

# Anti-EGFR antibody 528 binds to domain III of EGFR at a site shifted from the cetuximab epitope

## Scientific Reports, in press (2021)

Koki Makabe, Takeshi Yokoyama, Shiro Uehara, Tomomi Uchikubo-Kamo, Mikako Shirouzu, Kouki Kimura, Kouhei Tsumoto, Ryutaro Asano, Yoshikazu Tanaka, and Izumi Kumagai

### Summary

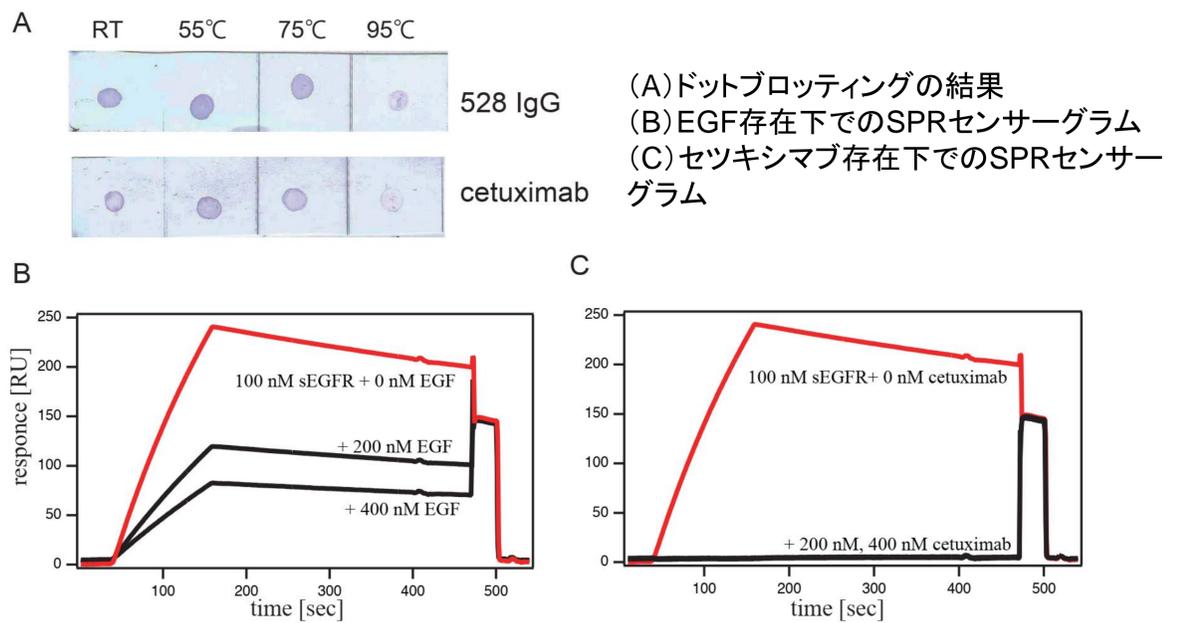
抗体は、その抗原を特異的に認識する性質を利用して、ガン治療に広く利用されてきた。上皮成長因子受容体(EGFR)はガン細胞表面に発現される主要なガン抗原であり、リガンドの上皮成長因子(EGF)と結合するとリン酸化シグナルを介して細胞の成長と増殖を誘発する。EGFRに結合するいくつかの抗体が開発されており、これらは現在ガン治療に利用されている。

抗ガン剤開発を目指し、抗EGFR抗体の一種である528の抗体工学研究が行われてきた。本研究では、528とEGFRの細胞外領域(sEGFR)との相互作用を結合解析と構造解析によって調べた。熱処理を加えたsEGFRを用いたドットブロッキング解析と表面プラズモン共鳴結合解析から、528はsEGFRの3次元構造を認識し、現在臨床現場で使用されている抗EGFR抗体セツキシマブと競合的にsEGFRに結合することが示された。528Fab-sEGFR複合体の負染色電子顕微鏡単粒子解析では、528がsEGFRのドメインIIIへ結合することが明らかになった。EGF及びセツキシマブも同様にEGFRのドメインIIIに結合することから、528が競合阻害することがわかった。528Fab-sEGFR複合体の2次元平均分類とセツキシマブ-sEGFR複合体の結晶構造を比較すると、528がセツキシマブのエピトープと同一ではなく、セツキシマブのエピトープからシフトした部位に結合しており、薬剤耐性EGFR変異を免れる可能性が示唆された。

### ドットブロッキング及び表面プラズモン共鳴法による結合機能性解析

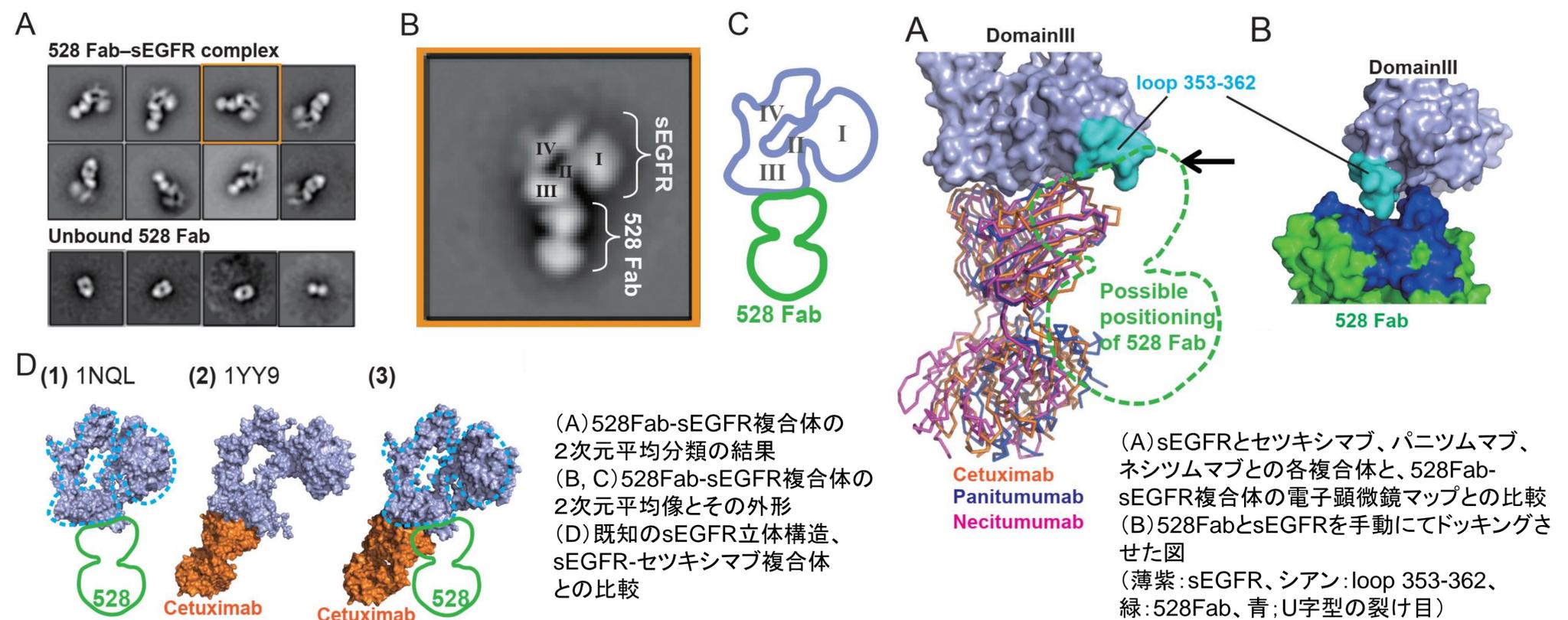
加熱処理したsEGFRを抗原サンプルとして用いてドットブロッキング解析を行った。528は55°C及び75°Cで熱処理されたsEGFRには結合できたが、95°Cで熱処理したsEGFRに対しては結合が低下した。このことから、528の認識には、sEGFRの3次元構造が必要であることがわかった。つまり、528のEGFRの認識にはアミノ酸配列の短いセグメントではなく、折りたたまれた可溶性の細胞外ドメインが必要であることが示唆された。

また、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて、528とsEGFRの相互作用を観察した。sEGFRを固定化したセンサーチップに対して528とともにEGFまたはセツキシマブを同時に添加したところ、528のsEGFRへの結合が阻害された。EGF及びセツキシマブがsEGFRのドメインIII領域に結合するという以前の報告を考慮すると、528はsEGFRのドメインIIIと結合するが、その結合部位の一部はEGFやセツキシマブと重なっていることが示唆された。



### 528Fab-sEGFR複合体の負染色電子顕微鏡単粒子解析

電子顕微鏡を用いた負染色単粒子解析により528Fab-sEGFR複合体の立体構造情報の取得を目指した。528Fab-sEGFR複合体の負染色像から、528はセツキシマブやEGFと同様にsEGFRのドメインIIIの同じ側に結合していることがわかった。しかし、528とセツキシマブは共にsEGFRのドメインIIIに結合するものの、結合位置にわずかな違いがあることがわかった。現在、臨床現場で利用されている3つの主要な抗EGFR抗体薬(セツキシマブ、ネシツムマブ、パニツムマブ)は、比較的近いエピトープを標的としている。528のエピトープがこれらの3つのエピトープと異なることは、これら3つの抗体の共通エピトープ領域内に変異が生じ、それらの抗体のEGFRとの結合が阻害された場合においても、528は結合阻害を回避できる可能性が示唆された。



(A) 528Fab-sEGFR複合体の2次元平均分類の結果  
(B, C) 528Fab-sEGFR複合体の2次元平均像とその外形  
(D) 既知のsEGFR立体構造、sEGFR-セツキシマブ複合体との比較

(A) sEGFRとセツキシマブ、パニツムマブ、ネシツムマブとの各複合体と、528Fab-sEGFR複合体の電子顕微鏡マップとの比較  
(B) 528FabとsEGFRを手動にてドッキングさせた図  
(薄紫: sEGFR、シアン: loop 353-362、緑: 528Fab、青; U字型の裂け目)