R., Tsumoto K., Fujitani H., Kodama T., Hamakubo T. and Inoue T.	Protein Sci., 24 : 328-340	2015	国外
Generation of antibodies against membrane proteins.	Hamakubo T, Kusano-Arai O, Iwanari H.	Biochimica et Biophysica Acta., 1844(11) : 1920-1924	2014	国外

<p>A new practical technique for high quality protein crystallization with the solution stirring technique at the interface between high-concentrated hydrogel and solution.</p>	<p>Aoki Y., Maruyama M., Takahashi Y., Yoshimura M., Yoshikawa Y. H., Sugiyama S., Adachi H., Takano K., Murakami S., Matsumura H., Inoue T., Mori Y.</p>	<p>Jpn. J. Appl. Phys., 53 : 065502</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>
<p>Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding.</p>	<p>Yoshikawa Y. H., Murai R., Adachi H., Sugiyama S., Maruyama M., Takahashi Y., Takano K., Matsumura H., Inoue T., Murakami S., Masuhara H., Mori T.</p>	<p>Chem. Soc. Rev., 43 : 2147-2158</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>
<p>Crystal structure of a streptavidin mutant with low immunogenicity.</p>	<p>Kawato T., Mizohata E., Meshizuka T., Doi H., Kawamura T., Matsumura H., Yumura K., Tsumoto K., Kodama T., Inoue T., Sugiyama A.</p>	<p>Journal of Bioscience and Bioengineering., S1389-1723(14)</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>

<p>Structure-based design and synthesis of a bivalent iminobiotin analogue showing strong affinity toward a low immunogenic streptavidin mutant.</p>	<p>Kawato T. et al.</p>	<p>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1, 1-3</p>	<p>2015</p>	<p>国外</p>
<p>Structure-based design of a streptavidin mutant specific for an artificial biotin analogue.</p>	<p>Kawato T., Mizohata E., Shimuzu Y., Meshizuka T., Yamamoto T., Takasu N., Matsuoka M., Matsumura H., Kodama T., Kanai M., Doi H., Inoue T., Sugiyama A.</p>	<p>J. Biochemistry</p>	<p>2015, in press.</p>	<p>国外</p>





# On accurate calculation of the potential of mean force between antigen and antibody: A case of the HyHEL-10-hen egg white lysozyme system



Takefumi Yamashita\*, Hideaki Fujitani

Laboratory for Systems Biology and Medicine, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904, Japan

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 19 April 2014

In final form 16 June 2014

Available online 20 June 2014

## ABSTRACT

We study several free energy calculation methods in the dissociation process of lysozyme and its antibody. We introduce the multi-step targeted molecular dynamics (mTMD) method to determine the dissociation pathway. The dissociation free energy calculated along the mTMD dissociation pathway is significantly lower than that along the dissociation pathway determined by the steered molecular dynamics (SMD) method. This indicates that SMD leads to a meta-stable dissociation state. While the SMD restrains the distance between the two proteins, the mTMD restrains the internal structures additionally. We discuss the effect of fragility of the protein structures on the free energy calculations.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Interactions of proteinaceous antigens with antibodies play important roles in the immune system, which recognize and remove foreign molecules. Because the antibodies show high specificity and high affinity for the antigens, there have been many attempts to develop artificial antibodies that can be used for cancer treatments [1,2]. In particular, efficient antibody design is one of the important subjects in the pharmaceutical field, and therefore many computational studies have been conducted [3–5]. For designing a new antibody as well as investigating the antigen–antibody interaction, accurate calculation of the binding free energy is critical. However, it is still difficult to calculate and predict the binding free energy accurately, despite of the rapid advancement of computer. Although several alchemical free energy evaluation methods [6] with all-atom molecular dynamics (MD) simulations (e.g., MP-CAFEE [7–9]) have been applied to small compound–protein interactions successfully, those methods require huge computational resource for the protein–protein interactions.

The potential of mean force (PMF) is one useful property to describe the free energy change associated with a dissociation process. In the case that a ligand is buried deep inside the protein, it is quite difficult to define a one-dimensional dissociation coordinate due to its high-dimensionality [10–13]. In contrast, a typical interface between an antigen and its antibody is not too intertwined, and thus the distance between centers of mass (COMs) of the

proteins can be simply used as a dissociation coordinate [14,15]. For example, a complex of hen egg lysozyme (HEL) and its antibody, HyHEL-10, has a smooth interface (Figure 1). The purpose of the present study is to assess several free energy calculation methods in the dissociation process of HEL and HyHEL-10. Note that this system was extensively studied from the experimental aspects [16–19], and therefore can be regarded as one useful benchmark system.

To calculate a PMF with the umbrella sampling (US) technique, the steered molecular dynamics (SMD) [13,20] is often used to generate initial coordinates for each window region. However, this kind of methods always overestimates the experimental binding free energy largely. Although several new approaches that adopt Jarzynski's equality for extracting a PMF from SMD trajectories (JE/SMD) [21,22] have been studied very recently, to develop an accurate PMF calculation method is still a challenging subject.

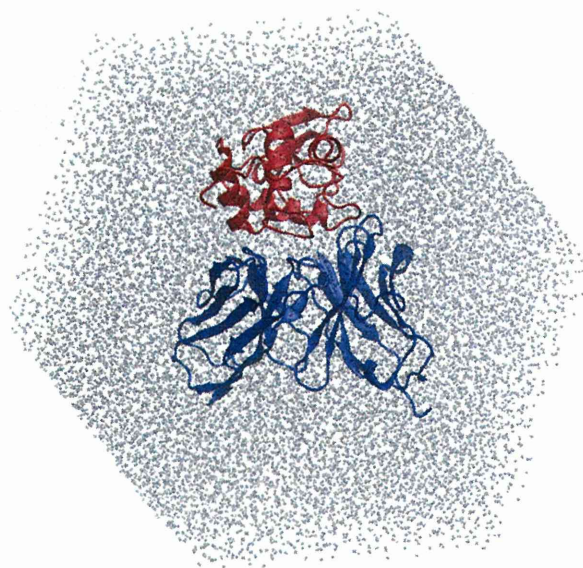
While SMD restrains only the distance between the COMs, targeted molecular dynamics (TMD) controls all the protein coordinates and leads the system to a target conformation [23]. In the present Letter, we modified the TMD method in order to determine the dissociation pathway more strictly, and used it for preparing initial coordinates of the US calculations. In the new TMD method, the TMD simulation is split into several steps, and therefore the new TMD method is called multi-step TMD (mTMD).

Because the SMD method restrains only the distance between the COMs, the pulling force has the potential for distorting the structures of proteins artificially. In contrast, mTMD restrains all coordinates of selected atoms and can keep the respective protein structures, while extending the distance between the COMs. As discussed below, the dissociation free energy calculated from the mTMD dissociation path is lower than that from the SMD

\* Corresponding author.

E-mail address: [yamashita@lsbm.org](mailto:yamashita@lsbm.org) (T. Yamashita).





**Figure 1.** Antigen–antibody system. Red and blue ribbons are HEL and HyHEL-10, respectively. Gray dots represent water oxygen atoms. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

dissociation path. (In the paper, the dissociation free energy is defined as the difference between PMF values at the minimum and dissociated structures). This result indicates that the SMD leads to a meta-stable dissociation state. We discuss the effect of the artificial deformation of the proteins on the free energy calculations.

## 2. Methods

### 2.1. Materials and equilibration

In order to obtain an equilibrated reference structure, we conducted three isothermal isobaric MD simulations for 200 ns and selected one final structure. The initial coordinates were taken from the crystal structure (PDB entry: 2DQJ) [16]. For the proteins, we used the FUJI force field [24], which was recently proved to be a good force field [25]. The complex was surrounded with 18464 TIP3P water molecules, 55 Na<sup>+</sup> ions, and 60 Cl<sup>-</sup> ions. Temperature and pressure were controlled by the Nose–Hoover method ( $T = 298$  K,  $\tau_T = 1$  ps) and the Berendsen method ( $p = 1$  atm,  $\tau_p = 10$  ps), respectively. The time step was set to be 2 fs. All the chemical bonds were constrained with the LINCS method. The long-ranged electrostatic interactions were calculated using the PME method. All the MD simulations were performed with GROMACS ver. 4.5.5 [26] in this work.

### 2.2. Steered molecular dynamics

The distance between the COM of HEL and the COM of HyHEL-10 was employed as a dissociation coordinate. For the SMD simulation, the distance between the two COMs was restrained with a harmonic potential, the force constant of which was set to be 4000 kJ/mol/nm<sup>2</sup>. We examined three different pulling speeds; fast (0.00125 nm/ps), medium (0.00025 nm/ps), and slow (0.00005 nm/ps). For the fast, medium, and slow pulling speed, 24, 12, and 12 SMD calculations were performed, respectively. By using the Jarzynski equality, PMFs were derived from the non-equilibrium works of the pulling force directly.

The US is another method to calculate the PMF along the dissociation path. Here, we determined the dissociation path by using the SMD simulation, which is described above. The distance between the COMs of HEL and HyHEL-10 is about 2.76 nm at the equilibrated reference structure, so we selected structures the COM–COM distances of which were nearly equal to 2.8, 2.9, ..., 4.0 nm. The structures were used as initial structures of the following US simulations. This procedure is denoted by US/SMD. Here, three PMFs were calculated for three selected slow SMD trajectories, respectively. In each US window, four MD simulations with different initial velocities were performed for 10 ns. All the parameters of the US were the same as in the equilibration MD calculations except for the presence of the umbrella potential. The sampled data were merged with the WHAM method [27] to derive PMFs.

### 2.3. Multi-step targeted molecular dynamics

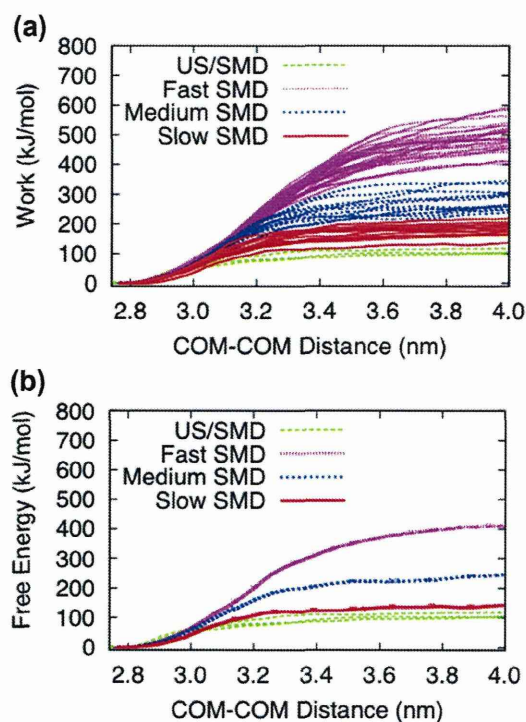
To increase the COM–COM distance with keeping the respective protein structures, we developed a new type of the TMD methods, the spirit of which is to lead the system to a given target structure. While the original TMD method [23] decreases the root mean square deviation (RMSD) to a target structure gradually, we employed the following stepwise strategy. (Accordingly, the new TMD method is named multi-step TMD (mTMD)). First, the COM–COM distance of the reference structure was increased to 2.8 nm by conducting the translational coordinate transformation of the respective proteins along the vector connecting the two COMs. After that, a MD simulation was performed for 200 ps. During the MD simulation, all the heavy atom coordinates of proteins were restrained to the coordinates of the reference structure with harmonic potentials. The force constant was set to be 1000 kJ/mol/nm<sup>2</sup>. Then, the COM–COM distance of the reference structure was increased to 2.85 nm by conducting the translational coordinate transformation. These procedures were iterated until the COM–COM distance exceeded 4.0 nm. The final structures of the mTMD simulations near the distances of 2.8, 2.9, ..., 4.0 nm were used as initial structures of the following US simulations, which were exactly the same as in US/SMD except for the initial coordinates of US windows. Thus, in the US calculation, only the COM–COM distance was restrained with the harmonic potential and the sampled data were merged by WHAM to obtain the PMF. This US procedure is denoted by US/mTMD. Four PMFs were calculated for four mTMD trajectories, respectively.

To examine the US/mTMD method in more detail, we calculated PMFs for the LN32D mutant [19]. The initial structure was taken from the crystal structure (PDB entry: 3A6B) [19]. The computational procedure and parameters for this system were the same as for the wild type (WT).

## 3. Results and discussion

Figure 2a shows non-equilibrium works for 24 fast, 12 medium, and 12 slow SMD trajectories. When the pulling speed was slower, the non-equilibrium works distribute in the lower energy region. In the JE/SMD method, non-equilibrium works of SMD trajectories were averaged through the Jarzynski equality [28] to lead the PMFs. Therefore, the PMFs calculated by JE/SMD with fast/medium speed overestimated the true PMF, although the exponential average form enhances the effect of the low non-equilibrium work (Figure 2b). The fast/medium pulling, which requires reasonably short trajectories to dissociate the antigen from the antibody, is not so considerably faster than that used in the previous report [21]. However, the overestimation of PMF indicates that several orders of magnitude more trajectories should be required to obtain





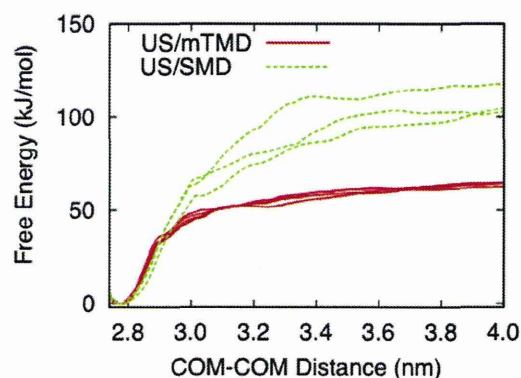
**Figure 2.** (a) Non-equilibrium works for fast pulling (pink), medium pulling (blue), and slow pulling (red). For comparison, PMFs calculated by US/SMD are given in green lines. (b) PMFs calculated from the non-equilibrium works through the Jarzynski equality. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the correct PMF. In addition, the exponential form of Jarzynski's equality makes the statistical averaging difficult [29]. Even though the non-equilibrium works of the slow SMD distributed in the lower energy region than those of fast/medium SMD, they were higher than the PMF calculated by US/SMD, and thus resulted in the overestimation of PMF (Figure 2b).

Cuendet and Michielin [21] considered that the main reason of the overestimation was that the artificial pulling induced rapid internal rotation and deformation. They introduced internal constraints to modify JE/SMD and showed their new method could improve the PMF calculation markedly. The US method may also eliminate the effects of the internal rotation and deformation to some extent. In fact, the US calculation sampled data directly from the equilibrium states, while the preceding SMD calculations were used only to generate the initial coordinates for the US trajectories. Thus, the initial velocities were reset in the US calculation, and therefore the internal rotation was thermalized. Also, the US simulations equilibrated the protein structures to some extent in each window. Due to these effects, we consider that the US/SMD method resulted in lower PMF than the JE/SMD method.

To treat the internal structures more carefully and to investigate their effect on the PMF calculations, we introduced mTMD in this work. While SMD restrains only the COM-COM distance, mTMD limits the internal coordinates additionally. Figure 3 shows that the PMFs calculated through the US/mTMD method have lower dissociation free energies than those calculated through the US/SMD method. Because the significant difference of the PMFs was attributed to the difference of the generated dissociation states but not to some statistical errors, the SMD trajectories lead the system to the meta-stable dissociation state.

Interestingly, the dissociation free energy calculated from the US/mTMD (61.2 kJ/mol) was only 9.5 kJ/mol larger than the experimental binding free energy (51.7 kJ/mol) [16]. In addition, we



**Figure 3.** PMFs calculated by US/mTMD (red) and US/SMD (green). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

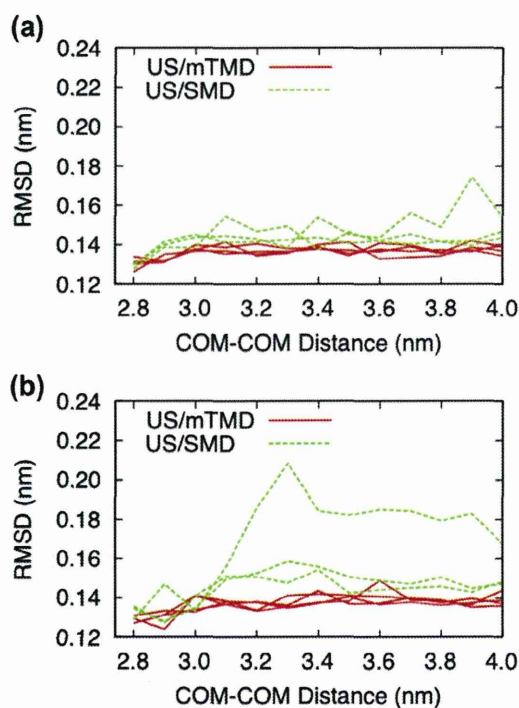
calculated the PMF of the LN32D mutant with US/mTMD. The calculated value of the dissociation free energy (46.0 kJ/mol) is again slightly larger than the experimental binding free energy (40.3 kJ/mol) [19]. Because the dissociation free energies derived by the US/mTMD correlated with those of the experimental binding free energies, the US/mTMD might be one useful tool to predict the binding free energy.

The restraints of the internal coordinates are not always appropriate. If the formation of the antigen–antibody complex induces large structural deformation in the real system, the restraints of the protein structures hinder the mTMD trajectories from determining the correct dissociation state. Fortunately, neither HEL nor HyHEL-10 deform largely in the real complex formation. For example, the structures sampled in the MD simulation of the solvated HEL are quite similar to those sampled in the MD simulation of the solvated HEL–HyHEL-10 complex. Therefore, we consider that the mTMD trajectories never result in harmful effects. Rather, the restraints of the internal coordinates prevent the artificial deformation, when the dissociation pathway is generated computationally.

To characterize the protein deformation, we calculated the averaged RMSD from the equilibrated reference structure for HyHEL-10 and HEL in each US window. Figure 4 shows that the deformation observed in the US/mTMD procedure is suppressed and significantly smaller than that observed in the US/SMD procedure. In particular, SMD changed the HEL structures much more than mTMD. This will be a dominant reason US/SMD still overestimates the binding free energy largely.

In the US calculation, when the initial configuration of the US trajectory is far from the equilibrium state in the US window, the sampled conformations may also stay far from the true equilibrium state. In particular, because the energy landscape of the protein system is complex, the system can stay in the metastable state during the US calculation. In the US/SMD calculation, this problem happens because the dissociation path generated by SMD is not accurate. In this sense, the overestimation by US/SMD is closely related to so-called ‘Hamiltonian lag’ in the slow growth calculations or the thermodynamic integration calculations [30]. In these cases, the Hamiltonian is changing so fast that the system conformation cannot follow the change and the system stays far from the true equilibrium state for the instantaneous Hamiltonian, which results in the significant error in the free energy calculation. From this viewpoint, the success of the US/mTMD method may be attributed to the fact that the mTMD trajectory generates the initial configurations in sufficiently close proximity to the equilibrium states for the US Hamiltonians. (See Supplementary information for more details.)





**Figure 4.** RMSDs from the equilibrated reference structures of (a) HyHEL-10 and of (b) HEL.

#### 4. Concluding remarks

In this Letter, we assessed several free energy calculation methods in the dissociation process of HEL and its antibody, HyHEL-10. One of the most widely used methods is the SMD method for generating dissociation pathway. In the JE/SMD method, the PMF can be calculated directly from the non-equilibrium works associated with the SMD trajectories. However, in order to obtain the correct PMF, we need to decrease the pulling speed and/or to increase the number of the sampled SMD trajectories. Therefore, the huge computational resource and/or the methodological progress will be required. An alchemical free energy calculation method, MP-CAFEE, is also based on the Jarzynski equality, but can predict the binding free energy of a small ligand and its target protein successfully by employing the Bennett acceptance ratio method [7–9].

Another way to calculate of the PMF along the dissociation pathway is the US method. Our results showed that the US could provide better PMFs than the JE, probably because the excitation of internal rotation was suppressed and the protein structures were equilibrated to some extent in the US calculations. In this work, we further introduced the mTMD method instead of the SMD to investigate the effect of the artificial deformation of proteins on the free energy calculations. In case of mTMD, the restraints of the protein structures prevent the artificial deformation of the proteins. Thus, the dissociation free energy calculated with US/mTMD was lower than that calculated with US/SMD. This result indicated that SMD lead the system to a meta-stable dissociation state. Furthermore, the protein deformation was directly observed in the structural analysis of the US trajectories (Figure 4). In the real system, the dissociation process would take much longer time than in our SMD simulations so that the water

molecules can invade the antigen–antibody interface without affecting the internal structures of both antigen and antibody. Note that the water behavior near biomolecules also affects the hydrated proton properties and plays important roles in the biological systems [31–33].

From the practical aspect, it is interesting that the dissociation free energy calculated by the US/mTMD method correlated with the experimental binding free energy very well. While the calculated free energies were 61.2 and 46.0 kJ/mol for WT and LN32D, respectively, the experimental values were 51.7 and 40.3 kJ/mol for WT and LN32D, respectively. Applications of the US/mTMD method to the design of antibodies will be an interesting subject in future.

#### Acknowledgements

This research has been funded by the FIRST Kodama project and partly by MEXT SPIRE Supercomputational Life Science (hp130006). We thank Prof. T. Kodama, Prof. T. Hamakubo, Prof. K. Tsumoto, and Dr. Y. Takamatsu for their valuable discussion.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpl.2014.06.028>.

#### References

- [1] <http://www.mdadd.org/en/>.
- [2] I. Hwang, S. Park, *Drug Discov. Today: Technol.* 5 (2008) e43.
- [3] S.M. Lippov, K.D. Wittrup, B. Tidor, *Nat. Biotech.* 25 (2007) 1171.
- [4] V. Potapov et al., *J. Mol. Biol.* 384 (2008) 109–119.
- [5] H. Beard, A. Cholleti, D. Pearlman, W. Sherman, K.A. Loving, *PLoS One* 8 (2013).
- [6] J.D. Chodera, D.L. Mobley, M.R. Shirts, R.W. Dixon, K. Branson, V.S. Pande, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21 (2011) 150.
- [7] H. Fujitani et al., *J. Chem. Phys.* 123 (2005) 084108.
- [8] H. Fujitani, Y. Tanida, A. Matsuura, *Phys. Rev. E* 79 (2009) 021914.
- [9] H. Fujitani, K. Shinoda, T. Yamashita, T. Kodama, *J. Phys.: Conf. Ser.* 454 (2013) 012018.
- [10] S. Aci-Seche, M. Genest, N. Garnier, *FEBS Lett.* 585 (2011) 2599.
- [11] M. Perakyla, *Eur. Biophys. J.* 38 (2009) 185.
- [12] L. Martinez, I. Polikarpov, M.S. Skaf, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 10741.
- [13] H. Grubmuller, B. Heymann, P. Tavan, *Science* 271 (1996) 997.
- [14] L. Wang, S.W.I. Siu, W. Gu, V. Helms, *Biopolymers* 93 (2010) 977.
- [15] J. Neumann, K.-E. Gottschalk, *Biophys. J.* 97 (2009) 1687.
- [16] M. Shiroishi, K. Tsumoto, Y. Tanaka, A. Yokota, T. Nakanishi, H. Kondo, I. Kumagai, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 6783.
- [17] A. Yokota, K. Tsumoto, M. Shiroishi, H. Kondo, I. Kumagai, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 5410.
- [18] M. Shiroishi et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 23042.
- [19] A. Yokota, K. Tsumoto, M. Shiroishi, T. Nakanishi, H. Kondo, I. Kumagai, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 7686.
- [20] J.A. Lemkul, D.R. Bevan, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 1652.
- [21] M.A. Cuendet, O. Michielin, *Biophys. J.* 95 (2008) 3575.
- [22] H. Fukunishi, J. Shimada, K. Shiraishi, *Biochemistry* 51 (2012) 2597.
- [23] J. Schlitter, M. Engels, P. Kruger, *J. Mol. Graphics* 12 (1994) 84.
- [24] H. Fujitani, A. Matsuura, S. Sakai, H. Sato, Y. Tanida, *J. Chem. Theory Comput.* 5 (2009) 1155.
- [25] J. Vymetal, J. Vondrasek, *Chem. Phys. Lett.* 503 (2011) 301.
- [26] B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl, *J. Chem. Theory Comput.* 4 (2008) 435.
- [27] J.S. Hub, B.L. de Groot, D. van der Spoel, *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2010) 3713.
- [28] C. Jarzynski, *Phys. Rev. Lett.* 78 (1997) 2690.
- [29] M.R. Shirts, E. Bair, G. Hooker, V.S. Pande, *Phys. Rev. Lett.* 91 (2003) 140601.
- [30] D.A. Pearlman, P.A. Kollman, *J. Chem. Phys.* 91 (1989) 7831.
- [31] T. Yamashita, *JPS Conf. Proc.* 1 (2014) 013086.
- [32] T. Yamashita, G.A. Voth, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 1147.
- [33] T. Yamashita, G.A. Voth, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 592.