

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291704** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.12.02

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.17

(54) **НОВЫЕ АНТИТЕЛА DDR1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/949,300**

(32) **2019.12.17**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/065618**

(87) **WO 2021/127185 2021.06.24**

(71) Заявитель:

**ДЗЕ БОРД ОФ РИДЖЕНТС
ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ТЕХАС СИСТЕМ; ДЗЕ ДЖОРДЖ
ВАШИНГТОН ЮНИВЕРСИТИ (US)**

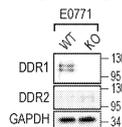
(72) Изобретатель:

**Чжан Нингуань, Ань Чжицян, Дэн
Хуэй, Сунь Сюэзе, Ли Жун (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Данное изобретение относится к антителам, связывающимся с рецептором 1 опухолевого дискоидинового домена (DDR1), и к применению этих антител для выявления и лечения рака. Так, в одном аспекте данного изобретения предлагается выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с DDR1. В определенных вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент при связывании с DDR1 модулирует активность DDR1, т.е. супрессирует DDR1.



202291704
A1

202291704
A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574649EA/042

НОВЫЕ АНТИТЕЛА DDR1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США с серийным номером 62/949 300, поданной 17 декабря 2019 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

ДЕКЛАРАЦИЯ О СПОНСИРУЕМЫХ ИЗ ПРАВИТЕЛЬСТВЕННОГО БЮДЖЕТА ИССЛЕДОВАНИЯХ

[2] Данное изобретение было выполнено при правительственной поддержке по гранту № CA220578, предоставленному Национальным институтом здравоохранения США. Правительство имеет определенные права на данное изобретение.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[3] Перечень последовательностей представлен наряду с описанием в виде текстового файла в формате ASCII с именем P0362WO_ST25.txt, датой создания 17 декабря 2020 г. и размером 127 килобайт. Информация в электронном формате Перечня последовательностей является частью описания и полностью включена в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

1. Область техники

[4] Данное изобретение в целом относится к областям медицины, онкологии и иммунологии. Более конкретно, данное изобретение относится к антителам, которые связываются с DDR1 и с помощью которых можно лечить рак, включая рак молочной железы.

2. Описание известного уровня техники

[5] Аберрантная экспрессия белков рецепторов 1 (DDR1) и 2 (DDR2) опухолевого дискоидинового домена ассоциируется с прогрессированием множества типов солидного рака, включая рак молочной железы (Valiathan *et al.*, 2012; Rammal *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2016; Bayer *et al.*, 2019). Опубликованные данные подтверждают роль белков DDR в содействии прогрессированию опухоли и метастатическому потенциалу (Gao *et al.*, 2016; Bayer *et al.*, 2019, Hidalgo-Carcedo *et al.*, 2011; Marcotte *et al.*, 2012). Однако генетическая абляция *Ddr1* у мышей MMTV-ПуМТ способствует спонтанному онкогенезу (Takai *et al.*, 2018), что указывает на стадийно-зависимую функцию опухолевого DDR1 в развитии и прогрессировании рака.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] Таким образом, в одном аспекте данного изобретения предлагается выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с DDR1. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент при связывании с DDR1 модулирует активность DDR1, *m. e.* подавляет DDR1. В определенных вариантах осуществления антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент при связывании с DDR1 специфически блокирует связывание лигандов с DDR1.

[7] В одном аспекте выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область (VL) легкой цепи (LC) и переменную область (VH) тяжелой цепи (HC), содержащие спаренные с клоном аминокислотные последовательности CDR, как указано в **Таблице 1** и **Таблице 2** соответственно; и их варианты, при этом одна или большее количество LC-CDR и/или одна или большее количество HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело мыши, грызуна, кролика, химерное, гуманизованное или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь цепи VL и VH с аминокислотными последовательностями, по меньшей мере на 90% или 95% идентичными спаренным с клоном последовательностям из **Таблицы 3** и **Таблицы 4** соответственно. В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь цепи VL и VH, кодируемые последовательностями нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 80% или 90% идентичными спаренным с клоном последовательностям из **Таблицы 8** и **Таблицы 9** соответственно. В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет цепи VL и VH с аминокислотными последовательностями, идентичными спаренным с клоном последовательностям из **Таблицы 3** и **Таблицы 4** соответственно. В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь цепи VL и VH, кодируемые последовательностями нуклеиновых кислот, идентичными спаренным с клоном последовательностям из **Таблицы 8** и **Таблицы 9** соответственно.

[8] Варианты могут быть такими, в которых одна или большее количество HC-CDR или LC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации. В определенных вариантах осуществления каждая CDR определяется в соответствии с определением по Kabat, определением по Chothia, определением IMGT, комбинацией определения по Kabat и определения по Chothia, определением AbM или определением контакта CDR.

[9] В другом аспекте данное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует за один и тот же эпитоп с антителом, имеющим спаренные с клоном аминокислотные последовательности CDR легкой и тяжелой цепей из **Таблицы 1** и **Таблицы 2** соответственно.

[10] В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело, описанное в данном документе, представляет собой химерное, гуманизованное или человеческое антитело. В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело, описанное в данном документе, относится к типу IgG1, IgG2,

IgG3 или IgG4. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, представляет собой рекомбинантное антитело ScFv (вариабельный одноцепочечный фрагмент), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент.

[11] В другом аспекте данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как предусмотрено в данном документе, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

[12] В другом аспекте предлагается выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе.

[13] В другом аспекте предлагается вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе.

[14] В другом аспекте предлагается клетка-хозяин, содержащая вектор, как описано в данном документе. Клеткой-хозяином может быть клетка млекопитающего. Клеткой-хозяином может быть СНО-клетка.

[15] В другом аспекте предлагается гибридома, кодирующая или продуцирующая выделенное моноклональное антитело, как описано в данном документе.

[16] В другом аспекте предлагается способ получения антитела. Указанный способ может включать культивирование клетки-хозяина, как описано в данном документе, в условиях, подходящих для экспрессии антитела и выделения антитела.

[17] В другом аспекте предлагается белок химерного антигенного рецептора (CAR), содержащий антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе.

[18] В другом аспекте предлагается выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует белок CAR, как описано в данном документе.

[19] В другом аспекте предлагается сконструированная клетка, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления указанная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку или миелоидную клетку. В другом аспекте предлагается способ лечения или ослабления последствий рака или лечения или ослабления фиброза (например, фиброза органов) у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как определено в данном документе. При лечении рака указанный способ может уменьшать или эрадикаровать опухолевую массу у субъекта, может уменьшать количество опухолевых клеток, может уменьшать размер опухоли, может эрадикаровать опухоль у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак, подвергаемый лечению, представляет собой рак молочной железы.

[20] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить местно, внутривенно, внутриартериально, внутриопухолево или подкожно. В некоторых вариантах осуществления указанный способ может дополнительно включать введение субъекту одного или большего количества лекарственных средств, выбранных из группы, состоящей

из ингибитора топоизомеразы, антрациклинового ингибитора топоизомеразы, антрациклина, даунорубицина, нуклеозидного ингибитора метаболизма, цитарабина, гипометилирующего агента, цитарабина в низких дозах (LDAC), комбинации даунорубицина и цитарабина, липосом даунорубицина и цитарабина для инъекций, Vuxeos®, азациитидина, Vidaza®, децитабина, полностью транс-ретиноевой кислоты (ATRA), мышьяка, триоксида мышьяка, дигидрохлорида гистамина, Ceplene®, интерлейкина-2, альдеслейкина, Proleukin®, гемтузумаба, озогамицина, Mylotarg®, ингибитора FLT-3, мидостаурина, Rydapt®, клофарабина, ингибитора фарнезилтрансферазы, децитабина, ингибитора IDH1, ивонидениба, Tibsovo®, ингибитора IDH2, энасиденаба, Idhifa®, сглаженного ингибитора (CMO), глаздегиба, ингибитора аргиназы, ингибитора IDO, эпикадостата, ингибитора BCL-2, венетоклакса, Venclexta®, комплексного производного платины, оксалиплатина, ингибитора киназы, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора киназы PI3, ингибитора ВТК, ибрутиниба, IMBRUVICA®, акалабрутиниба, CALQUENCE®, занубрутиниба, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA-4, антитела к LAG3, антитела к ICOS, антитела к TIGIT, антитела к TIM3, антитела к CD40, антитела к 4-1BB, антитела к CD47, антитела к SIRP1 α или слитого белка, антагониста E-селектина, антитела, связывающегося с опухолевым антигеном, антитела, связывающегося с маркером поверхности Т-клеток, антитела, связывающегося с маркером поверхности миелоидных клеток или НК-клеток, алкилирующего агента, нитромочевинного агента, антиметаболита, противоопухолевого антибиотика, алкалоида, полученного из растения, препарата для гормональной терапии, антагониста гормонов, ингибитора ароматазы и ингибитора Р-гликопротеина.

[21] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать связанное с ним противоопухолевое лекарственное средство. Противоопухолевое лекарственное средство может быть связано с указанным антителом через фотолabileный линкер. Противоопухолевое лекарственное средство может быть связано с указанным антителом через ферментативно расщепленный линкер. Противоопухолевое лекарственное средство может представлять собой токсин, радиоизотоп, цитокин или фермент.

[22] В другом варианте осуществления предлагается способ обнаружения раковой клетки или фиброзной ткани в образце или в организме субъекта, включающий (а) приведение в контакт организма субъекта или образца, полученного от субъекта, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, как определено в данном документе; и (б) обнаружение связывания указанного антитела с раковой клеткой или фиброзной тканью в организме указанного субъекта или в образце. Образцом может быть жидкость организма или биоптат, кровь, костный мозг, мокрота, слезы, слюна, слизь, сыворотка, моча или фекалии. Обнаружение может включать иммуногистохимию, проточную цитометрию, FACS, ELISA, RIA или вестерн-блоттинг. В некоторых вариантах осуществления указанный способ может дополнительно включать выполнение этапов (а) и (б) во второй раз и определение изменения уровней обнаружения по сравнению с первым разом.

Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут дополнительно содержать метку, такую как пептидная метка, фермент, магнитная частица, хромофор, флуоресцентная молекула, хемоллюминесцентная молекула или краситель. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с липосомой или наночастицей.

[23] Использование слова в единственном числе при применении в сочетании с термином «содержащий» в формуле изобретения и/или в тексте описания может означать «один», но также соответствует значению «один или большее количество», «по меньшей мере один» и «один или более одного». Слово «около» означает плюс-минус 5% от указанного числа.

[24] Предполагается, что любой способ или композиция, описанные в данном документе, могут быть реализованы в отношении любого другого способа или композиции, описанных в данном документе. Другие цели, признаки и преимущества данного изобретения станут очевидны из нижеприведенного подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают конкретные варианты осуществления данного изобретения, приведены только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники из этого подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[25] Следующие графические материалы составляют часть данного описания и включены для дополнительной демонстрации некоторых аспектов данного изобретения. Данное изобретение можно лучше понять, обратившись к одному или большему количеству из этих графических материалов в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в данном документе.

[26] **На ФИГ. 1A-M. DDR1 вызывает рост опухоли молочной железы у иммунокомпетентных хозяев. (ФИГ. 1a)** Иммуноблоты DDR1, DDR2 и контрольной загрузки GAPDH в клетках опухоли молочной железы DDR1 WT/КО E0771. **(ФИГ. 1b)** Пролиферация клеток WT/КО E0771, измеренная с помощью анализа МТТ (n=6). **(ФИГ. 1c-d)** Количественная оценка миграции клеток DDR1 WT/КО M-Wnt (c) и инвазии (d) (n=6 случайных полей). **(ФИГ. 1e)** Рост опухолей DDR1 WT/КО E0771 у хозяев *Rag1^{-/-}* (n=6, e). **(ФИГ. 1f-h)** Рост опухолей WT/КО E0771 (n=6, f), M-Wnt (n=7, g) и AT-3 (n=7, h) у мышей C57BL/6. **(ФИГ. 1i-j)** Кинетика роста (i) и масса (j) опухоли в конечной точке опухоли E0771 DDR1 WT/КО, трансплантированной от *Rag1^{-/-}* хозяевам C57BL/6 (n=8). **(ФИГ. 1k)** Схема повторного введения клеток опухоли. Мышам вводили солевой буфер или клетки DDR1 КО E0771 в одну сторону паховой молочной железы в первом цикле инокуляции. Через 30 дней мышам повторно вводили опухолевые клетки DDR1 WT E0771 с обеих сторон паховой молочной железы. Л, слева; П, справа **(ФИГ. 1l-m)** Кривая **(ФИГ. 1l)** и масса **(ФИГ. 1m)** опухоли у мышей, которым повторно вводили клетки опухоли (n=6). Значения представляют собой среднее ± SEM, значение *p*, как указано.

[27] **На ФИГ. 2А-М. DDR1 исключает инфильтрацию противоопухолевых иммунных клеток. (ФИГ. 2а)** Репрезентативные изображения окрашивания CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток на краю опухоли (верхние панели, обозначенные красными пунктирными линиями) и в ядре опухоли (нижние панели) (n=3). Масштабная линейка: 50 мкм. **(ФИГ. 2b-g)** Количество клеток-лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), нормализованное по массе опухоли на грамм. Количество клеток CD8⁺ **(ФИГ. 2b)** и CD4⁺ **(ФИГ. 2c)** Т клеток, цитокинов IFN- γ ⁺ CD8⁺ клеток **(ФИГ. 2d)** и CD4⁺ **(ФИГ. 2e)** Т клеток, и CD44^{выс} CD62L^{низк}-активированных CD8⁺ **(ФИГ. 2f)** и CD4⁺ **(ФИГ. 2g)** Т клеток. **(ФИГ. 2h-j)** рост опухоли WT/КО E0771 у хозяина C57BL/6 с предшествующим введением либо анти-IgG, либо антитела анти-CD8 (n=5). Объемы **(ФИГ. 2h)**, изображение **(ФИГ. 2i)** и масса **(ФИГ. 2j)** опухоли продемонстрированы в конечной точке. Масштабная линейка: 1 см. **(ФИГ. 2k-m)** Адаптивный перенос CD8⁺ Т-клеток или среды (фиктивной) мышам *Rag1*^{-/-} (n=6) с опухолями DDR1 WT/КО E0771. Стрелка на **(ФИГ. 2k)** указывает на перенос CD8⁺ Т-клеток на день 17. Продемонстрированы изображение **(ФИГ. 2l)** и масса **(ФИГ. 2m)** опухоли. Масштабная линейка: 1 см. Значения представляют собой среднее \pm SEM, значение *p*, как указано.

[28] **ФИГ. 3А-Р. DDR1-зависимое ремоделирование ЕСМ сдерживает противоопухолевую иммунную инфильтрацию. (ФИГ. 3а)** Диаграмма полноразмерного DDR1 (вверху) и опухолевой кривой опухолевых клеток DDR1 КО E0771 с различными экспрессионными векторами DDR1: дикий тип (WT), пустой вектор (EV), делеция киназного домена (Δ KD) и только внеклеточный домен (ECD). Все *p*-значения по сравнению с группой КО. TM: трансмембранный домен. **(ФИГ. 3b)** Диаграмма ECD, состоящая из домена DS и DS-подобного (DSL) домена (вверху) и кристаллической структуры (внизу) домена DS DDR1 мыши, сгенерированная программным обеспечением Jmol. Продемонстрированы аминокислотные остатки, на которые направлен мутационный анализ. **(ФИГ. 3c)** Связывание коллагена WT и точечного мутанта ECD, экспрессированного в клетках КО E0771, что оценено с помощью ELISA (n=4). **(ФИГ. 3d-k)** Индивидуальные кривые роста опухолевых клеток КО E0771 с эктопически экспрессированными ECD WT или точечными мутантами. Частота развития опухоли приведена в скобках для каждой панели. **(ФИГ. 3l)** Репрезентативные SEM-изображения опухолевых клеток WT/КО E0771, культивируемых *in vitro*. **(ФИГ. 3m)** Децеллюляризованный ЕСМ из клеток E0771 ингибирует миграцию Т-клеток зависимым от ECD образом. Слева приведена схема Transwell-анализа миграции. **(ФИГ. 3n)** Опухоли WT/КО E0771, трансплантированные от *Rag1*^{-/-} хозяевам C57BL/6, анализировали с помощью SHG (серый), окрашивания CD3 (зеленый), окрашивания To-pro-3 (красный) и индивидуализации коллагеновых волокон (крайняя правая панель). Блок-стрелки указывают на границы опухоли. Масштабная линейка: 50 мкм. **(ФИГ. 3o-p)** Количественная оценка выравнивания волокон опухоли (o) и длины волокон (p) с помощью программного обеспечения CT Fire. Значения представляют собой среднее \pm SEM, значение *p*, как указано.

[29] **ФИГ. 4A-N. DDR1 как потенциальная терапевтическая мишень для повышения противоопухолевого иммунитета. (ФИГ. 4A)** Иммуноблоты эктопического человеческого (hu) DDR1 и эндогенного мышиноного DDR1 в клеточных лизатах и средах клеток, полученных из E0771. **(ФИГ. 4b-c)** Кривая роста **(ФИГ. 4b)** и массы опухоли **(ФИГ. 4c)** клеток DDR1 WT, KO, KO+huDDR1, полученных из E0771 (n=6). Изображение опухоли приведено сверху. **(ФИГ. 4d-e)** Кривые роста отдельных опухолей KO+huDDR1 у хозяев C57BL/6, получавших изотип IgG **(ФИГ. 4d)** или антитело анти-huDDR1 #9 **(ФИГ. 4e)**. Стрелки обозначают дату начала введения антител. **(ФИГ. 4f)** Кривая выживания в группах, получавших изотип IgG и анти-huDDR1. **(ФИГ. 4g)** Опухоли KO+huDDR1 анализировали с помощью SHG (серый), окрашивания CD3 (зеленый), окрашивания To-pro-3 (красный) и индивидуализации коллагеновых волокон (крайняя правая панель). Блок-стрелки указывают на границы опухоли. Масштабная линейка: 50 мкм. **(ФИГ. 4h-i)** Количественная оценка параметров опухолевых волокон. Выравнивание волокна (угол изменения коэффициента, **ФИГ. 4h**), длина волокна **(ФИГ. 4i)**. **(ФИГ. 4j)** Корреляция между мРНК huDDR1 и количеством инфильтрирующих опухоль CD8+ Т среди 1093 образцов пациентов с раком молочной железы (TIMER). **(ФИГ. 4k-m)** Корреляция уровней мРНК DDR1 и противоопухолевых иммунных маркеров IFNG **(ФИГ. 4k)**, CD8A **(ФИГ. 4L)** и GZMB **(ФИГ. 4m)** среди 37 образцов пациентов с TNBC (GSE88847). **(ФИГ. 4n)** Модельная диаграмма ECD (красные кружки) реконструированных коллагеновых волокон (кривые), которые образуют барьеры для предотвращения инфильтрации иммунных клеток. Значения представляют собой среднее \pm SEM, значение *p*, как указано.

[30] **ФИГ. 5A-K. Удаление опухоли DDR1 ингибирует рост опухоли у иммунокомпетентных хозяев. (ФИГ. 5a)** Экспрессия DDR1 в образцах нормальной (N) ткани и опухоли молочной железы (T) в базе данных TCGA. Значение *P* анализировали с помощью теста Уилкоксона. **(ФИГ. 5b)** Иммуноблоты DDR1 клеток WT/KO, полученных из клеток опухоли молочной железы мышей M-Wnt и AT-3. **(ФИГ. 5c-d)** Секвенирование геномной ДНК sgРНК-нацеленных сайтов в локусе гена *Ddr1* мыши. Клоны AT-3 и E0771 KO содержат вставку одной пары оснований **(ФИГ. 5c)** (SEQ ID NO:312; SEQ ID NO:313; SEQ ID NO:314). Клон M-Wnt DDR1 KO несет делецию длиной 8 п.о. **(ФИГ. 5d)**. Расщепление происходило выше последовательности PAM. **(ФИГ. 5e)** Репрезентативные изображения миграции и инвазии клеток DDR1 WT/KO M-Wnt и AT-3. (SEQ ID NO:315; SEQ ID NO:316). **(ФИГ. 5f)** *In vitro* клеточная пролиферация опухолевых клеток WT/KO M-Wnt. **(ФИГ. 5g)** Рост опухоли M-Wnt у голых мышей (n=4). **(ФИГ. 5H)h)** Индивидуальные кривые опухолевого роста леток DDR1 KO E0771, инокулированных в различных количествах мышам C57BL/6 (0,5, 5, 10 и 20×10⁶ на мышь, n=4). **(ФИГ. 5i-k)** Объем **(ФИГ. 5i)**, изображение **(ФИГ. 5j)** и масса опухоли **(ФИГ. 5k)** M-Wnt DDR1 WT, KO и смеси 1:1 при инокуляции (n=8). Значения представляют собой среднее \pm SEM, значение *p*, как указано.

[31] **ФИГ. 6A-I. Иммунодеплетирование и адоптивный перенос клеток CD8+.** **(ФИГ. 6a-d)** Процент Т-клеток из KO и родительского контроля, которые являются

положительными по Ki67 (CD4⁺ на а и CD8⁺ на **ФИГ. 6b**), IFN γ (CD8⁺ на **ФИГ. 6c**) или Gzmb (CD8⁺ на **ФИГ. 6d**). (**ФИГ. 6e-f**) Проточная цитометрия CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток из спленцитов мышей C57BL/6, получавших антитело анти-IgG 2b или анти-CD8 (e), и процентное содержание CD8⁺ в CD3⁺Т-клетках в крови (f, n=5). (**ФИГ. 6g**) Количество CD8⁺ Т-клеток в TIL, нормализованное по массе опухоли, у мышей *Rag1*^{-/-} (n=6). (**ФИГ. 6h-i**) Тепловая карта RNA-seq для генов самонаведения Т-клеток и генов хемокинов из опухолей DDR1 WT/KO E0771, трансплантированных от *Rag1*^{-/-} хозяину C57BL/6. ***, $p < 0,001$. Значения представляют собой среднее \pm SEM, значение p , как указано.

[32] **ФИГ. 7A-E. DDR1-опосредованное ремоделирование коллагена является необходимым для выключения иммунного ответа.** (**ФИГ. 7a-b**) Кривые роста (**ФИГ. 7a**) и массы опухоли (**ФИГ. 7b**) опухолей E0771 DDR1 KO+ECD, KO, KO+DS, KO+DSL у хозяев C57BL/6 (n=10). (**ФИГ. 7c**) Co-IP коллагена I типа и Flag-меченого ECD WT и мутантов. (**ФИГ. 7d**) Иммуноблоты полноразмерного DDR1 в клетках и растворимого ECD в кондиционированных средах из мышинных (слева) и различных линий клеток рака молочной железы человека (справа). (**ФИГ. 7e**) 10 основных биологических процессов (BP), основанных на анализе геной онтологии данных РНК-seq из опухолей E0771 DDR1 WT и KO, трансплантированных от *Rag1*^{-/-} хозяину C57BL/6. Значения представляют собой среднее \pm SEM, значение p , как указано.

[33] **ФИГ. 8A-I. Скрининг на huDDR1-нейтрализующие антитела.** (**ФИГ. 8a**) Transwell-анализ миграции очищенных CD8⁺ Т-клеток в присутствии кондиционированной среды из клеток E0771, содержащих эндогенный DDR1 WT, с DDR1 KO и с DDR1 KO и эктопической экспрессией huDDR1. (**ФИГ. 8b**) Репрезентативный скрининг на нейтрализующие антитела с помощью анализа миграции CD8⁺ Т-клеток с применением кондиционированной среды из клеток KO или KO+huDDR1 E0771. Контроль: изотип IgG; антитело анти-huDDR1: 3, #9, #14 и #33. (**ФИГ. 8c**) измерение массы тела мышей, получавших контроль (α -IgG) и антитело анти-huDDR1 #9 (n=5). (**ФИГ. 8d-e**) KO+huDDR1 E0771 опухоли в организмах хозяев C57BL/6 (**ФИГ. 8d**) и *Rag1*^{-/-} (**ФИГ. 8e**), получавших либо изотип IgG, либо антитело анти-huDDR1 #33. (**ФИГ. 8f**) Ядра опухолей KO+huDDR1 анализировали с помощью SHG (серый), окрашивания CD3 (зеленый), окрашивания To-pro-3 (красный) и индивидуализации коллагеновых волокон (крайняя правая панель). Масштабная линейка: 50 мкм (**ФИГ. 8g-i**) Корреляция между уровнями мРНК huDDR1 и генами иммунных цитотоксических маркеров IFNG (**ФИГ. 8g**), GZMB (**ФИГ. 8h**) и PRF1 (**ФИГ. 8i**) среди образцов 1093 опухолей рака молочной железы в базе данных TIMER. Значения представляют собой среднее \pm SEM, значение p , как указано.

[34] **ФИГ. 9. Связывание DDR1-mAb с DDR1, проанализированное с помощью ELISA.**

[35] **ФИГ. 10A-B. Определение аффинности связывания антител с DDR1 человека и DDR1 мыши с применением титрования ELISA.**

[36] **ФИГ. 11. Кинетические кривые связывания антител анти-DDR1, измеренные с помощью прибора Octet.**

[37] **ФИГ. 12А-С. Антитело анти-hECD ингибирует спонтанный рост опухоли.**

Чтобы продемонстрировать влияние введения антитела анти-DDR1 на онкогенез молочной железы на различных стадиях, мышам MMTV-PyMT (фоновая линия C57BL/6) вводили контрольный IgG или антитело анти-DDR1 в течение двух недель, когда средний размер опухоли достигал 100 мм³ («постопухолевое» введение). (ФИГ. 12А-В) Кинетика роста опухоли (на мышь, ФИГ. 12А) и частота возникновения опухоли (на мышь, ФИГ. 12В) в MMTV-PyMT модели спонтанной опухоли молочной железы мыши генетической линии C57BL/6, получавшей по «постопухолевой» схеме Ctrl (n=7) или гуманизированное антитело анти-DDR1 # 9 (n=8). (ФИГ. 12С) Репрезентативные изображения опухолей из группы послеопухолевого введения, проанализированные с помощью SHG (серый), окрашивания CD3 (зеленый), окрашивания To-pro-3 (красный) и индивидуализации коллагеновых волокон (крайняя правая панель). Масштабная линейка: 50 мкм

[38] **ФИГ. 13А-Е. Сравнение антител анти-hECD и ингибитора киназы DDR1.**

Опухоли молочной железы E0771 обрабатывали антителом анти-hECD и оценивали рост опухоли (ФИГ. 13А) и массу тела хозяина (ФИГ. 13В). Ранее опубликованный низкомолекулярный ингибитор киназы DDR1, 7th, не уменьшал рост опухоли (ФИГ. 13С). Это согласуется с утверждением, что DDR1-зависимое выключение противоопухолевого иммунитета не зависит от киназной активности. (ФИГ.13 D) 7th не влиял на массу тела хозяина. (ФИГ. 13Е) Опухоли, обработанные 7th, имели значительно более низкое аутофосфорилирование DDR1, маркер активности тирозинкиназы DDR1 (Gao *et al.*, *J Med Chem* 2013).

[39] **ФИГ. 14А-С. DDR1 требуется для роста некоторых типов опухолей.** (ФИГ.

14А) Генетическая абляция опухоли *Ddr1* на основе CRISPR значительно увеличивала выживаемость иммунокомпетентных хозяев, имеющих опухоли яичников ID8agg. (ФИГ. 14В-С) *Ddr1* КО при меланоме B16 или колоректальных опухолях MC38 не влиял на рост опухоли у сингенных иммунокомпетентных хозяев.

[40] **ФИГ. 15А-С. Корреляция DDR1 и маркеров противоопухолевого иммунитета.** (ФИГ.15А) Уровни мРНК DDR1 при многих видах рака отрицательно коррелируют с цитотоксическими иммунными маркерами, такими как Granzyme B (GZMB), что позволяет предположить, что DDR1 может противодействовать противоопухолевому иммунитету при многих типах рака. (ФИГ. 15В-С) Анализ набора данных протеома рака молочной железы TCGA (NCI CPTAC) продемонстрировал, что уровни белка DDR1 также отрицательно коррелируют с CD8 и белками цитолитического эффекторного пути.

[41] **ФИГ. 16. Высокий уровень белка DDR1 опухоли коррелирует с выключением иммунного ответа при TNBC.** (Слева) Изображения мультиплексной ИС для DDR1, CD8 и опухолеспецифического panCK с применением образцов опухоли TNBC, ранее не подвергавшихся воздействию DDR1^{выс} (n=7) и DDR1^{низк} (n=5) Масштабная линейка: 200 мкм. Используя когорту TNBC, ранее не подвергавшуюся воздействию, при мультиплексной ИС было показано, что опухоли DDR1^{выс} демонстрируют пониженный процент CD8⁺ Т-клеток, присутствующих в опухоли, и больший процент CD8⁺ Т-клеток,

присутствующих на краю опухоли, по сравнению с опухолями DDR1^{низк}, которые имели более высокий процент CD8⁺ Т-клеток, распределенных по всей опухоли (справа).

[42] **ФИГ. 17. Схема рекомбинантной конструкции доменов внеклеточного (ECD) белка DDR1 для экспрессии в клетках HEK293.** DS: N-концевой домен дискоидина; DSL: DS-подобный домен; JM: околочелювной домен.

[43] **ФИГ. 18А-С. Определение связывания антител DDR1 с доменами ECD и DS или DSL с помощью ELISA.** Рекомбинантный внеклеточный (ECD) белок DDR1 и доменные белки наносили на 96-луночные планшеты с высоким связыванием в концентрации 2 мкг/мл. **(ФИГ.18А)** Титрование антител DDR1-9Hu применяли для определения кривых связывания и значений EC₅₀. Делеция DS- или DSL-домена ECD DDR1 приводила к снижению связывания гуманизированным антителом DDR1-9hu. Делеция только одного DS-домена снижала связывание с EC50-168 нг/мл против 83 нг/мл, в то время как делеция DSL-домена полностью устраняла DDR1-9 **(ФИГ. 18В)** и связывание антитела DDR1-14. **(ФИГ. 18С)**.

[44] **ФИГ. 19.** Определение перекрестной реактивности панели моноклональных антител к DDR2 человека методом ELISA. Белок ECD DDR1 или DDR2 наносили на планшет с высоким связыванием, и каждое из моноклональных антител в концентрации 1 мкг/мл добавляли для обнаружения связывания с HRP-конъюгированным антикроличьим антителом (Jackson ImmuneResearch, PA).

ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[45] Авторы изобретения определили, что рецептор 1 опухолевого дискоидинового домена (DDR1) играет важную роль в регуляции иммунитета хозяина. DDR1 представляет собой коллагеновый рецептор с тирозинкиназной активностью. Авторы изобретения обнаружили, что DDR1 индуцирует защиту опухоли, которая препятствует проникновению иммунных клеток хозяина в опухолевую ткань и их атаке на саму опухоль независимым от киназы образом. Авторы изобретения выделили панель новых моноклональных антител, распознающих белок DDR1, которые можно применять для лечения рака. Антитела против DDR1 человека являются антагонистами функции DDR1 и предотвращают индуцирование защиты опухоли белком DDR1.

[46] Следующее описание данного изобретения предназначено только для иллюстрации различных вариантов его осуществления. Как таковые, обсуждаемые конкретные модификации не следует рассматривать как ограничивающие объем данного изобретения. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что могут быть осуществлены различные эквиваленты, изменения и модификации, не выходя за рамки объема изобретения, и будет понятно, что такие эквивалентные варианты осуществления должны быть включены в данный документ. Все ссылки, приведенные в данном документе, включая публикации, патенты и патентные заявки, полностью включены в данный документ посредством ссылки.

I. Определения

[47] Следует понимать, что как приведенное выше общее описание, так и

приведенное ниже подробное описание являются просто иллюстративными и пояснительными и не ограничивают заявляемое изобретение. В данной заявке применение форм единственного числа включает также и множественное число, если явно не указано иное. В данной заявке применение «или» означает «и/или», если не указано иное. Кроме того, применение термина «в том числе», а также других форм, например, «включает» и «включительно», является неограничивающим. Кроме того, такие термины, как «элемент» или «компонент» охватывают как элементы, так и компоненты, содержащие одну единицу, и элементы и компоненты, которые содержат более одной субъединицы, если конкретно не указано иное. Кроме того, применение термина «часть» может включать часть фрагмента или весь фрагмент.

[48] Применяемые в данном документе формы единственного числа включают в себя ссылки на формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

[49] Термин «около», в контексте данного документа применительно к измеримому значению, такому как количество, временная продолжительность и т.п., предназначен для охвата отклонений до $\pm 10\%$ от указанного значения. Если не указано иное, все числа, выражающие количества компонентов, свойства, такие как молекулярная масса, реакционные условия, и т. п., применяемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицируемые во всех случаях с термином «около». Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, приведенные в описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приблизительными и могут варьироваться в зависимости от необходимых свойств, которые стремятся получить с помощью данного изобретения. Как минимум, что не стоит трактовать как попытку ограничить применение доктрины эквивалентов объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр необходимо, по меньшей мере, толковать с учетом числа приведенных значимых цифр и путем применения обычных методов округления. Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, приведенные в полном объеме данного изобретения, являются приблизительными, приведенные в конкретных примерах числовые значения указаны настолько точно, насколько это возможно. Любое числовое значение, однако, по своей сути содержит определенные ошибки, неизбежно возникающие в результате стандартного отклонения, обнаруженного при соответствующих экспериментальных измерениях.

[50] Термин «антитело» относится к интактному иммуноглобулину любого изотипа или его фрагменту, который может конкурировать с интактным антителом за специфическое связывание с целевым антигеном, и включает, например, химерные, гуманизированные, полностью человеческие и биспецифические антитела. «Антитело» представляет собой разновидность антигенсвязывающего белка. Интактное антитело, как правило, будет содержать по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, но в некоторых случаях может включать меньшее количество цепей, например, антитела, в естественных условиях встречающиеся у верблюжьих, которые могут содержать только тяжелые цепи. Антитела могут быть образованы исключительно из одного источника, или могут быть химерными, то есть, различные части

антитела могут быть образованы из двух различных антител, как дополнительно описано ниже. Антигенсвязывающие белки, антитела или связывающие фрагменты могут быть получены в гибридомах, посредством методик рекомбинантной ДНК, или посредством ферментативного или химического отщепления интактных антител. Если не указано иное, термин «антитело» включает, помимо антител, содержащих две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, его производные, варианты, фрагменты и мутеины, примеры которых описаны ниже. Более того, если явно не исключено, антитела включают моноклональные антитела, биспецифические антитела, миниантитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в данном документе «миметиками антител»), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слияния антител (иногда называемые в данном документе «конъюгатами антител») и их фрагменты, соответственно. В некоторых вариантах осуществления указанный термин также включает пептидные тела.

[51] Встречающиеся в природе структурные единицы антитела обычно содержат тетрамер. Каждый такой тетрамер обычно состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну полноразмерную «легкую» (в некоторых вариантах осуществления около 25 кДа) и одну полноразмерную «тяжелую» цепь (в некоторых вариантах осуществления около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи обычно включает переменную область из около 100-110 или более аминокислот, которая обычно отвечает за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи обычно определяет константную область, которая может отвечать за эффекторную функцию. Легкие цепи человека обычно классифицируются как легкие цепи каппа и лямбда. Тяжелые цепи обычно классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG имеет несколько подклассов, включая, помимо прочего, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая, помимо прочего, IgM1 и IgM2. IgA аналогичным образом подразделяется на подклассы, включая, помимо прочего, IgA1 и IgA2. В полноразмерных легких и тяжелых цепях, как правило, переменная и константная области соединены областью «J», состоящей из около 12 или большего количества аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает область «D», состоящая еще из около 10 аминокислот. См., например, публикацию *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (которая включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме и для всех целей). Переменные области каждой пары легкой/тяжелой цепи обычно образуют сайт связывания антигена.

[52] Термин «переменная область» или «вариабельный домен» относится к части легкой и/или тяжелой цепей антитела, обычно включая примерно амино-конец от 120 до 130 аминокислот в тяжелой цепи и от около 100 до 110 аминоконцевых аминокислот в легкой цепи. В определенных вариантах осуществления переменные области разных антител сильно различаются по аминокислотной последовательности даже среди антител одного и того же вида. Переменная область антитела обычно определяет специфичность

конкретного антитела в отношении его мишени.

[53] Вариабельные области, как правило, демонстрируют ту же общую структуру областей относительно консервативного каркаса (FR), соединенных посредством трех гипервариабельных областей, также известных как области, определяющие комплементарность, или CDR. CDR из двух цепей каждой пары обычно выравниваются посредством каркасных областей, которые могут обеспечивать связывание с конкретным эпитопом. От N-конца до C-конца, вариабельные области как легкой цепи, так и тяжелой цепи обычно содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Назначение аминокислот для каждого домена обычно соответствует определениям Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991)), Chothia & Lesk J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987) или Chothia *et al.*, Nature, 342:878-883 (1989).

[54] В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела связывается с антигеном в отсутствие легкой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления легкая цепь антитела связывается с антигеном в отсутствие тяжелой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления область связывания антитела связывается с антигеном в отсутствие легкой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления область связывания антитела связывается с антигеном в отсутствие тяжелой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления отдельная вариабельная область специфически связывается с антигеном в отсутствие других вариабельных областей.

[55] В определенных вариантах осуществления окончательное разграничение CDR и идентификацию остатков, составляющих сайт связывания антитела, осуществляют путем определения структуры антитела и/или определения структуры комплекса антитело-лиганд. В определенных вариантах осуществления это может быть выполнено любым из множества методов, известных специалистам в данной области техники, таких как рентгеновская кристаллография. В определенных вариантах осуществления можно применять различные способы анализа для идентификации или аппроксимации областей CDR. Примеры таких способов включают, помимо прочего, определение по Kabat, определение по Chothia, определение AbM, определение IMGT и определение контакта.

[56] Определение по Kabat является стандартом для нумерации остатков в антителе и обычно применяется для идентификации областей CDR. См., например, Johnson & Wu, Nucleic Acids Res., 28: 214-8 (2000). Определение по Chothia похоже на определение по Kabat, но определение по Chothia учитывает положение определенных областей структурной петли. См., например, Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901-17 (1986); Chothia *et al.*, Nature, 342: 877-83 (1989). В определении AbM применяется интегрированный набор компьютерных программ, разработанных Oxford Molecular Group, которые моделируют структуру антител. См., например, Martin *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA), 86:9268-9272 (1989); "AbM™, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies," Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd. Определение AbM моделирует третичную структуру антитела из первичной последовательности с применением комбинации баз данных знаний и методов *ab initio*, таких как описанные в публикации Samudrala *et al.*, "Ab Initio Protein

Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach,” в *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3:194-198 (1999). Определение контакта основано на анализе имеющихся сложных кристаллических структур. См., например, MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 5:732-45 (1996). В определении IMGT применяется уникальная система нумерации, которая объединяет определение каркасных (FR) и CDR-областей, структурные данные рентгеноструктурных исследований и характеристику гипервариабельных петель, как описано в публикации Lefranc M-P et al., “IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,” *Dev Comp Immunol* 27:55-77 (2003). В одном предпочтительном варианте осуществления последовательности CDR основаны на определении IMGT.

[57] Условно, области CDR в тяжелой цепи обычно обозначаются как H1, H2 и H3 и нумеруются последовательно в направлении от amino-конца к карбокси-концу. Области CDR в легкой цепи обычно обозначаются L1, L2 и L3 и нумеруются последовательно в направлении от amino-конца к карбокси-концу. В данном документе области CDR вариабельной области легкой цепи также обозначаются как LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3, тогда как области CDR вариабельной области тяжелой цепи обозначаются как HC-CDR1, HC-CDR2. и HC-CDR3.

[58] Термин «легкая цепь» включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты с достаточной последовательностью вариабельной области для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная легкая цепь включает домен вариабельной области, VL, и домен константной области, CL. Домен вариабельной области легкой цепи представляет собой amino-конец полипептида. Легкие цепи включают каппа-цепи и лямбда-цепи.

[59] Термин «тяжелая цепь» включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты с достаточной последовательностью вариабельной области для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная тяжелая цепь включает домен вариабельной области, VH, и три домена константной области, CH1, CH2, и CH3. Домен VH расположен у amino-конца полипептида, а домены CH расположены у карбоксильного конца, при этом CH3 наиболее близко расположен к карбоксильному концу полипептида. Тяжелые цепи могут представлять собой любой изотип, в том числе IgG (включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

[60] Биспецифическое или бифункциональное антитело обычно представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелой/легкой цепи и два разных сайта связывания. Биспецифические антитела могут быть получены различными способами, включая, помимо прочего, слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992).

[61] Термин «антиген» относится к веществу, способному индуцировать адаптивные иммунные ответы. В частности, антиген представляет собой вещество, которое служит мишенью для рецепторов адаптивного иммунного ответа. Как правило, антиген

представляет собой молекулу, которая связывается с антиген-специфическими рецепторами, но сама по себе не может вызывать иммунный ответ в организме. Антигены обычно представляют собой белки и полисахариды, реже также липиды. Подходящие антигены включают, помимо прочего, части бактерий (оболочки, капсулы, клеточные стенки, жгутики, фимбрии и токсины), вирусы и другие микроорганизмы. Антигены также включают опухолевые антигены, например, антигены, образующиеся в результате мутаций в опухолях. В контексте данного документа антигены также включают иммуногены и гаптены.

[62] Термин «антигенсвязывающий белок» («АВР»), в контексте данного документа, означает любой белок, который связывает определенный антиген-мишень. В данной заявке указанный целевой антиген представляет собой белок DDR1 или его фрагмент. «Антигенсвязывающий белок» включает, помимо прочего, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Пептитела представляют собой еще один пример антигенсвязывающих белков.

[63] Термин «антигенсвязывающий фрагмент» в контексте данного документа относится к части белка, которая способна специфически связываться с антигеном. В определенном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент получен из антитела, содержащего одну или большее количество CDR, или любого другого фрагмента антитела, который связывается с антигеном, но не содержит интактной нативной структуры антитела. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент происходит не от антитела, а скорее от рецептора. Примеры антигенсвязывающего фрагмента включают, помимо прочего, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, фрагмент F_v, стабилизированный дисульфидом фрагмент F_v (dsF_v), (dsF_v)₂, биспецифический dsF_v (dsF_v-dsF_v'), стабилизированное дисульфидом диатело (ds диатело), молекулу одноцепочечного антитела (scF_v), димер scF_v (бивалентное диатело), мультиспецифическое антитело, однодоменное антитело (sdAb), верблюжье антитело или нанотело, доменное антитело и двухвалентное доменное антитело. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может содержать одну или большее количество CDR конкретного человеческого антитела, привитых к каркасной области одного или большего количества разных человеческих антител. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент происходит от рецептора и содержит одну или большее количество мутаций. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент не связывается с природным лигандом рецептора, из которого получен антигенсвязывающий фрагмент.

[64] Термин «Fab-фрагмент» включает одну легкую цепь и CH1 и переменные области одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи.

[65] Термин «Fab'-фрагмент» включает одну легкую цепь и часть одной тяжелой

цепи, которая содержит домен VH и домен CH1, а также область между доменами CH1 и CH2, так что дисульфидная связь между цепями может быть образована между двумя тяжелыми цепями двух фрагментов Fab' с образованием молекулы F(ab')₂.

[66] «F(ab')₂ фрагмент» содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами CH1 и CH2, так что дисульфидная связь между цепями образована между двумя тяжелыми цепями. F(ab')₂ фрагмент, составлен, таким образом, из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе посредством дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями.

[67] Область «Fc» содержит два фрагмента с тяжелой цепью, содержащие домены CH1 и CH2 антитела. Два фрагмента с тяжелой цепью удерживаются вместе посредством двух или большего количества дисульфидных связей и посредством гидрофобных взаимодействий доменов CH3.

[68] «Область Fv» содержит переменные области как из тяжелой, так и из легкой цепей, но не содержит константных областей.

[69] «Одноцепочечные антитела» представляют собой молекулы Fv, в которых переменные области тяжелой и легкой цепей соединены гибким линкером с образованием одной полипептидной цепи, которая образует антигенсвязывающую область. Одноцепочечные антитела подробно обсуждаются в публикации международной заявки на патент № WO 88/01649 и в патентах США № 4946778 и № 5260203, описание которых включено в данный документ посредством ссылки.

[70] «Доменное антитело» представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи. В некоторых случаях две или большее количество областей VH ковалентно соединяются с пептидным линкером для создания двухвалентного доменного антитела. Две области VH двухвалентного доменного антитела могут быть нацелены на один и тот же или разные антигены.

[71] «Двухвалентный антигенсвязывающий белок» или «двухвалентное антитело» содержит два сайта связывания антигена. В некоторых случаях две связывающие области обладают теми же антигенными специфичностями. Двухвалентные антигенсвязывающие белки и двухвалентные антитела могут быть биспецифичными, см. ниже. Двухвалентное антитело, отличается от «мультиспецифического» или «многофункционального» антитела, в некоторых вариантах осуществления обычно понимается как имеющее идентичные сайты связывания.

[72] «Мультиспецифический антигенсвязывающий белок» или «мультиспецифическое антитело» представляет собой антитело, нацеленное на более чем один антиген или эпитоп.

[73] «Биспецифичный», «двойной специфичный» или «бифункциональный» антигенсвязывающий белок или антитело представляют собой гибридный антигенсвязывающий белок или антитело, соответственно, имеющий два разных антигенсвязывающих сайта. Биспецифические антигенсвязывающие белки и антитела

представляют собой разновидность мультиспецифического антигенсвязывающего белка антитела и могут быть получены различными способами, включая, помимо прочего, слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny *et al.*, 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. Два сайта связывания биспецифического антигенсвязывающего белка или антитела будут связываться с двумя разными эпитопами, которые могут находиться на одном и том же или разных белках-мишенях.

[74] «Аффинность связывания» в целом относится к силе суммарного количества нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в контексте данного документа «аффинность связывания» относится к действительной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие в соотношении 1:1 между членами связывающей пары (*например*, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y в целом можно выразить константой диссоциации (K_d). Аффинность можно измерять обычными методами, известными в данной области техники, включая описанные в данном документе. Низкоаффинные антитела обычно связывают антиген медленно и имеют тенденцию легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела обычно связывают антиген быстрее и имеют тенденцию оставаться связанными дольше. В данной области техники известен ряд способов измерения аффинности связывания, любой из которых можно применять в целях данного изобретения. Конкретные иллюстративные и типовые варианты осуществления для измерения аффинности связывания описаны ниже.

[75] Антитело, которое «специфически связывается» или является «специфическим к» определенному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде, представляет собой антитело, которое связывается с этим конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде, практически не связываясь с каким-либо другим полипептидом или эпитопом полипептида. Например, специфичные к DDR1 антитела по данному изобретению являются специфичными к DDR1. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с DDR1, имеет константу диссоциации (K_d) ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М).

[76] Термин «конкурировать», при применении в контексте антигенсвязывающих белков (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента), которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию между антигенсвязывающими белками, как определено при помощи анализа, в котором антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) предотвращает или ингибирует (например, снижает) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка (например, лиганда или эталонного антитела) с обычным антигеном (например, DDR1 или его фрагментом). Можно применять различные типы анализов конкурентного связывания для определения того, конкурирует ли один

антигенсвязывающий белок с другим, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой ферментный иммунологический анализ (EIA), сэндвич-анализ конкурентного связывания (см. *например*, Stahl et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см., *например*, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619), твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см. *например*, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный анализ с прямым мечением RIA с применением 1-125 меток (см. *например*, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см., *например*, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552); и анализ с прямым мечением RIA (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Как правило, такой анализ включает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью или клетками, несущими любой из следующих агентов: немеченый тестируемый антигенсвязывающий белок и меченый эталонный антигенсвязывающий белок. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого антигенсвязывающего белка. Обычно тестируемый антигенсвязывающий белок присутствует в избытке. Антигенсвязывающие белки, идентифицированные с помощью конкурентного анализа (конкурирующие антигенсвязывающие белки), включают антигенсвязывающие белки, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонные антигенсвязывающие белки, и антигенсвязывающие белки, связывающиеся с соседним эпитопом, достаточно проксимальным к эпитопу, связанному эталонным антигенсвязывающим белком для появления стерического затруднения. Дополнительные подробности касательно способов определения конкурентного связывания представлены в примерах в данном документе. Обычно, когда конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке, он будет ингибировать (например, снижать) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном по меньшей мере на 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или 75% и более. В некоторых случаях связывание ингибируется по меньшей мере на 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97% или 97% и более.

[77] Термин «эпитоп», в контексте данного документа, относится к конкретной группе атомов или аминокислот на антигене, с которой связывается антитело. Эпитоп может быть либо линейным эпитопом, либо конформационным эпитопом. Линейный эпитоп образован непрерывной последовательностью аминокислот антигена и взаимодействует с антителом на основе их первичной структуры. С другой стороны, конформационный эпитоп состоит из прерывистых участков аминокислотной последовательности антигена и взаимодействует с антителом на основе трехмерной структуры антигена. Обычно длина эпитопа составляет приблизительно пять или шесть аминокислот. Два антитела могут связывать один и тот же эпитоп в антигене, если они демонстрируют конкурентное связывание с антигеном.

[78] В контексте данного документа термин «клетка» может быть прокариотической или эукариотической. Прокариотическая клетка включает, например, бактерии. Эукариотическая клетка включает, например, грибок, растительную клетку и клетку животного. Типы клеток животных (например, клетки млекопитающих или клетки человека) включают, например, клетки системы кровообращения/иммунной системы или органов, например, В-клетка, Т-клетка (цитотоксическая Т-клетка, естественная Т-клетка-киллер, регуляторная Т-клетка, клетка Т-хелпер), естественную клетку-киллер, гранулоцит (например, базофильный гранулоцит, эозинофильный гранулоцит, нейтрофильный гранулоцит и гиперсегментированный нейтрофил), моноцит или макрофаг, эритроцит (например, ретикулоцит), тучную клетку, тромбоцит или мегакариоцит и дендритную клетку; клетку из эндокринной системы или органа, например, клетка щитовидной железы (например, эпителиальная клетка щитовидной железы, парафолликулярная клетка), клетку паращитовидной железы (например, главная клетка паращитовидной железы, оксифильная клетка), клетку надпочечника (например, хромоаффинная клетка) и клетку шишковидной железы (например, пинеалоцит); клетку нервной системы или органа, например, глиобласт (например, астроцит и олигодендроцит), микроглию, крупноклеточную нейросекреторную клетку, звездчатую клетку, клетку Бетчера и клетку гипофиза (например, гонадотропная, кортикотропная, тиротропная, соматотропная и лактотрофная); клетку из дыхательной системы или органа, например, пневмоцит (пневмоцит типа I и пневмоцит типа II), клетка-клар, бокаловидная клетка и альвеолярный макрофаг; клетку из сердечно-сосудистой системы или органа (например, миокардиоцит и пероцит); клетку пищеварительной системы или органа, например, главная клетка желудка, париетальная клетка, бокаловидная клетка, клетка Панета, G-клетка, D-клетка, ECL-клетка, I-клетка, K-клетка, S-клетка, энтероэндокринную клетку, энтерохромоаффинную клетку, APUD-клетку и клетку печени (например, гепатоцит и клетка Купфера); клетку покровной системы или органа, например, клетка кости (например, остеобласт, остеоцит и остеокласт), клетка зуба (например, цементобласт и амелобласт), клетка хряща (например, хондробласт и хондроцит), клетка кожи/волос (например, трихоцит, кератиноцит и меланоцит (клетка невуса), мышечная клетка (например, миоцит), адипоцит, фибробласт и клетка сухожилия; клетку мочевой системы или органа (например, подоцит, юкстагломерулярная клетка, внутриклубочковая мезангиальная клетка, экстрагломерулярная мезангиальная клетка, клетка щеточной каймы проксимальных канальцев почки и клетка плотного пятна); и клетку из репродуктивной системы или органа (например, сперматозоид, клетка Сертоли, клетка Лейдига, яйцеклетка, ооцит). Клетка может быть нормальной, здоровой клеткой; или пораженной или нездоровой клеткой (например, раковая клетка). Клетка дополнительно включает зиготу млекопитающего или стволовую клетку, которая включает эмбриональную стволовую клетку, репродуктивную стволовую клетку, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку и взрослую стволовую клетку. Стволовая клетка представляет собой клетку, способную проходить циклы клеточного деления, сохраняя при этом недифференцированное состояние и дифференцируясь в специализированные типы

клеток. Стволовая клетка может быть омнипотентной стволовой клеткой, плюрипотентной стволовой клеткой, мультипотентной стволовой клеткой, олигопотентной стволовой клеткой и унипотентной стволовой клеткой, любая из которых может быть индуцирована из соматической клетки. Стволовая клетка может также включать раковую стволовую клетку. Клеткой млекопитающего может быть клетка грызуна, например, клетка мыши, крысы, хомяка. Клетка млекопитающего может быть клеткой зайцеобразного, например клеткой кролика. Клетка млекопитающего также может быть клеткой примата, например, клеткой человека.

[79] Термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR», в контексте данного документа, относится к искусственно сконструированному гибриднему белку или полипептиду, содержащему антигенсвязывающий домен антитела (например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv)), связанный с доменом или сигнальным доменом, например, домены передачи сигнала Т-клеток или домены активации Т-клеток, которые активируют иммунную клетку, например, Т-клетку или НК-клетку (см., например, Kershaw et al., выше, Eshhar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. США, 90(2): 720-724 (1993), и Sadelain et al., Curr. Opin. Immunol. 21(2): 215-223 (2009)). CAR способны перенаправлять специфичность и реактивность иммунных клеток в сторону выбранной мишени без ограничений МНС, используя антигенсвязывающие свойства моноклональных антител. Распознавание антигена, не ограниченное МНС, придает иммунным клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антиген независимо от процессинга антигена, таким образом обходя основной механизм ускользания опухоли. Кроме того, при экспрессии в Т-клетках, CAR преимущественно не димеризуются с альфа- и бета-цепями эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR).

[80] В контексте данного документа термин «по существу свободный» в отношении определенного компонента применяется в данном документе для обозначения того, что ни один из указанных компонентов не был специально включен в композицию и/или присутствует только в виде примеси или в следовых количествах. Таким образом, общее количество указанного компонента в результате любого непреднамеренного загрязнения композиции значительно ниже 0,05%, предпочтительно ниже 0,01%. Наиболее предпочтительной является композиция, в которой стандартными аналитическими методами не могут быть обнаружены никакие количества указанного компонента.

[81] Термин «клетка-хозяин» означает клетку, которая была трансформирована или способна быть трансформирована последовательностью нуклеиновой кислоты и тем самым экспрессирует представляющий интерес ген. Указанный термин включает потомство исходной клетки, независимо от того, является ли потомство идентичным с точки зрения морфологии или генетической конструкции оригинальной исходной клетке или нет, поскольку присутствует ген, представляющий интерес.

[82] Термин «идентичность» относится к взаимосвязи между последовательностями двух или большему количеству молекул полипептида или двух или большего количества молекул нуклеиновой кислоты, что определено путем выравнивания и сравнения

последовательностей. «Процент идентичности» означает процент идентичных остатков между аминокислотами или нуклеотидами в сравниваемых молекулах и рассчитывается на основании размера наименьшей из сравниваемых молекул. Для данных расчетов промежутки в выравниваниях (при наличии) предпочтительно регулируются посредством конкретной математической модели или компьютерной программы (т. е. «алгоритма»). Способы, которые можно применять для определения идентичности выровненных нуклеиновых кислот или полипептидов, включают способы, описанные в *Computational Molecular Biology*, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; *Biocomputing Informatics and Genome Projects*, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, New York: Academic Press; *Sequence Analysis Primer*, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; а также Carillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.* 48:1073.

[83] Для расчета процента идентичности сравниваемые последовательности обычно выравнивают с помощью способа, который обеспечивает наибольшее совпадение между последовательностями. Одним примером компьютерной программы, которую можно применять для определения процента идентичности, является программный пакет GCG, который включает GAP (Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.). Компьютерный алгоритм GAP применяется для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых необходимо определить процент идентичности последовательности. Последовательности выравниваются для оптимального совпадения их соответствующей аминокислоты или нуклеотида («совпавшая совокупность», определенная алгоритмом). Вместе с алгоритмом применяется штраф на внесение гэпа в выравнивание (который рассчитывают как средняя диагональ умноженная на 3; «средняя диагональ» является средним значением диагонали применяемой матрицы сравнения; «диагональ» представляет собой показатель или число, заданное специфической матрицей сравнения для каждого идеального совпадения аминокислоты), штраф на продолжение гэпа (который обычно является 1/10 частью штрафа на внесение гэпа в выравнивание), а также матрицы сравнения, например, PAM 250 или BLOSUM 62. В некоторых вариантах осуществления в алгоритме также применяется стандартная матрица сравнения (см., Dayhoff *et al.*, 1978, *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5:345-352 для матрицы сравнения PAM 250; Henikoff *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10915-10919 для матрицы сравнения BLOSUM 62)..

[84] Примеры параметров, которые можно применять для определения процента идентичности полипептидов или нуклеотидных последовательностей с помощью программы GAP, можно найти в Needleman *et al.*, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-453.

[85] Некоторые схемы выравнивания для выравнивания двух аминокислотных последовательностей могут привести к совпадению только короткой области двух последовательностей, и эта небольшая выровненная область может иметь очень высокую идентичность последовательности, даже если между двумя полноразмерными

последовательностями нет существенной взаимосвязи. Соответственно, выбранный метод выравнивания (программа GAP) может быть скорректирован, если это желательно, для получения выравнивания, которое охватывает по меньшей мере 50 или другое количество смежных аминокислот целевого полипептида.

[86] Термин «связь» в контексте данного документа относится к ассоциации посредством внутримолекулярного взаимодействия, например, ковалентных связей, металлических связей и/или ионных связей, или межмолекулярного взаимодействия, например, водородной связи или нековалентных связей.

[87] Термин «функционально связанный» относится к расположению элементов, в котором описанные таким образом компоненты сконфигурированы так, чтобы выполнять свою обычную функцию. Таким образом, данный сигнальный пептид, который функционально связан с полипептидом, направляет секрецию полипептида из клетки. В случае промотора промотор, функционально связанный с кодирующей последовательностью, будет управлять экспрессией кодирующей последовательности. Промотор или другие элементы управления не обязательно должны быть смежными с кодирующей последовательностью, пока они функционируют, направляя ее экспрессию. Например, промежуточные нетранслируемые, но транскрибированные последовательности могут присутствовать между промоторной последовательностью и кодирующей последовательностью, и промоторная последовательность все еще может считаться «функционально связанной» с кодирующей последовательностью.

[88] Применение термина «или» в формуле изобретения означает «и/или», если он явно не относится исключительно к альтернативным вариантам или же если альтернативные варианты не являются взаимоисключающими, при этом в описании допускается определение, которое относится только к альтернативным вариантам и «и/или». В контексте данного документа, «другой» может означать по меньшей мере второй или более.

[89] Термин «полинуклеотид или «нуклеиновая кислота» включает как одноцепочечные так и двухцепочечные нуклеотидные полимеры. Нуклеотиды, составляющие полинуклеотид, могут представлять собой рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды, или модифицированную форму любого типа нуклеотидов. Указанные модификации включают базовые модификации, такие как производные бромуридина и инозина, модификации рибозы, такие как 2',3'-дидеоксирибоза, и модификации межнуклеотидных связей, такие как фосфотиоат, фосфодитиоат, фосфоселеноат, фосфодиселеноат, фосфоанилотиоат, фосфоаниладат и фосфоамидат.

[90] Термины «полипептид» или «белок» означают макромолекулу, имеющую аминокислотную последовательность нативного белка, то есть белка, продуцируемого природной и нерекомбинантной клеткой; или он продуцируется генно-инженерной или рекомбинантной клеткой и содержит молекулы, имеющие аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулы, имеющие делеции, добавления и/или замены одной или нескольких аминокислот нативной последовательности. Этот термин

также включает полимеры аминокислот, в которых одна или большее количество аминокислот представляют собой химические аналоги соответствующей, встречающейся в природе, аминокислоты и полимеров. Термины «полипептид» и «белок» конкретно охватывают антигенсвязывающие белки DDR1, антитела или последовательности, имеющие делеции, добавления и/или замещения одной или большего количества аминокислот антигенсвязывающего белка. Термин «фрагмент полипептида» относится к полипептиду, который имеет amino-концевую делецию, карбоксильную концевую делецию и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным исходным белком. Такие фрагменты также могут содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с исходным белком. В некоторых вариантах осуществления фрагменты имеют длину от пяти до 500 аминокислот. Например, фрагменты могут иметь длину по меньшей мере 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот. Пригодные полипептидные фрагменты включают иммунологически функциональные фрагменты антител, включая связывающие домены. В случае DDR1-связывающего антитела пригодные фрагменты включают, помимо прочего, область CDR, переменный домен тяжелой и/или легкой цепи, часть цепи антитела или только ее переменную область, включая две CDR, и и тому подобное.

[91] Фармацевтически приемлемые носители, используемые в данном изобретении, являются широко применяемыми. В публикации Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975), описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки описанных в данном документе слитых белков. В общем, природа носителя будет зависеть от конкретного применяемого способа введения. Например, парентеральные составы обычно содержат жидкости для инъекций, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический солевой раствор, сбалансированные растворы солей, водный раствор декстрозы, глицерин и т.п. в качестве носителя. Для твердых композиций (например, в форме порошка, пилюль, таблеток или капсул) обычные нетоксичные твердые носители могут включать, например, маннит фармацевтической степени чистоты, лактозу, крахмал или стеарат магния. В дополнение к биологически нейтральным носителям вводимые фармацевтические композиции могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты и pH-буферные агенты и т.п., например, ацетат натрия или монолаурат сорбитана.

[92] В контексте данного документа термин «субъект» относится к человеку или любому животному, отличному от человека (*например*, мыши, крысе, кролику, собаке, кошке, крупному рогатому скоту, свинье, овце, лошади или примату). Понятие человек включает пре- и постнатальные формы. Во многих вариантах осуществления субъект представляет собой человека. Субъектом может быть пациент, который относится к человеку, представленному медицинскому учреждению для диагностики или лечения заболевания. Термин «субъект» применяется в данном документе взаимозаменяемо с

«индивидуумом» или «пациентом». Субъект может быть поражен или являться предрасположенным к заболеванию или нарушению, но может и не иметь симптомов заболевания или нарушения.

[93] В контексте данного документа термин «терапевтически эффективное количество» или «эффективная доза» относится к дозе или концентрации лекарственного средства, эффективной для лечения заболевания или патологического состояния. Например, что касается применения моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, для лечения рака, терапевтически эффективным количеством является доза или концентрация моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способная уменьшать объем опухоли, полностью или частично эрадикаровать опухоль, ингибировать или замедлять рост опухоли или инфильтрацию раковых клеток в другие органы, ингибировать рост или пролиферацию клеток, опосредующих раковое заболевание, ингибировать или замедлять метастазирование опухолевых клеток, улучшать любой симптом или маркер, ассоциированный с опухолью или раковым состоянием, предотвращать или задерживать развитие опухоли или ракового состояния, или некоторые их комбинации.

[94] Термин «процесс лечения» или «лечение» патологического состояния, в контексте данного документа, включает предотвращение или облегчение патологического состояния, замедление начала или скорости развития патологического состояния, снижение риска развития патологического состояния, предотвращение или задержку развития симптомов, ассоциированных с патологическим состоянием, ослабление или прекращение симптомов, ассоциированных с патологическим состоянием, создание полной или частичной регрессии патологического состояния, излечение патологического состояния или некоторую их комбинацию.

[95] В контексте данного документа термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, введенной в клетку-хозяин, в результате чего образуется трансформированная клетка-хозяин. Вектор может включать последовательности нуклеиновых кислот, которые позволяют ему реплицироваться в клетке-хозяине, например, точка начала репликации. Вектор может также включать один или большее количество терапевтических генов и/или селективных маркерных генов и других генетических элементов, известных в данной области техники. Вектор может трансдуцировать, трансформировать или инфицировать клетку, тем самым заставляя клетку экспрессировать нуклеиновые кислоты и/или белки, отличные от нативных для клетки. Вектор необязательно включает материалы, способствующие проникновению нуклеиновой кислоты в клетку, такие как вирусная частица, липосома, белковое покрытие и т.п.

II. DDR1 и антитела к DDR1

A. DDR1

[96] Рецепторные тирозинкиназы (RTK) играют ключевую роль в коммуникации клеток с их микроокружением. Эти молекулы участвуют в регуляции клеточного роста, дифференцировки и метаболизма. Белок DDR1, кодируемый геном *DDR1*, представляет

собой RTK, которая широко экспрессируется в нормальных и трансформированных эпителиальных клетках и активируется различными типами коллагена. Белок DDR1 принадлежит к подсемейству тирозинкиназных рецепторов с областью гомологии с белком дискоидином I Dictyostelium discoideum во внеклеточном домене. Его аутофосфорилирование достигается всеми протестированными коллагенами (от типа I до типа VI). Близкородственным представителем семейства является белок DDR2. Исследования *in situ* и Нозерн-блоттинг продемонстрировали, что экспрессия белка, кодируемого DDR1, ограничена эпителиальными клетками, особенно в почках, легких, желудочно-кишечном тракте и головном мозге. Кроме того, белок DDR1 в значительной мере сверхэкспрессируется в некоторых опухолях молочной железы, яичников, пищевода и головного мозга у детей. Этот ген расположен на хромосоме бр21.3 рядом с несколькими генами HLA класса I. Альтернативный сплайсинг этого гена приводит к множественным вариантам транскриптов. Репрезентативной последовательностью мРНК для DDR1 является NM_001202521 (SEQ ID NO:1), а репрезентативной аминокислотной последовательностью является NP_001189450 (SEQ ID NO:2).

В. Антитела к белку DDR1

[97] Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты в контексте данного изобретения могут быть определены, в первую очередь, по их специфичности связывания, которая в данном случае относится к DDR1. Специалисты в данной области техники путем оценки специфичности связывания/аффинности данного антитела с применением методов, хорошо известных специалистам в данной области, могут определить, подпадают ли такие антитела под объем прилагаемой формулы изобретения.

[98] В одном аспекте предлагаются антитела и антигенсвязывающие фрагменты, специфически связывающиеся с DDR1. В некоторых вариантах осуществления при связывании с DDR1 такие антитела модулируют активацию DDR1. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент при связывании с DDR1 активирует DDR1. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент при связывании с DDR1 подавляет активацию DDR1. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент при связывании с DDR1 может специфически препятствовать, блокировать или уменьшать взаимодействие между DDR1 и его партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты, представленные в данном документе, специфически или селективно связываются с DDR1 человека.

[99] В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с DDR1 человека и/или существенно ингибируют связывание DDR1 человека с его партнерами по связыванию по меньшей мере на около 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-85% или более (например, с помощью анализа, описанного в Примере). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет K_d меньше (более прочное связывание), чем 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} M.

[100] Хотя антитела по данному изобретению генерировали в форме IgG, может оказаться полезным модифицировать константные области для изменения их функции. Константные области антител обычно опосредуют связывание антитела с тканями или факторами организма-хозяина, включая различные клетки иммунной системы (*например*, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, термин «антитело» включает интактные иммуноглобулины типов IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также их подтипы), при этом легкие цепи иммуноглобулина могут относиться к типам каппа или лямбда. В легкой и тяжелой цепях переменная и константная области соединены областью «J», состоящей из около 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает область «D», состоящая еще из около 10 аминокислот. См., например, публикацию *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

[101] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком DDR1, при этом указанное антитело содержит LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в последовательности переменной области легкой цепи, представленной в **Таблице 3**, и HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в **Таблице 4**; или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[102] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в последовательности переменной области легкой цепи, представленной в **Таблице 3**, и HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в **Таблице 4**; или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или комбинации, при этом последовательность переменной области легкой цепи и последовательность переменной области тяжелой цепи представляет собой последовательность переменной области легкой цепи и последовательность переменной области тяжелой цепи в виде спаренной с клоном (*например*, с одинаковым обозначением mAb), представленные в **Таблице 3** и **Таблице 4** соответственно. Типовой вариант осуществления «спаренные с клоном» LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 последовательности переменной области легкой цепи и HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 последовательности переменной области тяжелой цепи представляет собой LC-CDR и HC-CDR последовательности переменной области легкой цепи и последовательности переменной области тяжелой цепи, соответственно, mAb DDR1-1.

[103] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую последовательности LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3, выбранные из последовательностей LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 для каждого mAb, указанные в **Таблице 1**; и переменную область тяжелой цепи, содержащую HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3, выбранные из

последовательностей HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 для каждого mAb, указанные в **Таблице 2**, или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеет одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, HC-CDR2, и HC-CDR3 спаренные с клоном LC-CDR и HC-CDR, представленные в **Таблице 1** и **Таблице 2**, соответственно, или их варианты, при этом одна или большее количество LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации.

Таблица 1. CDR последовательностей вариабельной области аминокислот легкой цепи антител DDR1

mAb Название	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	CDR3	SEQ ID NO
DDR1-1	QNIYSN	3	GAS	QSGYYSSSTDIA	4
DDR1-3	QTISSW	5	YAF	QGGISSSNVDNV	6
DDR1-5	QTISSW	7	YAF	QCTYGSGSSSSYGCA	8
DDR1-6	QSVYSNY	9	ETS	QGGYSEIIENT	10
DDR1-9	QSIGSV	11	GVF	QYIPYGSSP	12
DDR1-11	QSIGSTY	13	KAS	LYGGFGSSTGDA	14
DDR1-12	QTIYSN	15	QAS	QSYYGADDYT	16
DDR1-13	KSVYNNNA	17	GVS	AGDYSDISDNN	18
DDR1-14	QSISSY	19	EAS	QNNNGFSGSNFNN	20
DDR1-15	QTIYSS	21	KAS	QQGSSISNVDKNA	22
DDR1-17	QSIGSY	23	EAS	QNNNGMTVSDFNA	24
DDR1-20	QIIDHDH	25	RAS	QNNNGMTVSDFNA	26
DDR1-21	QSVVDKNW	27	EAS	AGDFESGVSG	28
DDR1-22	KNIYNNNA	29	GAS	AADYSDISDNN	30
DDR1-23	QSVYSNNY	31	AAS	LGGYNDDAN	32
DDR1-26	ESVYSNNH	33	AAS	LGGYNDDAN	34
DDR1-28	QSIDNND	35	RTS	QSYCVNTYGYT	36
DDR1-29	QSISNH	37	RAS	QSYIINRSNYANS	38
DDR1-32	ESINSW	39	DAS	QSYIINRSNYGNS	40
DDR1-33	ETISSR	41	QAS	QGCYYGGGSFYDSA	42
DDR1-34	ENLYKDNY	43	GAS	AGGYDSVVD	44

Таблица 2. CDR последовательностей вариабельной области аминокислот

тяжелой цепи антител DDR1

мAb Название	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
DDR1-1	GFSLSR YA	45	IGSSGLT	46	ARGMWYDDSDDY EDYFNL	47
DDR1-3	GIDLSS YA	48	INIGGGT	49	ARDVDAHTLTYFT L	50
DDR1-5	GFTLS NNA	51	IYASGRT	52	ARGDTETDYGIPYF DL	53
DDR1-6	GFSFSS SYY	54	IYASSGST	55	AILGADYRLTRLDL	56
DDR1-9	GFSLN RYY	57	ISYGDTT	58	ARADTGDNGYLGL QL	59
DDR1-11	GFSFSS GYG	60	IYTGRDFT	61	ARGDYSGGVGGN YWLDL	62
DDR1-12	GIDLSN TW	63	ITDSGTT	64	GRDPGDITSGTNDL	65
DDR1-13	SGFSLN NY	66	IFNNGDI	67	ARTGYRTGGWL	68
DDR1-14	GIDLSY YA	69	INGRGDT	70	AREDSAIPFIVGNY YGMDL	71
DDR1-15	TFSFNS RYW	72	INNGDIS	73	AKGGNLAGDCY L	74
DDR1-17	GFSLN RYA	75	IGSSGST	76	ARDLDDSYGYTYA TGMDIRLDL	77
DDR1-20	GFSLSD YA	78	INSRDDT	79	AREDSSIPFIVGNY YGMDL	80
DDR1-21	GFSLSS YG	81	IYPSGSI	82	VRYLTGSSDLHL	83
DDR1-22	GFSLSD YA	84	INNGDIY	85	ARPGYRTGIWL	86
DDR1-23	GFDLR SYYY	87	IHGEGNT	88	RGGWTNYF	89

DDR1-26	GFDLSS NYY	90	IYSSNTRT	91	RGGWTNYL	92
DDR1-28	GFSLSS HD	93	IISSGNT	94	ARDVYSGASP	95
DDR1-29	TFSFNS RYW	96	INNGDIT	97	AKGGNLAGDCYGL	98
DDR1-32	GFSLSS YY	99	ITTAGPL	100	ARGHAGSIYYSYF DL	101
DDR1-33	GFSLSS YD	102	SWNSGFV	103	ARLGADDIYYFNL	104
DDR1-34	GFDLSS YYY	105	IYTSSGAT	106	RGGWCDFNL	107

[104] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QNIYSN (SEQ ID NO: 3), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GAS, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QSGYYSSDIA (SEQ ID NO: 4), и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSRYA (SEQ ID NO: 45), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность IGSSGLT (SEQ ID NO: 46), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARGMWYDDSDDYEDYFNL (SEQ ID NO: 47) (DDR1-1), или ее варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или комбинации.

[105] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QTISSW (SEQ ID NO: 5), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность YAF, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQGISSSNVDNV (SEQ ID NO: 6), и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GIDLSSYA (SEQ ID NO: 48), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность INIGGGT (SEQ ID NO: 49), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARDVDAHTLTYFTL (SEQ ID NO: 50) (DDR1-3) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[106] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QTISSW (SEQ ID NO: 7), LC-

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность YAF, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QCTYGSGSSSSYGCA (SEQ ID NO: 8), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFTLSNNA (SEQ ID NO: 51), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность IYASGRT (SEQ ID NO: 52), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARGDTETDYGIPYFDL (SEQ ID NO: 53) (DDR1-5) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[107] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSVYSNY (SEQ ID NO: 9), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность ETS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QGGYSEIIENT (SEQ ID NO: 10), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSFSSSY (SEQ ID NO: 54), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность IYASSGST (SEQ ID NO: 55), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность AILGADYRLTRLDL (SEQ ID NO: 56) (DDR1-6) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[108] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSIGSV (SEQ ID NO: 11), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GVF, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QYIPYGSSP (SEQ ID NO: 12), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLNRY (SEQ ID NO: 57), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность ISYGDIT (SEQ ID NO: 58), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARADTGDNGYLGLQL (SEQ ID NO: 59) (DDR1-9) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[109] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSIGSTY (SEQ ID NO: 13), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность KAS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность LYGGFGSSTGDA (SEQ ID NO: 14), и переменная область тяжелой цепи, имеющая HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSFSSGY (SEQ ID NO: 60), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность IYTGRTDFT (SEQ ID NO: 61), и HC-CDR3,

содержащую аминокислотную последовательность ARGDYSGGVGGNYWLDL (SEQ ID NO: 62) (DDR1-11) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[110] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QTIYSN (SEQ ID NO: 15), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность QAS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QSYYGADDYT (SEQ ID NO: 16), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GIDLNTW (SEQ ID NO: 63), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность ITDSGTT (SEQ ID NO: 64), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность GRDPGDITSGTNDL (SEQ ID NO: 65) (DDR1- 12) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[111] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность KSVYNNNA (SEQ ID NO: 17), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GVS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность AGDYSDISDNN (SEQ ID NO: 18), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SGFSLNNY (SEQ ID NO: 66), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность IFNNGDI (SEQ ID NO: 67), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARTGYRTGGWL (SEQ ID NO: 68) (DDR1-13) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[112] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSISY (SEQ ID NO: 19), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность EAS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QNNNGFSGSNFNN (SEQ ID NO: 20), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GIDLSYYA (SEQ ID NO: 69), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность INGRGDT (SEQ ID NO: 70), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность AREDSAIPFIVGNYYGMDL (SEQ ID NO: 71) (DDR1-14) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[113] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую

LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QTIYSS (SEQ ID NO: 21), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность KAS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQGSSISNVDKNA (SEQ ID NO: 22), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность TFSFNSRYW (SEQ ID NO: 72), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность INNGDIS (SEQ ID NO: 73), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность AKGGNLAGDCYGL (SEQ ID NO: 74) (DDR1-15) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[114] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSIGSY (SEQ ID NO: 23), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность EAS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QNNNGMTVSDFNA (SEQ ID NO: 24), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLNRYA (SEQ ID NO: 75), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность IGSSGST (SEQ ID NO: 76), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARDLDDSYGYTYATGMDIRLDL (SEQ ID NO: 77) (DDR1-17) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[115] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QIIDHDH (SEQ ID NO: 25), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность RAS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QNNNGMTVSDFNA (SEQ ID NO: 26), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSDYA (SEQ ID NO: 78), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность INSRDDT (SEQ ID NO: 79), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARESSIPFIVGNYYGMDL (SEQ ID NO: 80) (DDR1-20) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[116] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSVVDKNW (SEQ ID NO: 27), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность EAS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность AGDFESGVSG (SEQ ID NO: 28), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSSYG (SEQ ID NO: 81), HC-CDR2, содержащую

аминокислотную последовательность IYPSGSI (SEQ ID NO: 82), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность VRYLTGSSDLHL (SEQ ID NO: 83) (DDR1-21) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[117] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность KNIYNNNA (SEQ ID NO: 29), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GAS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность AADYSDISDNN (SEQ ID NO: 30), и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSDYA (SEQ ID NO: 84), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность INNGDIY (SEQ ID NO: 85), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARPGYRTGIWL (SEQ ID NO: 86) (DDR1-22) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[118] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSVYSNNY (SEQ ID NO: 31), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность AAS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность LGGYNDDAN (SEQ ID NO: 32), и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFDLRSYYY (SEQ ID NO: 87), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность IHGGEGNT (SEQ ID NO: 88), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность RGGWTNYF (SEQ ID NO: 89) (DDR1-23) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[119] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность ESVYSNNH (SEQ ID NO: 33), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность AAS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность LGGYNDDAN (SEQ ID NO: 34), и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFDLSSNYY (SEQ ID NO: 90), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность IYSSNTRT (SEQ ID NO: 91), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность RGGWTNYL (SEQ ID NO: 92) (DDR1-26) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[120] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSIDNND (SEQ ID NO: 35),

LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность RTS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QSYCVNTYGYT (SEQ ID NO: 36), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSSH D (SEQ ID NO: 93), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность IISSGNT (SEQ ID NO: 94), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARDVYSGASP (SEQ ID NO: 95) (DDR1-28) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[121] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSISNH (SEQ ID NO: 37), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность Ras и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QSYIIINRSNYANS (SEQ ID NO: 38), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность TFSFNSRYW (SEQ ID NO: 96), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность INNGDIT (SEQ ID NO: 97), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность AKGGNLAGDCYGL (SEQ ID NO: 98) (DDR1-29) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[122] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность ESINSW (SEQ ID NO: 39), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность DAS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QSYIIINRSNYGNS (SEQ ID NO: 40), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSSYY (SEQ ID NO: 99), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность ITTAGPL (SEQ ID NO: 100), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARGHAGSIYYSYFDL (SEQ ID NO: 101) (DDR1-32) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[123] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность ETISSR (SEQ ID NO: 41), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность AAS и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QGCYYGGGSFYDSA (SEQ ID NO: 42), и переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSSYD (SEQ ID NO: 102), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SWNSGFV (SEQ ID NO: 103), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARLGADDIYYFNL (SEQ ID

NO: 104) (DDR1-33) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[124] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность ETISSR (SEQ ID NO: 41), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность QAS, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QGCYYGGGSFYDSA (SEQ ID NO: 42), и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSSYD (SEQ ID NO: 102), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SWNSGFV (SEQ ID NO: 103), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARLGADDIYYFNL (SEQ ID NO: 104) (DDR1-33) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[125] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность ENLYKDNV (SEQ ID NO: 43), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GAS, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность AGGYDSVVD (SEQ ID NO: 44), и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFDLSSYYY (SEQ ID NO: 105), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SIYTSSGAT (SEQ ID NO: 106), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность RGGWCDFNL (SEQ ID NO: 107) (DDR1-34) или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три замены, добавления, делеции или комбинации аминокислот.

[126] В некоторых вариантах осуществления LC-CDR в **Таблице 1** и HC-CDR в **Таблице 2** кодируются полинуклеотидами в **Таблице 6** и **Таблице 7** соответственно, как дополнительно обсуждается ниже.

[127] В некоторых вариантах осуществления LC-CDR и HC-CDR помещены в подходящий контекст последовательностей каркасной области (FR) с образованием вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, которые определяют специфичность связывания антитела. В некоторых вариантах осуществления последовательности каркасной области антитела с идентифицированными LC-CDR и HC-CDR представляют собой последовательности каркасной области исходного изолята антитела. В некоторых вариантах осуществления LC-CDR и HC-CDR используются с последовательностями каркасной области от других видов млекопитающих, например, приматов. В некоторых вариантах осуществления каркасные последовательности представляют собой гуманизированные или человеческие каркасные последовательности для образования антитела, которое специфически связывается с белком DDR1. В некоторых

вариантах осуществления переменная область легкой цепи содержит четыре каркасные области легкой цепи, например, обозначенные как FR_{LC1} , FR_{LC2} , FR_{LC3} , и FR_{LC4} , и LC-CDR в соответствии со следующей организацией от NH_2 в направлении COOH: FR_{LC1} —LC-CDR1— FR_{LC2} —LC-CDR2— FR_{LC3} —LC-CDR3— FR_{LC4} . В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит четыре каркасных области тяжелой цепи, например, обозначенные как FR_{HC1} , FR_{HC2} , FR_{HC3} , и FR_{HC4} , и HC-CDR в соответствии со следующей организацией от NH_2 в направлении COOH: FR_{HC1} —HC-CDR1— FR_{HC2} —HC-CDR2— FR_{HC3} —HC-CDR3— FR_{HC4} . В некоторых вариантах осуществления каркасные области исходной переменной области легкой цепи заменены каркасными областями переменных областей легкой цепи человека с образованием гуманизованных переменных областей легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления каркасные области исходной переменной области тяжелой цепи заменены каркасными областями переменных областей тяжелой цепи человека с образованием гуманизованных переменных областей тяжелой цепи.

[128] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком DDR1, содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи, выбранную из последовательностей, представленных в **Таблице 3**, т. е. SEQ ID NO: 108-128. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком DDR1, содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, выбранную из, т. е. SEQ ID NO: 129-149.

[129] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 108-128, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 129-149. В различных вариантах осуществления любая из аминокислотных последовательностей переменной области легкой цепи, соответствующих SEQ ID NO: 108-128, может быть использована с любой из аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, соответствующих SEQ ID NO: 129-149.

[130] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 108-128, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 129-149. В различных вариантах осуществления любая из аминокислотных последовательностей переменной области легкой цепи, соответствующих SEQ ID NO: 108-128, может быть использована с любой из аминокислотной последовательности

вариабельной области тяжелой цепи, соответствующих SEQ ID NO: 129-149. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с белком DDR1, содержат аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи спаренной с клоном аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, и аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленные в **Таблице 3** и **Таблице 4** соответственно.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи антител к DDR1

mAb Название	Аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи	SEQ ID NO:
DDR1-1K	ELVLTQTPASVSAAVGGTVTINCQASQNIYSNLAWYQQKPGQ PPKLLIYGASNLESGVPSRFKGSSTGTEFTLTISDLECDAAATY YCQSGYYSSSTDIAFGGGTEVVVK	108
DDR1-3K	ELVLTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASQTISWLSWYQQKPGQP PKLLIYYAFNLASGVPSRFKGSSTGTEFTLTISDLECADAAATY YCQGGISSNVDNVFGGGTEVVVK	109
DDR1-5K	ELVLTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASQTISWLSWYQQKPGQP PKLLIYYAFNLASGVPSRFKGSSTGTEYTLTISDLECADAAATY YCQCTYGSSTSSSYGCAFGGGTELEIK	110
DDR1-6K	ELVMTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSQSVYSNYLSWYQQKPG QPPKLLIYETSTLASGVPSRFKGSSTGTEFTLTISDVQCDDAAT YYCQGGYSEIIENTFGGGTEVEIK	111
DDR1-9K	ELVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSIGSVLAWYQQKPG QRPKLLISGVFDLASGVPSRFKGSSTGTEFTLTISDLECADAAAT YYCQYIPYGSSTPFGGGTEVVVK	112
DDR1-11K	ELVMTQTASPVSAAVGGTVTINCQASQSIGSTYLSWYQQKPG QPPKLLIYKASILASGVPSRFSGSTGTEYTLTISGVQCDDAAT YYCLYGGFGSSTGDAFGGGTVLVVK	113
DDR1-12K	ELVLTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASQTIYSNLAWYQQKPGQ RPKLLIYQASKLASGVPSRFKGSSTGTEYTLTISDLECADAAAT YYCQSYYGADDYTFGGGTEVVVK	114
DDR1-13K	ELVMTQTPSPVSAAVGGTVISQSSKSVYNNNALSFWQKPG GQPPKVLIVGVSTLDSGVSSRFSGSYGTEFTLTISDVQCDDA ATYYCAGDYSDISDNNFGGGTELEIK	115
DDR1-	ELDMTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASQSISSYLAWYQQKPGQ	116

14K	PPKRLIFEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISDLECADAATY YCQNNNGFSGSNFNFFGGGTEVEIK	
DDR1- 15K	ELVMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQTIYSSLAWYQQKPGQ PPKLLIYKASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAAT YYCQQGSSISNVDKNAFGGGTEVEIK	117
DDR1- 17K	ELVLTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASQSIGSYLSWYQQKAGQ PPKRLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISDLECADVATY YCQNNNGMTVSDFNFGGGTEVEIK	118
DDR1- 20K	ELDLTQTPASVSAAVGGTVTINCQSSQIIDHDHLSWYQQKPG QRPKLLIYRASTLTSGVPSRFKSGSGTDFTLTISDLECADVAT YYCQNNNGMTVSDFNFGGGTEVEIK	119
DDR1- 21K	ELVLTQTPSSVSAAVGGTVTISCQSSQSVVDKNWLAWYQQKP GQPPKLLIYEASKLASGVPPRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDA ATYYCAGDFESGVSGFGGGTEVEIK	120
DDR1- 22K	ELVLTQTPSPVSAAVGGTVTINCQSSKNIYNNNALSWFQQKP GQPPKLLIYGASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDDA ATYYCAADYSDISDNNFGGGTEVVVK	121
DDR1- 23K	ELVLTQTPSSVSAAVGGTVTISCQSSQSVYSNNYLAWYQQKP GQPPKLLIYAASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDA AVYYCLGGYNDDANFGGGTEVEIK	122
DDR1- 26K	ELDLTQTPSSVSAAVGGTVTISCQSSQSVYSNNHLAWYQQKP GQPPKLLIYAASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDA AVYYCLGGYNDDANFGGGTEVVVK	123
DDR1- 28K	ELDLTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSIDNNDLAWYQQKPG QPPNLLISRTSTLASGVSSRFKSGSGTEFTLTISDLECADAAT YYCQSYCVNTYGYTFGGGTEVVVK	124
DDR1- 29K	ELVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSSISNHLGWYQQKPG QPPKLLIYRASTLESVSSRFKSGSGSEFTLTISDLECADAAT YYCQSYIINRSNYANSFGGGTEVEIK	125
DDR1- 32K	ELVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASESINSWLAWYQQKPG QRPKLLIYDASKLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECADAA TYYCQSYIINRSNYGNSFGGGTEVEIK	126
DDR1- 33K	ELVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASETISRLAWYQQKPGQ PPKLLIYQASKLPSGVPSRFKGTGSGTEYTLTISDLECADAATY	127

	YCQGCYYGGGSFYDSAFGGGTEVVVK	
DDR1-34K	ELDLTQTPASVSAAVGGTVTISCQSSENLYKDNYLAWYQQKP GQPPKLLIYGASNLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECDDA ATYYCAGGYDSVVDFFGGGTEVVVK	128

Таблица 4. Аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи антител к DDR1

mAb Название	Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи	SEQ ID NO:
DDR1-1H	QSVESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSRyamtwvrqapgk GLEWIGIIGSSGLTYFATWAKGRFTISKtsttvdlkitsptted TATYFCARGMWYDDSDDYEDYFNLWGPGTLVTISS	129
DDR1-3H	QSVKESGGRLVTPGTPLTLCTVSGIDLSSyamswvrqapgk GLEWIGTINIGGGTWDATWARGRFTISRtsttvdlkitsptigd TATYFCARDVDAHTLYFTLWGPGTLVTISS	130
DDR1-5H	QSVKESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFTLSNNAISwvrqapgk GLEWIGIYASGRYYATWAKGRFTISKtsttvdlkmtsptte DTATYFCARGDTETDYGIPYFDLWGPGTLVTISS	131
DDR1-6H	SQSLKESGGDLVKPGASRTLTCIAPGFSFSSYYMCwvrqap GKLEWIACIYASSGSTYYASWAKGRFTISKtsttvTLQMTT LTAADTATYFCAAILGADYRLRLDLWGQGTLVTVSS	132
DDR1-9H	QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTASGFSLNRYyMLwvrqapge GLEWIGTISYGDTTYASWAKGRFTISKtsttvdlkmtsptte DTATYFCARADTGDNGYLGLQLWGPGTLVTVSS	133
DDR1-11H	QSLEESGGDLVKPGASLTLCTASGFSFSSGYyMCwvrqapg KLEWIACIYTGRTDFDYASWAKGRFTISKtsttvTLQLTT LTAADTATYFCARGDYSGGVGGNYWLDLWGQGTLVTISS	134
DDR1-12H	QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGIDLSNTWmnwvrqapgk GLEWIGVITDSGTTYANWAKGRFTISRtsttvdlkmpsltte DTATYFCGRDPGDITSGTNDLWGPGTLVTISS	135
DDR1-13H	EQSVESGGRLVTPGSLTLCTASGFSLNNYAIIwvrqapgk GLEYIGIFNNGDIYYANWAKGRFTISKtsttvGLKIVSPTTEDT ATYFCARTGYRTGGWLWGPGTLVTISS	136
DDR1-14H	QSVKESGGRLVTPGTPLTLCTVSGIDLSYYAMSswvrqapgk GLEYIGIINGRGDTGYATWAKGRFTISKtsttvDLRITSPTIED TATYFCAREDSAIPFIVGNYYGMDLWGPGTLVTVSS	137

DDR1- 15H	SQSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASTFSFNSRYWTCWVRQAP GKGLEWIGCINNGDISTYYASWATGRFTISKSSSTTVTLHMTS LTAADTATYFCAKGGNLAGDCYGLWGPGLVTISS	138
DDR1- 17H	SSVEESGGRLVAPGTPLTLTCTVSGFSLNRYAMSWVRQAPGK GLEWIGIIGSSGSTYYASWAKGRFTISKTSTTVDLKITSPTTED TATYFCARDLDDSYGYTYATGMDIRLDLWGQGLVTVSS	139
DDR1- 20H	QSVKESGGGLFKPMDTLTLTCTVSGFSLSDYAMSWVRQAPG KGLEWIGIINSRDDTGYASWAKGRFTISKTSSSTTVDLRITSPTT EDTATYFCAREDSSIPFIVGNYYGMDLWGPGLVTVSS	140
DDR1- 21H	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSYGVHWVRQAPGK GLDWIGKIYPSGSIYYSSWAKGRFTISKTSTTVDLKMTSLTTE DTATYFCVRYLTGSSDLHLWGPGLVTISS	141
DDR1- 22H	QSVKESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGFSLSDYAMIWVRQAPGK GLEYIGIINNGDIYYATWAKGRFTISETSSSTMGLNIISPTTEDT ATYFCARPGYRTGIWLWGPGLVTISS	142
DDR1- 23H	SQSVKESGGDLVKPGASLTLTCKASGFDLRSYYYMCWVRQA PGKGLEWIACIHGGEGNTYYASWAKGRFTISKTSSSTAVTLQM TSLTAADTATYFCARGGWTNYFWGPGLVTVSS	143
DDR1- 26H	EQSLKESGGDLVKPGASLTLTCTASGFDLSSNYMCWVRQA PGKGPEWIACIYSSNTRTWYARWAKGRFTISKTSSSTAVTLQM TSLTAADTATYFCARGGWTNYLWGPGLVTISS	144
DDR1- 28H	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSHDMIWVRQAAGK GLEWIGLISSGNTWYASWAKGRFTISKTSTTVDLKMTSLTTE DTATYFCARDVYSGASPWGPGLVTISS	145
DDR1- 29H	QSVKSGGGLVKPGASLTLTCKASTFSFNSRYWTCWVRQAPG KGLEWIGCINNGDITTYTNWATGRFTISKSSSTTVTLQMTSL TAADTATYFCAKGGNLAGDCYGLWGPGLVTISG	146
DDR1- 32H	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFLSSYYMSWVRQAPGE GLEWIGTITTAGPLYATWAKGRFTISKTSTTVDLKMTGPTTE DTATYFCARGHAGSIYYSYFDLWGPGLVTVSS	147
DDR1- 33H	QSVEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGFSLSSYDMSWVRQAPGK GLEWIGISWNSGFVDYASWAKGRFSISKSTTVDLKITSPTTE DTATYFCARLGADDIYYFNLWGPGLVTISS	148
DDR1-	QSVKESGGGLVKPEGSLTLTCKASGFDLSSYYYMCWVRQAP	149

последовательность SEQ ID NO: 127 (DDR1-33K), и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148 (DDR1-33H).

[151] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128 (DDR1-34K), и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149 (DDR1-34H).

[152] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты представляют собой гуманизованное антитело родительского антитела DDR1-9, как описано в Примерах. Переменная область легкой цепи и переменная область тяжелой цепи представлены в **Таблице 5**. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие гуманизованные переменные области, представлены ниже в **Таблице 10**.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности гуманизованного антитела DDR1-9hu

mAb	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
DDR1-9hu_Lv1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCQASQSIGSVLAWYQQKPGK APKLLISGVFDLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATY YCQYIPYGSSPFGGGTKVEIK	150
DDR1-9hu_Lv2	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQSIGSVLAWYQQKPGK APKLLIYGVFSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATY YCQYIPYGSSPFGGGTKVEIK	151
DDR1-9hu_Hv	QVQLVESGGRVVPGRSLRLSCTASGFSLNRYMLWVRQAP GKGLEWIGTISYGDTTYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARADTGDNGYLGLQLWGQGTLVTVSS	152

[153] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 150 (DDR1-9hu_Lv1). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 151 (DDR1-9hu_Lc2). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 151 (DDR1-9hu_Lc2). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат переменную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 150 (DDR1-9hu_Lv1) или SEQ ID NO: 151 (DDR1-9hu_Lc2), и переменную область тяжелой

цепи, имеющую HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 151 (DDR1-9hu_Lc2).

[154] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150 (DDR1-9hu_Lv1) или SEQ ID NO: 151 (DDR1-9hu_Lc2), и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152 (DDR1-9hu_Hv). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150 (DDR1-9hu_Lv1), и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152 (DDR1-9hu_Hv). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151 (DDR1-9hu_Lc2), и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152 (DDR1-9hu_Hv).

[155] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты представляют собой вариант, в котором последовательность вариабельной области легкой цепи и/или последовательность вариабельной области тяжелой цепи указанного варианта имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или большее количество аминокислотных замен, добавлений, делеций или комбинаций по сравнению с исходной последовательностью вариабельной области легкой цепи или последовательностью вариабельной области тяжелой цепи, при этом указанный вариант сохраняет специфичность связывания с белком DDR1 и/или другие функциональные свойства. В некоторых вариантах осуществления последовательность вариабельной области легкой цепи и/или последовательность вариабельной области тяжелой цепи указанного варианта содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или большее количество консервативных или неконсервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления указанный вариант имеет 1, 2 или 3 аминокислотные замены, добавления, делеции или комбинации в одной или большем количестве LC-CDR и/или HC-CDR варианта вариабельной области легкой цепи или варианта вариабельной области тяжелой цепи по сравнению с исходными LC-CDR или HC-CDR. В некоторых вариантах осуществления вариант антитела или его антигенсвязывающий фрагмент имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или комбинаций в каркасной области последовательности вариабельной области легкой цепи и/или вариабельной области тяжелой цепи по сравнению с исходной последовательностью вариабельной области легкой цепи или последовательностью вариабельной области тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или большее количество консервативных или неконсервативных аминокислотных замен в каркасной области последовательности вариабельной области легкой цепи и/или вариабельной области тяжелой цепи. Вышеприведенные варианты

применимы к каждой из переменных областей легкой цепи в **Таблице 3** и **Таблице 5** и к каждой из переменных областей тяжелой цепи в **Таблице 4** и **Таблице 5**.

[156] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности любой из аминокислотных последовательностей переменной области легкой цепи, выбранных из SEQ ID NO: 108-128 в **Таблице 3** и SEQ ID NO: 150 и 151 в **Таблице 5**: В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности любой из аминокислотных последовательностей переменной области тяжелой цепи, выбранных из SEQ ID NO: 129-149 в **Таблице 4** или SEQ ID NO: 152 в **Таблице 5**. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности любой из аминокислотных последовательностей переменной области легкой цепи, выбранных из SEQ ID NO: 108-128 в **Таблице 3** и SEQ ID NO: 150 и 151 в **Таблице 5**, и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи, имеющая 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности любой из аминокислотных последовательностей переменной области тяжелой цепи, выбранных из SEQ ID NO: 129-149 в **Таблице 4** и SEQ ID NO: 152 в **Таблице 5**.

[157] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 133. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 112, и аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 133.

[158] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие

фрагменты содержат аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 127. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 148. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 127, и аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 148.

[159] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 150 или 151. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 152. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты содержат аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 150 или 151 аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 152.

[160] В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи, содержащая LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3, описанные в данном документе (например, в **Таблице 1**), или указанные вариабельные области легкой цепи (например, в **Таблице 3** и **Таблице 5**), и представленная в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте присоединена или связана с ним всей или частью константной области легкой цепи с образованием легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи относится к видам, из которых

было выделено антитело, например, константная область легкой цепи кролика. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи, которая присоединена или связана с переменной областью легкой цепи, представляет собой константную область каппа (κ) или лямбда (λ), как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи, если она присутствует, может быть любого из известных λ подтипов, например, λ_1 , λ_2 , λ_3 , или λ_4 . В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи представляет собой последовательность константной области легкой цепи лямбда. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи представляет собой последовательность константной области легкой цепи каппа. В предпочтительном варианте осуществления константная область лямбда или каппа представляет собой последовательность константной области лямбда или каппа человека.

[161] В некоторых вариантах осуществления каждая из переменных областей тяжелой цепи, содержащая HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3, описанные в данном документе (*например, Таблица 2*), или каждая из указанных переменных областей тяжелой цепи, описанных в данном документе (*например, Таблица 4 и Таблица 5*), представленная в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, присоединена или связана с ним всей или частью константной области тяжелой цепи с образованием тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления константный домен тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи грызуна, примата или другого млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи, связанная или присоединенная к переменной области тяжелой цепи, представляет собой константную область тяжелой цепи человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи человека содержит по меньшей мере один или все из следующих доменов: домен CH1 человека, шарнирный домен человека, домен CH2 человека и домен CH3 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит часть Fc, при этом часть Fc представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgM человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи человека может иметь одну или большее количество мутаций для изменения свойств константной области Fc, таких как стабильность, гликозилирование и связывание с рецептором Fc, как дополнительно обсуждается ниже. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к DDR1 может быть модифицировано для снижения по меньшей мере одной биологической эффекторной функции, опосредованной константной областью, по сравнению с немодифицированным антителом, например, для снижения связывания с одним или большим количеством рецепторами Fc (Fc γ R) такими как Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIA и/или Fc γ RIIB. Связывание Fc γ R может быть снижено посредством мутации сегмента константной области иммуноглобулина антитела в определенных областях, необходимых для взаимодействий Fc γ R (см., например, Canfield и Morrison, 1991, Med. 173:1483-1491; а также Lund et al. 1991, J. Immunol. 147:2657-2662). Снижение

способности антитела связывать Fc γ R может также снижать другие эффекторные функции, которые зависят от взаимодействий Fc γ R, такие как опсонизация, фагоцитоз и антиген-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC").

[162] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, включают антитела которые были модифицированы для приобретения или улучшения по меньшей мере одной биологической эффекторной функции, опосредованной константной областью, по сравнению с немодифицированным антителом, например, для усиления взаимодействий Fc γ R (см., например, публикация США № 2006/0134709). Например, антитело по данному изобретению может иметь константную область, которая связывает Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIA и/или Fc γ RIIB с большей аффинностью, чем соответствующая константная область дикого типа.

[163] Таким образом, антитела по данному изобретению могут иметь изменения биологической активности, которые приводят к повышенной или пониженной опсонизации, фагоцитозу или ADCC. Например, модификации антител, снижающие активность ADCC, описаны в патенте США № 5834597. Типовой вариант, снижающий ADCC, соответствует «мутанту 3» (также известному как «M3») в патенте США № 5834597, в котором остатки 234 и 237 (с применением нумерации EU) заменены аланинами. Вариант мутанта 3 (также известный как «M3») можно применять в ряде изотипов антител, например, IgG₂. Дополнительные замены, которые могут модифицировать связывание Fc γ R и/или эффекторную функцию ADCC, включают замену K322A или двойную замену L234A и L235A в области Fc (см., например, Hezareh, et al. *J. Virol.*, 2001, 75 (24): 12161-12168. В некоторых вариантах осуществления антитела по данному изобретению имеют низкие уровни фукозы или не содержат ее. Антитела, лишенные фукозы, коррелируют с повышенной активностью ADCC, особенно при низких дозах антитела (см., например, Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, 277:26733-26740; Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.*, 2003, 278:3466-73. Способы получения антител без фукозы включают выращивание крысиной миеломы YB2/0.

[164] В некоторых вариантах осуществления антитела по данному изобретению могут содержать модифицированные (или вариантные) домены CH2 или целые домены Fc, которые включают аминокислотные замены, повышающие связывание с Fc γ RIIB и/или снижающие связывание с Fc γ RIIA по сравнению со связыванием CH2 или Fc-области соответствующего антитела дикого типа. Вариант CH2 или вариант Fc доменов описаны в публикации патента США 2014/0377253, которая полностью включена в данное описание посредством ссылки. Вариант домена CH2 или вариант домена Fc обычно включает одну или большее количество замен в положении 263, положении 266, положении 273 и положении 305, при этом нумерация остатков в домене Fc соответствует индексу EU, как в Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитела к DDR1 содержат одну или большее количество замен, выбранных из: V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K и V305W, относительно домена CH2 дикого типа. В конкретных

вариантах осуществления одна или большее количество замен домена CH2 выбраны из V263L, V273E, V273F, V273M, V273S и V273Y относительно домена CH2 IgG₁ человека. Например, одной или большим количеством замен домена CH2 может быть V273E. В другом конкретном варианте осуществления антитело к DDR1 по данному изобретению содержит вариант домена CH2, содержащий аминокислотную замену V263L. Другие примеры вариантов доменов CH2 или вариантов доменов Fc, которые могут обеспечить повышенное связывание с FcγRIIB и/или пониженное связывание с FcγRIIA по сравнению со связыванием соответствующей области CH2 или Fc дикого типа, включают описанные в публикации Vonderheide, et al. Clin. Cancer Res., 19(5), 1035-1043 (2013), такие как S267E или S267E/L328F в IgG₁ человека.

[165] В некоторых вариантах осуществления антитела к DDR1 включают модификации, которые повышают или снижают их аффинность связывания с фетальным Fc-рецептором, FcRn, например, путем мутации сегмента константной области иммуноглобулина в определенных областях, участвующих во взаимодействиях FcRn (см., например, WO 2005/123780). В конкретных вариантах осуществления антитело анти-DDR1 класса IgG мутировано таким образом, что по меньшей мере один из аминокислотных остатков 250, 314 и 428 константной области тяжелой цепи замещен отдельно или в любой их комбинации, например, в положениях 250 и 428, или в положениях 250 и 314, или в положениях 314 и 428, или в положениях 250, 314 и 428, с положениями 250 и 428 в определенной комбинации. В положении 250 замещающий аминокислотный остаток может представлять собой любой аминокислотный остаток, отличный от треонина, включая, помимо прочего, аланин, цистеин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, фенилаланин, глицин, гистидин, изолейцин, лизин, лейцин, метионин, аспарагин, пролин, глутамин, аргинин, серин, валин, триптофан или тирозин. В положении 314 аминокислотный остаток может представлять собой любой аминокислотный остаток, отличный от лейцина, включая, помимо прочего, аланин, цистеин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, фенилаланин, глицин, гистидин, изолейцин, лизин, лейцин, метионин, аспарагин, пролин, глутамин, аргинин, серин, валин, триптофан или тирозин. В положении 428 замещающие аминокислотные остатки могут представлять собой любые аминокислотные остатки, отличные от метионина, включая, помимо прочего, аланин, цистеин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, фенилаланин, глицин, гистидин, изолейцин, лизин, лейцин, аспарагин, пролин, глутамин, аргинин, серин, треонин, валин, триптофан или тирозин. Типовой заменой, которая, как известно, модифицирует эффекторную функцию Fc, является замена Fc M428L, которая может встречаться в комбинации с Fc заменой T250Q. Конкретные комбинации подходящих аминокислотных замен указаны в Таблице 1 патента США № 7217797, который включен в данное описание посредством ссылки. Такие мутации повышают связывание с FcRn, что защищает антитело от расщепления и увеличивает время его полужизни.

[166] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, содержащее LC-CDR и HC-CDR,

описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, содержащее переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, описанные в данном документе. В конкретных вариантах осуществления одноцепочечное антитело содержит спаренную с клоном переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, описанные в данном документе.

[167] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, содержащий LC-CDR и HC-CDR, или переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи по данному изобретению, представляет собой диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидом фрагмент Fv (dsFv), а (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидом диатело (ds diabody), молекулу одноцепочечного антитела (scFv), димер scFv (двухвалентное диатело), мультиспецифическое антитело, однодоменное антитело (sdAb), верблюжье антитело или нанотело, доменное антитело или двухвалентное доменное антитело, как описано в данном документе.

[168] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой химерное антитело, содержащее LC-CDR и HC-CDR, или переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, описанные в данном документе, при этом константная область тяжелой цепи Fc происходит из вида, отличающегося от происхождения LC-CDR и HC-CDR, или переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит Fc-область человека.

[169] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом каркасные области переменной области легкой цепи содержат LC-CDR, а переменная область тяжелой цепи содержит HC-CDR по данному изобретению заменены каркасными последовательностями человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом каркасные области переменной области легкой цепи выбраны из SEQ ID NO: 108-128, а SEQ ID NO: 150 и 151 заменены каркасными последовательностями переменной области легкой цепи человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом каркасные области переменной области тяжелой цепи выбраны из SEQ ID NO: 129-140, а SEQ ID NO: 152 заменены каркасными последовательностями переменной области легкой цепи человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом каркасные области переменной области легкой цепи выбраны из SEQ ID NO: 108-128, а SEQ ID NO: 150 и 151 заменены каркасными последовательностями переменной области легкой цепи

человека и каркасными областями вариабельной области тяжелой цепи, выбранными из SEQ ID NO: 129-140, а SEQ ID NO: 152 заменены каркасными последовательностями вариабельной области легкой цепи человека.

С. Типовые эпитопы и конкурирующие антигенсвязывающие белки

[170] В другом аспекте данное изобретение относится к эпитопам, с которыми связываются антитела анти-DDR1. В некоторых вариантах осуществления применимы эпитопы, которые связываются с антителами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления представленный в данном документе эпитоп можно применять для выделения антител или антигенсвязывающих белков, которые связываются с DDR1. В некоторых вариантах осуществления представленный в данном документе эпитоп можно применять для получения антител или антигенсвязывающих белков, которые связываются с DDR1. В некоторых вариантах осуществления эпитоп или последовательность, содержащая эпитоп, представленный в данном документе, можно применять в качестве иммуногена для получения антител или антигенсвязывающих белков, которые связываются с DDR1. В некоторых вариантах осуществления эпитоп, описанный в данном документе, или последовательность, содержащая эпитоп, описанный в данном документе, можно применять для вмешательства в биологическую активность DDR1.

[171] В некоторых вариантах осуществления особенно полезными являются антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с любым из эпитопов. В некоторых вариантах осуществления представленный в данном документе эпитоп при связывании с антителом препятствует или ингибирует биологическую активность DDR1. В некоторых вариантах осуществления представленный в данном документе эпитоп при связывании с антителом блокирует взаимодействие между DDR1 и его партнерами по связыванию.

[172] В некоторых вариантах осуществления домен(ы)/область(и), содержащие остатки, которые находятся в контакте с антителом или скрыты под ним, могут быть идентифицированы путем мутирования определенных остатков в DDR1 и определения того, может ли антитело связываться с мутантным белком DDR1. Путем создания ряда отдельных мутаций можно идентифицировать остатки, которые играют непосредственную роль в связывании или находятся в достаточно непосредственной близости от антитела, таким образом, что мутация может повлиять на связывание между антителом и антигеном. Зная эти аминокислоты, можно установить домен(ы) или область(и) антигена, которые содержат остатки, находящиеся в контакте с антигенсвязывающим белком или покрытые антителом. Такой домен может включать связывающий эпитоп антигенсвязывающего белка.

[173] В другом аспекте данное изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, которые конкурируют с одним из приведенных в качестве примеров антител или антигенсвязывающим фрагментом, связывающимся с эпитопом, описанным в данном документе, за специфическое связывание с DDR1. Такие антигенсвязывающие белки могут также связываться с тем же самым эпитопом, что и одно из приведенных в данном

документе в качестве примера антител или антигенсвязывающий фрагменты, или перекрывающийся эпитоп. Ожидается, что антигенсвязывающие белки, которые конкурируют или связываются с одним и тем же эпитопом, что и приведенные в качестве примера антитела, будут демонстрировать сходные функциональные свойства. Примеры антител включают антитела, описанные выше, в том числе антитела с CDR переменных областей легкой и тяжелой цепей, представленные в **Таблице 1** и **Таблице 2**, соответственно, переменные области легкой и тяжелой цепи, как продемонстрировано в **Таблице 3** и **Таблице 4**, и кодирующие области легкой и тяжелой цепей, как продемонстрировано в **Таблице 8** и **Таблице 9**.

III. Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

[174] В другом аспекте данное изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим антитело, и его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с белком DDR1, как описано в данном документе; векторам, включая векторы экспрессии, содержащие полинуклеотиды; и клеткам-хозяевам, содержащим полинуклеотиды, например, для экспрессии антитела или его антигенсвязывающих фрагментов.

[175] В частности, указанные полинуклеотиды представляют собой выделенные полинуклеотиды. Полинуклеотиды могут быть функционально связаны с одной или большим количеством гетерологичных контрольных последовательностей, которые контролируют экспрессию гена, для создания рекомбинантного полинуклеотида, способного экспрессировать представляющий интерес полипептид. Экспрессионные конструкции, содержащие гетерологичный полинуклеотид, кодирующий соответствующий полипептид или белок, могут быть введены в соответствующие клетки-хозяева для экспрессии соответствующего полипептида.

[176] Как должно быть очевидно специалисту в данной области техники, знание белковой последовательности обеспечивает описание всех полинуклеотидов, способных кодировать рассматриваемую белковую последовательность, благодаря знанию всех возможных кодонов, соответствующих различным аминокислотам. Чрезвычайно большое количество нуклеиновых кислот, кодирующих вышеупомянутые полипептиды, может быть получено путем выбора комбинаций на основе возможного выбора кодонов, и все такие вариации следует считать специально описанными для любого и всех охарактеризованных в данном документе полипептидов.

[177] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует LC-CDR1, LC-CDR2 и/или LC-CDR3 переменной области легкой цепи, описанных в данном документе, включая LC-CDR, описанные в **Таблице 1**. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует вариант LC-CDR1, LC-CDR2 и/или LC-CDR3 переменной области легкой цепи, описанных в данном документе, включая LC-CDR, описанные в **Таблице 1**, при этом один или большее количество из вариантов LC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или комбинации по сравнению с исходными LC-CDR.

[178] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует HC-CDR1, HC-CDR2 и/или HC-CDR3 вариательной области тяжелой цепи, описанные в данном документе, включая HC-CDR, описанные в **Таблице 2**. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует вариант HC-CDR1, HC-CDR2 и/или HC-CDR3 вариательной области тяжелой цепи, описанных в данном документе, включая LC-CDR, описанные в **Таблице 2**, при этом один или большее количество из вариантов HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или комбинации по сравнению с исходными HC-CDR.

[179] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий LC-CDR1, LC-CDR2 и/или LC-CDR3 вариательной области легкой цепи, выбирают из полинуклеотидов, представленных в **Таблице 6**.

Таблица 6. Последовательности ДНК, кодирующие CDR вариательных областей легкой цепи антител к DDR1

Название mAb	CDR1	SEQ ID NO:	CDR2	CDR3	SEQ ID NO:
DDR1-1	CAGAACATT TACAGCAAT	153	GGTGCATCC	CAAAGTGGTTATTA TAGTAGTAGTACTG ATATTGCT	154
DDR1-3	CAGACCATT AGCAGTTGG	155	TATGCATTC	CAACAGGGTATTA GTAGTAGTAATGTT GATAATGTT	156
DDR1-5	CAGACCATT AGCAGTTGG	157	TATGCATTC	CAATGCACTTATGG TAGTGGTAGTAGT AGTAGTTATGGTTG TGCT	158
DDR1-6	CAGAGTGTT TATAGTAAC TAC	159	GAAACATC C	CAAGGCGGTTATA GTGAGATTATTGA AAATACT	160
DDR1-9	CAGAGCATT GGTAGTGTT	161	GGTGTATTT	CAATATATTCCTTA TGGTAGTAGTCCT	162
DDR1-11	CAGAGTATT GGTAGTACC TAC	163	AAGGCTTCC	CTATACGGTGGTTT TGGTAGTAGTACTG GTGATGCT	164
DDR1-12	CAGACCATT TATAGTAAT	165	CAGGCATC C	CAAAGCTATTATG GTGCTGATGATTAT ACT	166

DDR1-13	AAGAGTGTT TATAATAAC AATGCC	167	GGTGTATCC	GCAGGCGATTATA GTGATATTAGTGAT AATAAT	168
DDR1-14	CAGAGCATT AGTAGCTAC	169	GAGGCATC C	CAAAACAATAATG GTTTTAGTGGTAGT AATTTCAATAAT	170
DDR1-15	CAGACCATT TACAGCTCT	171	AAGGCTTCC	CAACAGGGTTCCA GTATTAGTAATGTT GATAAAAATGCT	172
DDR1-17	CAGAGCATT GGTAGTTAC	173	GAGGCATC C	CAAATAATAATG GTATGACTGTCAGC GATTTCAATGCT	174
DDR1-20	CAGATTATT GATCACGAC CAC	175	CGGGCATC C	CAAATAATAATG GTATGACTGTCAGC GATTTCAATGCT	176
DDR1-21	CAGAGTGTT GTTGATAAG AACTGG	177	GAAGCATC C	GCAGGCGATTTTG AGAGTGGTGTTAG TGGT	178
DDR1-22	AAGAATATT TATAATAAT AATGCC	179	GGTGCATCC	GCAGCAGATTATA GTGATATTAGTGAT AATAAT	180
DDR1-23	CAGAGTGTT TATAGTAAC AACTAC	181	GCTGCATCC	CTAGGCGGGTATA ATGATGATGCTAAT	182
DDR1-26	GAGAGTGTT TATAGTAAC AACCAC	183	GCTGCATCC	CTAGGCGGTTATA ATGATGATGCTAAT	184
DDR1-28	CAGAGTATT GATAACAAC GAC	185	AGGACATC C	CAAAGCTATTGCGT TAATACTTATGGTT ATACT	186
DDR1-29	CAGAGCATT AGTAATCAC	187	AGGGCATC C	CAAAGCTATTATAT TATTAATAGGAGT AATTATGCTAATTC T	188

DDR1-32	GAGAGCATT AATAGTTGG	189	GATGCATCC	CAAAGCTATTATAT TATTAATAGGAGT AATTATGGTAATTC T	190
DDR1-33	GAGACCATT AGTAGTAGA	191	CAGGCATC C	CAAGGCTGTTATTA TGGTGGGGGTAGT TTTTATGATTCTGC T	192
DDR1-34	GAGAATCTT TATAAGGAC AACTAC	193	GGTGCATCC	GCAGGCGGTTATG ATAGTGTTGTTGAT	194

[180] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий HC-CDR1, HC-CDR2, и/или HC-CDR3 варибельной области тяжелой цепи, выбирают из полинуклеотидов, представленных в **Таблице 7**.

Таблица 7. Последовательности ДНК, кодирующие CDR варибельных областей тяжелой цепи антител к DDR1

Название mAb	CDR1	SEQ ID NO:	CDR2	SEQ ID NO:	CDR3	SEQ ID NO:
DDR1-1	GGATTCTCC CTCAGTAG ATATGCA	195	ATTGGTAG TAGTGGTC TCACA	196	GCCAGAGGGATG TGGTACGATGAC TCCGATGATTAC GAGGACTACTTT AACTTG	197
DDR1-3	GGAATCGA CCTCAGTAG CTATGCA	198	ATTAATAT TGGTGGTG GCACA	199	GCCAGAGATGTT GATGCCATAACC CTCACATACTTT ACCTTG	200
DDR1-5	GGATTCACC CTCAGTAAT AATGCA	201	ATTTATGC TAGTGGTA GGACA	202	GCCAGAGGAGAT ACTGAGACTGAT TATGGTATTCCTT ACTTTGACTTG	203
DDR1-6	GGATTCTCC TTCAGTAGC AGTTACTAC	204	ATTTATGC TAGTAGTG GTAGCACT	205	GCAATTCTTGGT GCTGATTATAGG TTGACTCGATTG	206

					GATCTC	
DDR1-9	GGATTCTCC CTCAATCGC TACTAC	207	ATTAGTTA TGGTGATA CCACA	208	GCCAGAGCAGAT ACTGGTGATAAT GGTTATTTAGGC CTTCAGTTG	209
DDR1-11	GGATTCTCC TTCAGTAGC GGCTACTAC	210	ATTTATAC TGGTCGCA CTGATTTC ACT	211	GCGAGAGGGGAT TATTCTGGTGGT GTTGGTGGTAAT TATTGGTTGGAT CTC	212
DDR1-12	GGAATCGA CCTCAGTAA CACCTGG	213	ATTACTGA TAGTGGTA CCACA	214	GGCCGAGATCCT GGTGATATTACT AGTGGTACGAAT GATTTG	215
DDR1-13	TCTGGATTC TCCCTCAAT AACTAT	216	ATTTTTAA TAATGGTG ATATA	217	GCCAGAACTGGC TATAGGACTGGT GGCTGGTTG	218
DDR1-14	GGAATCGA CCTCAGTTA CTATGCA	219	ATTAATGG TCGTGGTG ACACA	220	GCCCGAGAAGAC AGTGCTATTCCT TTCATAGTAGGA AACTATTACGGC ATGGACCTC	221
DDR1-15	ACATTCTCC TTCAATAGC CGCTACTGG	222	ATTAATAA CGGTGAC ATTAGC	223	GCGAAAGGGGGT AATCTTGCTGGT GATTGTTATGGG TTG	224
DDR1-17	GGATTCTCC CTCAATCGC TATGCA	225	ATTGGTAG TAGTGGTA GTACA	226	GCCAGAGATTTG GACGATAGTTAT GGTTATACTTAT GCTACGGGGATG GACATTCGGTTG GATCTC	227
DDR1-20	GGATTCTCC CTCAGTGAC	228	ATTAATAG TCGTGATG	229	GCCAGAGAAGAC AGTAGTATTCCT	230

	TATGCA		ACACA		TTTATAGTAGGA AATTACTACGGC ATGGACCTC	
DDR1- 21	GGATTCTCC CTCAGTAGT TATGGA	231	ATTTATCC TAGTGGTA GTATA	232	GTCAGATATCTT ACTGGTAGCAGT GATTTGCATTTG	233
DDR1- 22	GGATTCTCC CTCAGTGAC TATGCA	234	ATCAATAA TGGTGATA TATAC	235	GCCAGACCTGGT TATAGGACTGGT ATATGGTTG	236
DDR1- 23	GGATTCTCGA CCTCAGGA GCTACTACT AC	237	ATTCATGG TGGTGAG GGTAACA CT	238	AGAGGTGGCTGG ACTAATTACTTT	239
DDR1- 26	GGATTCTCGA CCTCAGTAG CAACTACTA C	240	ATTTATAG TAGTAATA CTAGAAC A	241	AGAGGTGGCTGG ACTAATTACTTG	242
DDR1- 28	GGATTCTCC CTCAGTAGC CACGAC	243	ATTATTAG TAGTGGTA ACACA	244	GCCAGAGATGTT TATAGTGGTGCG AGTCCT	245
DDR1- 29	ACATTCTCC TTCAATAGC CGCTACTGG	246	ATTAATAA CGGTGAC ATTACC	247	GCGAAAGGGGGT AATCTTGCTGGT GATTGTTATGGG TTG	248
DDR1- 32	GGATTCTCC CTCAGTAGT TACTAC	249	ATTACTAC TGCTGGTC CACTA	250	GCCAGAGGGCAT GCTGGTAGTATT TATTATTCATACT TTGACTTG	251
DDR1- 33	GGATTCTCC CTCAGCAG CTACGAC	252	AGTTGGA ATAGTGGC TTTGTT	253	GCCAGACTTGGT GCTGATGACATC TACTATTTTAACT TG	254
DDR1- 34	GGATTCTCGA CCTCAGTAG	255	ATTTATAC TAGTAGTG	256	AGAGGAGGTTGG TGCGACTTTAAC	257

	СТАСТАСТА С		GTGCCACA		TTG	
--	----------------	--	----------	--	-----	--

[181] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует по меньшей мере 1, 2 или 3 LC-CDR в вариабельной области легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 108-128 или SEQ NOs: 150 или 151. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует по меньшей мере 1, 2 или 3 HC-CDR в вариабельной области тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 129-149 или SEQ NO: 153.

[182] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует по меньшей мере 1, 2 или 3 LC-CDR и в вариабельной области легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 108-128 или SEQ NO: 150 или 151 и, по меньшей мере, 1, 2 или 3 HC-CDR в вариабельной области тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 129-149 или SEQ NO: 153. В некоторых вариантах осуществления выбранные LC-CDR и HC-CDR представляют собой спаренные с клоном LC-CDR и HC-CDR.

[183] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере 1, 2 или 3 полинуклеотидные последовательности LC-CDR каждого mAb, представленные в **Таблице 6**.

[184] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере 1, 2 или 3 полинуклеотидные HC-CDR каждого mAb, представленные в **Таблице 7**.

[185] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере 1, 2 или 3 полинуклеотидные последовательности LC-CDR каждого mAb, представленные в **Таблице 6**, по меньшей мере 1, 2 или 3 полинуклеотидные последовательности HC-CDR каждого mAb, указанные в **Таблице 7**, при этом выбранные LC-CDR и HC-CDR представляют собой спаренные с клоном LC-CDR и HC-CDR, представленные в **Таблице 6** и **Таблице 7** соответственно.

[186] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 108-128 **Таблицы 3** и SEQ ID NO: 150 и 151 **Таблицы 5**.

[187] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 129-149 **Таблицы 4** и SEQ ID NO: 153 **Таблицы 5**.

[188] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из

SEQ ID NO: 108-128 **Таблицы 3** или SEQ ID NO: 150 и 151 **Таблицы 5**, и переменную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 129-149 **Таблицы 4** и SEQ ID NO: 153 **Таблицы 5**.

[189] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пары "переменная область легкой цепи и переменная область тяжелой цепи", выбранные из: переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108 (DDR1-1K), и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129 (DDR1-1H); переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109 (DDR1-3K) и переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130 (DDR1-3H); переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110 (DDR1-5K) и переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131 (DDR1-5H); переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111 (DDR1-6K) и переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132 (DDR1-6H); переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112 (DDR1-9K) и переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133 (DDR1-9H); переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113 (DDR1-11K) и переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134 (DDR1-11H); переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114 (DDR1-12K) и переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135 (DDR1-12H); переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115 (DDR1-13K) и переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136 (DDR1-13H); переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116 (DDR1-14K) и переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137 (DDR1-14H); переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117 (DDR1-15K) и переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138 (DDR1-15H); переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118 (DDR1-17K) и переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139 (DDR1-17H); переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119 (DDR1-20K) и переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140 (DDR1-20H); переменной области легкой цепи,

имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120 (DDR1-21K) и вариательной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141 (DDR1-21H); вариательной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121 (DDR1-22K) и вариательной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142 (DDR1-22H); вариательной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122 (DDR1-23K) и вариательной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143 (DDR1-23H); вариательной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123 (DDR1-26K) и вариательной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144 (DDR1-26H); вариательной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124 (DDR1-28K) и вариательной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145 (DDR1-28H);; вариательной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125 (DDR1-29K) и вариательной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146 (DDR1-29H); вариательной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126 (DDR1-32K) и вариательной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147 (DDR1-32H); вариательной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127 (DDR1-33K) и вариательной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148 (DDR1-33H); вариательной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128 (DDR1-34K) и вариательной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149 (DDR1-34H); вариательной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150 (DDR1-9hu_Lv), и вариательной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153 (DDR1-9hu_Hv); и

вариательной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151 (DDR1-9hu_Lc2), и вариательной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153 (DDR1-9hu_Hv).

[190] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий вариательную область легкой цепи, выбран из полинуклеотидов, представленных в **Таблице 8:**

Таблица 8. Последовательности ДНК, кодирующие вариательные области легкой цепи антител анти-DDR1

mAb Название	Полинуклеотид вариательная область легкой цепи	SEQ ID NO:
DDR1-1K	GAGCTCGTGCTGACCCAGACACCAGCCTCCGTGTCTGCAGCT	258

	<p>GTGGGAGG CACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAACATTTACAG CAATTTAG CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCCAAGCTCCTGA TCTATGGT GCATCCAATCTGGAATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGC AGTGGATC TGGGACACAGTTC ACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTGA CGATGCTG C CACTTACTACTGTCAAAGTGGTTATTATAGTAGTAGTACTG ATATTGCT TTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA</p>	
DDR1-3K	<p>GAGCTCGTGCTGACCCAGACACCAGCCTCCGTGTCTGAACCT GTGGGA GGCACAGTCACCATCAAGTGTCAGGCCAGTCAGACCATTAGC AGTTGGTT ATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCT GATCTATT ATGCATTCAATCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAG GCAGTGGA TCTGGGACAGAGTTC ACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGT GCCGATGC TGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTATTAGTAGTAGTAATGT TGATAATG TTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA</p>	259
DDR1-5K	<p>GAGCTCGTGCTGACCCAGACACCAGCCTCCGTGTCTGAACCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAAGTGTCAGGCCAGTCAGACCATTAGCAG TTGGTTAT CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGA TCTATTAT GCATTCAATCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGC AGTGGATC TGGGACAGAGTACACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTGC CGATGCTG</p>	260

	<p>CCACTTATTATTGTCAATGCACTTATGGTAGTGGTAGTAG TAGTTAT GGTTGTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGCTGGAAATCAA</p>	
DDR1-6K	<p>GAGCTCGTGATGACCCAGACACCATCTCCCGTGTCTGCAGCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAGTTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAG TAACTACT TATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCC TGATCTAC GAAACATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAA GGCAGTGG ATCGGGGACACAGTTCCTCACCATCAGCGACGTGCAGTG TGACGATG CTGCCACTTACTACTGTCAAGGCGGTTATAGTGAGATTATTG AAAATACT TTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAA</p>	261
DDR1-9K	<p>GAGCTCGTGATGACCCAGACACCGCCTCCGTGGAGGCAGCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTGGTAG TGTTTTGG CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCGTCCCAAGCTCCTGA TCTCTGGT GTATTTGATCTGGCATCTGGGGTCCCGTCGCGGTTCAAAGGC AGTGGATC TGGGACAGAGTTCCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTGC CGATGCTG CCACTTACTACTGTCAATATATTCCTTATGGTAGTAGTCCTT CGGCGGA GGGACCGAGGTGGTGGTCAA</p>	262
DDR1-11K	<p>GAGCTCGTGATGACCCAGACTGCATCCCCGTGTCTGCAGCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTGGTAG TACCTACT TATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAA ACTCC TGATCTAC</p>	263

	<p>AAGGCTTCCATTCTGGCGTCTGGGGTCCCATCGCGGTTTCAGC GGCAGTGG ATCTGGGACAGAGTACTCTCACCATCAGCGGCGTGCAGTG TGACGATG CTGCCACTTATTACTGTCTATACGGTGGTTTTGGTAGTAGTAC TGGTGAT GCTTTCGGCGGAGGGACCGTGCTGGTGGTCAAA</p>	
DDR1- 12K	<p>GAGCTCGTGCTGACCCAGACACCAGCCTCCGTGTCTGAACCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGACCATTTATAG TAATTTAG CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCGTCCCAAGCTCCTGA TCTACCAG GCATCCAAACTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGC AGTGGATC TGGGACAGAGTATACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTGC CGATGCTG CCACTTACTACTGTCAAAGCTATTATGGTGCTGATGATTATAC TTTCGGC GGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA</p>	264
DDR1- 13K	<p>GAGCTCGTGATGACCCAGACACCATCTCCCGTGTCTGCAGCT GTGGGAGG CACAGTCAGCATCAGTTGCCAGTCCAGTAAGAGTGTTTATAA TAACAATG CCTTATCCTGGTTTCAACAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGG TCCTGATC TATGGTGTATCCACTCTGGATTCTGGGGTCTCATCGCGGTTCA GCGGCAG TGGATATGGGACAGAGTTCCTCTCACCATCAGCGACGTGCA GTGTGACG ATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGCGATTATAGTGATATTA GTGATAAT AATTCGGCGGAGGGACCGAGCTGGAAATCAAA</p>	265
DDR1- 14K	<p>GAGCTCGATATGACCCAGACACCAGCCTCCGTGTCTGAACCT GTGGGAGG</p>	266

	CACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAG CTACTTAG CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCGCCTGA TCTTTGAG GCATCCACTCTGGCCTCTGGGGTCCCCTCGCGGTTTCAGCGGC AGTGGATC TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTGC CGATGCTG CCACTTACTACTGTCAAACAATAATGGTTTTAGTGGTAGTA ATTTCAAT AATTTGCGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAA	
DDR1- 15K	GAGCTCGTGATGACCCAGACACCAGCCTCTGTGGAGGTAGCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGACCATTACAG CTCTTTAG CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGA TCTACAAG GCTTCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGC AGTGGATC TGGGACACAGTTCCTCTCACCATCAGTGGCGTGCAGTGTGA CGATGCTG CCACTTACTACTGTCAACAGGGTTCAGTATTAGTAATGTTG ATAAAAAT GCTTTCGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAA	267
DDR1- 17K	GAGCTCGTGCTGACCCAGACACCAGCCTCCGTGTCTGAACCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTGGTAG TACTTAT CCTGGTATCAACAGAAAGCAGGGCAGCCTCCCAAGCGCCTG ATCTATGAG GCATCCACTCTGGCCTCTGGGGTCCCATCGCGGTTTCAGCGGC AGTGGATC TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTGC CGATGTTG CCACTTATTACTGTCAAATAATAATGGTATGACTGTCAGCG	268

	<p>ATTTCAAT GCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAAA</p>	
DDR1- 20K	<p>GAGCTCGATCTGACCCAGACACCAGCCTCCGTGTCTGCAGCT GTAGGAGG CACAGTCACCATCAATTGCCAGTCCAGTCAGATTATTGATCA CGACCACT TATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCGTCCCAAGCTCC TAATCTAC CGGGCATCCACTCTGACATCTGGGGTCCCCTCGCGGTTCAAA GGCAGTGG ATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTG TGCCGATG TTGCCACTTATTACTGTCAAATAATAATGGTATGACTGTCA GCGATTTC AATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAAA</p>	269
DDR1- 21K	<p>GAGCTCGTGCTGACCCAGACACCATCTTCCACGTCTGCAGCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAGTTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTGTTGA TAAGAACT GGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGC TCTTGATC TACGAAGCATCCAAACTGGCATCTGGGGTCCCGCCGCGGTTC AGCGGCAG TGGATCTGGGACACAGTTCCTCACCATCAGCGGCGTGCA GTGTGACG ATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGCGATTTTGAGAGTGGTG TTAGTGGT TTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAAA</p>	270
DDR1- 22K	<p>GAGCTCGTGCTGACCCAGACACCATCACCCGTGTCTGCAGCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAATTGCCAGTCCAGTAAGAATATTTATAA TAATAATG CCTTATCCTGGTTTCAACAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGC TCCTGATC TATGGTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTTC</p>	271

	AAAGGCAG TGGATCTGGGACACAGTTCCTACTCTCACCATCAGCGACGTGCA GTGTGACG ATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGCAGATTATAGTGATATTA GTGATAAT AATTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA	
DDR1- 23K	GAGCTCGTGCTGACCCAGACACCATCCTCCGTGTCTGCAGCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAGTTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAG TAACAACCT ACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGC TCCTGATC TATGCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCA AAGGCAG TGGATCTGGGACACAGTTCCTACTCTCACCATCAGCGGCGTGCA GTGTGACG ATGCTGCCGTTTACTACTGTCTAGGCGGGTATAATGATGATG CTAATTTTC GGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAAA	272
DDR1- 26K	GAGCTCGATCTGACCCAGACACCATCCTCCGTGTCTGCAGCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAGTTGCCAGTCCAGTGAGAGTGTTTATAG TAACAACC ACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGC TCCTGATC TATGCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCA GTGGCAG TGGATCTGGGACACAGTTCCTACTCTCACCATCAGCGGCGTGCA GTGTGACG ATGCTGCCGTTTACTACTGTCTAGGCGGGTATAATGATGATGC TAATTTTC GGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA	273
DDR1- 28K	GAGCTCGATCTGACCCAGACACCAGCCTCCGTGGAGGCAGCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTGATAA	274

	CAACGACT TAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAACCTCC TGATCTCC AGGACATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAA GGCAGTGG ATCTGGGACAGAGTTCCTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTG TGCCGATG CTGCCACTTACTACTGTCAAAGCTATTGCGTTAATACTTATGG TTATACT TTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA	
DDR1- 29K	GAGCTCGTGATGACCCAGACACCAGCCTCCGTGGAGGCAGCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAA TCACTTAG GCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGA TCTACAGG GCATCCACTCTGGAATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGC AGTGGATC TGGGTCAGAGTTCCTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTGC CGATGCTG CCACTTACTACTGTCAAAGCTATTATATTATTAATAGGAGTA ATTATGCT AATTCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAA	275
DDR1- 32K	GAGCTCGTGATGACCCAGACACCAGCCTCCGTGGAGGCAGCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAAGTGCCAAGCCAGTGAGAGCATTAAATAG TTGGTTAG CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCGTCCCAAGCTCCTGA TCTATGAT GCATCCAAACTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGC AGTGGATC TGGGACACAGTTCCTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTGC CGATGCTG CCACTTACTACTGTCAAAGCTATTATATTATTAATAGGAGTA ATTATGGT	276

	AATTCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAA	
DDR1- 33K	GAGCTCGTGATGACCCAGACACCAGCCTCCGTGGAGGCAGCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAGACCATTAGTAG TAGATTAG CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGA TCTACCAG GCATCCAAACTGCCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGC ACTGGATC TGGGACAGAGTACACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTGC CGATGCTG CCACTTACTACTGTCAAGGCTGTTATTATGGTGGGGGTAGTTT TTATGAT TCTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA	277
DDR1- 34K	GAGCTCGATCTGACCCAGACACCAGCCTCCGTGTCTGCAGCT GTGGGAGG CACAGTCACCATCAGTTGCCAGTCCAGTGAGAATCTTTATAA GGACAACCT ACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGC TCCTGATC TATGGTGCATCCAATCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTT AAAGGCAG TGGATCTGGGACACAGTTCCTACTCTCACCATCAGCGACCTGGA GTGTGACG ATGCTGCCACTTACTACTGCGCAGGCGGTTATGATAGTGTTG TTGATTTT GGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA	278

[191] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи, выбран из полинуклеотидов, представленных в **Таблице 9:**

Таблица 9. Последовательности ДНК, кодирующие переменные области тяжелой цепи антител анти-DDR1

mAb Название	Полинуклеотид варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:
DDR1-1H	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCT GACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGATATGCAATGA CCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAATCATT GGTAGTAGTGGTCTCACATACTTCGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTAC CATCTCCAAAACCTCGACCACGGTAGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAA CCGAGGACACGGCCACCTACTTCTGTGCCAGAGGGATGTGGTACGATGAC TCCGATGATTACGAGGACTACTTTAACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGT CACCATCTCTCA	279
DDR1-3H	CAGTCGGTGAAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCT GACACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAGCTATGCAATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAACCATT AATATTGGTGGTGGCACATGGGACGCGACCTGGGCGAGAGGCCGATTAC CATCTCCAGAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAA TCGGGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGATGTTGATGCCCATACC CTCACATACTTTACCTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTC A	280
DDR1-5H	CAGTCGGTGAAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCT GACACTCACCTGCACCGTCTCTGGATTCACCCTCAGTAATAATGCAATAA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAATCATT TATGCTAGTGGTAGGACATACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTAC	281

	CATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATGACCAGTCCGACAA CCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGGAGATACTGAGACTGAT TATGGTATTCCTTACTTTGACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCAT CTCCTCA	
DDR1-6H	CAGTCGTTGAAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCGGACACTCACCTGTATA GCCCCTG GATTCTCCTTCAGTAGCAGTTACTACA TGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATGC ATTTATGCTAGTAGTGGTAGCACTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCG ATTCACCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTACTCTGCAAATGACCA CTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGCAATTCTTGGT GCTGATTATAGGTTGACTCGATTGGATCTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGT CACCGTCTCCTCA	282
DDR1-9H	CAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCTGGTCAAGCCTGGGACACCCCT GACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCAATCGCTACTACATGC TCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGGAGGGCCTGGAATGGATCGGAACCATT AGTTATGGTGATAACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCAC CATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATGACCAGTCCGACAA CCGAGGACACGGCCACTTATTTCTGTGCCAGAGCAGATACTGGTGATAAT GGTTATTTAGGCCTTCAGTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTC TTCA	283
DDR1-11H	CAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCT GACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTAGCGGCTACTACA	284

	TGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATGC ATTTATACTGGTCGCACTGATTTCACTGATTACGCGAGCTGGGCGAAAGG CCGATTCACCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAACTGA CCACTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAGAGGGGAT TATTCTGGTGGTGTGGTGGTAATTATTGGTTGGATCTCTGGGGCCAGGG CACCTGGTCACCATCTCCTCA	
DDR1-12H	CAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCT GACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAACACCTGGATGA ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATT ACTGATAGTGGTACCACATACTACGCGAACTGGGCGAAAGGCCGATTCAC CATCTCCAGAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATGCCAGTCTGACAA CCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGGCCGAGATCCTGGTGATATTACT AGTGGTACGAATGATTTGTGGGGCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCA	285
DDR1-13H	GAGCAGTCGGTGGAGGAGTCCGGCGGTGCCTGGTCACGCCTGGAGGATC CCTGACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCAATAACTATGCAA TCATCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAATATATCGGAATT TTTAATAATGGTGATATATACTATGCGAACTGGGCGAAAGGCCGATTCAC CATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGGTCTGAAAATCGTCAGTCCGACAA CCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGAACTGGCTATAGGACTGGT GGCTGGTTGTGGGGCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCA	286
DDR1-14H	CAGTCGGTGAAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCT GACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTTACTATGCAATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGAATCATT	287

	AATGGTCGTGGTGACACAGGCTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGCTTCAC TATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAGGATCACCAGTCCGACAA TCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCCGAGAAGACAGTGCTATTCCT TTCATAGTAGGAAACTATTACGGCATGGACCTCTGGGGCCCAGGGACCCT CGTCACCGTCTCCTCA	
DDR1-15H	TCGCAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACACTCACCTGC ACAGCCTCTACATTCTCC TTCAATAGCCGCTACTGGA CATGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATCGGATGT ATTAATAACGGTGACATTAGCACTTACTACGCGAGCTGGGCGACCGGCCG ATTCACCATCTCCAAGTCCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCATATGACCA GTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAAAGGGGGTAAT CTTGCTGGTGATTGTTATGGGTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCAT CTCTTCA	288
DDR1-17H	AGTTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCGCGCCTGGGACAC CCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAATCGCTATGCA ATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAAT CATTGGTAGTAGTGGTAGTACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGAT TCACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCG ACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGATTTGGACGATAG TTATGGTTATACTTATGCTACGGGGATGGACATTCGGTTGGATCTCTGGG GCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCA	289
DDR1-20H	CAGTCGGTGAAGGAGTCCGGGGGAGGCCTCTTCAAGCCAATGGATACCCT	290

	GACACTCACCTGCACCGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTGACTATGCAATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAATCATT AATAGTCGTGATGACACAGGCTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCAC CATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGGATCTGAGGATCACCAGTCCGA CAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGAAGACAGTAGTATT CCTTTTATAGTAGGAAATTACTACGGCATGGACCTCTGGGGCCCAGGGAC CCTCGTCACCGTCTCCTCA	
DDR1-21H	CAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCT GACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTTATGGAGTGC ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGACTGGATCGGAAAGATT TATCCTAGTGGTAGTATACTACTCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCAC CATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATGACCAGTCTGACAA CCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGTCAGATATCTTACTGGTAGCAGT GATTTGCATTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCA	291
DDR1-22H	CAGTCGGTGAAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTAACGCCTGGAGGATCCCT GACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTGACTATGCAATGA TCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATATATCGGCATTATC AATAATGGTGATATACTACGCAACCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCAT CTCCGAAACCTCGTCGACCACGATGGGTCTCAATATCATCAGTCCGACGA CCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGACCTGGTTATAGGACTGGT ATATGGTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCA	292
DDR1-23H	TCGCAGTCGGTGAAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATC CCTGACACTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTGACCTCAGGAGCTACTACT	293

	ACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCA TGCATTCATGGTGGTGAGGGTAACACTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGG CCGATTCACCATCTCCAAGACCTCGTCGACCGCGGTGACTCTACAAATGA CCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAGAGGTGGC TGGACTAATACTTTTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCTTCA	
DDR1-26H	GAGCAGTCGTTGAAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATC CCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTGACCTCAGTAGCAACTACT ACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCCTGAGTGGATCGCA TGCATTTATAGTAGTAATACTAGAACATGGTACGCGCGCTGGGCGAAAGG CCGATTCACCATCTCCAAGACCTCGTCGACCGCGGTGACTCTACAAATGA CCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAGAGGTGGC TGGACTAATACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTAGTCACCATCTCCTCA	294
DDR1-28H	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTACGCCTGGGACACCCCT GACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCCACGACATGA TCTGGGTCCGCCAGGCTGCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGACTTATT ATTAGTAGTGGTAACACATGGTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCAC CATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATGACCAGTCTGACAA CCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGATGTTTATAGTGGTGCG AGTCCTTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCA	295
DDR1-29H	CAGTCGGTGAAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGAC ACTCACCTGCAAAGCCTCTACATTCTCCTTCAATAGCCGCTACTGGACAT GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATCGGATGTATT AATAACGGTGACATTACCACTTACTACACGAACTGGGCGACCGGCCGATT	296

	CACCATCTCCAAGTCCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAAATGACCAGTC TGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAAAGGGGGTAATCTT GCTGGTGATTGTTATGGGTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCA	
DDR1-32H	CAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCT GACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTTACTACATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAATGGATCGGAACCATT ACTACTGCTGGTCCACTATATTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTCAC CATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATGACCGGTCCGACAA CCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGGGCATGCTGGTAGTATT TATTATTCATACTTTGACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTC TTCA	297
DDR1-33H	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGAGGATCCCT GACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGCAGCTACGACATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAATCAGT TGGAATAGTGGCTTTGTTGACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCAG CATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAA CCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGACTTGGTGCTGATGACATC TACTATTTTAACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCA	298
DDR1-34H	CAGTCGGTGAAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGAGGGATCCCT GACACTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTTCGACCTCAGTAGCTACTACTACA TGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATGC ATTTATACTAGTAGTGGTGCCACATGGTACGCGAACTGGGCGAAAGGCCG ATTCACCATTTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAGATGACCG	299

	CTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAGAGGAGGTTGG TGCGACTTTAACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCA	
--	--	--

[192] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий переменную область гуманизированной легкой цепи и/или переменную область гуманизированной тяжелой цепи антитела DDR1-9 (DDR1-9hu), выбирают из полинуклеотидов, представленных в Таблице 10.

Таблица 10. Последовательности гуманизированных антител DDR1-9hu - нуклеиновые кислоты

mAb	Полинуклеотидная последовательность	SEQ ID NO:
DDR1-9hu_Hv	CAAGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCAGAGTGGTGCAGC CCGGCAGATCTCTGAGACTGAGCTGTACCGCCAGCGGCTTC TCTCTGAATAGATACTACATGCTGTGGGTGAGACAAGCCCC CGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCACCATCAGCTACGGC GATACCACCTACTACGCCAGCTGGGCCAAGGGAAGATTCAC CATCTCTAGAGACAACCTCCAAGAACACACTGTATCTGCAGA TGA ACTCTCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC GCCAGAGCCGATACCGGCGACAACGGCTATCTGGGACTGC AGCTGTGGGGACAAGGCACACTGGTGACCGTGAGCAGC	300
DDR1-9hu_Lv 1	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCGTGAGCGCTA GCGTGGGAGACAGAGTGACCATCACATGCCAAGCCAGCCA GAGCATTGGCAGCGTGCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCAGCGGCGTGTTTGATCTG GCCAGCGGCGTGCCCTCCAGATTTAGCGGCAGCGGCAGCGG AACCGATTTCACTGACCATCAGCTCTCTGCAGCCCGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGTACATCCCTTACGGCAGCT CCCCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG	301
DDR1-9hu_Lv 2	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCGTGAGCGCTAG CGTGGGAGACAGAGTGACCATCACATGCAGAGCCTCCCAG AGCATTGGCAGCGTGCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCG CAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGAGTGTTCTCTCTGC AGAGCGGCGTGCCCTCCAGATTTCCGGCAGCGGCTCCGGC ACAGACTTCACACTGACCATCAGCTCTCTGCAGCCCGAGGA CTTCGCCACCTACTACTGCCAGTACATCCCTTACGGCAGCTC CCCCTTTGGAGGGCGGCACCAAGTGAGATCAAG	302

[193] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет по меньшей мере около 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности на уровне нуклеотидов

последовательности эталонного полинуклеотида, выбранной из SEQ ID NO: 258-278 и SEQ ID NO: 301 и 302, и кодирует соответствующую вариабельную область легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 108-128 или SEQ ID NO: 150-151.

[194] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет по меньшей мере около 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности на уровне нуклеотидов последовательности эталонного полинуклеотида, выбранной из SEQ ID NO: 279-299 и SEQ ID NO: 300, и кодирует соответствующую вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 129-149 SEQ ID NO: 152.

[195] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет по меньшей мере около 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности на уровне нуклеотидов последовательности эталонного полинуклеотида SEQ ID NO: 262 или 276, и кодирует соответствующую вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 112 или 126.

[196] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет по меньшей мере около 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности на уровне нуклеотидов последовательности эталонного полинуклеотида SEQ ID NO: 283 или 297, и кодирует соответствующую вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 133 или 147.

[197] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет по меньшей мере около 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности на уровне нуклеотидов последовательности эталонного полинуклеотида SEQ ID NO: 301 или 302, и кодирует соответствующую вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 150 или 151.

[198] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет по меньшей мере около 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности на уровне нуклеотидов последовательности эталонного полинуклеотида SEQ ID NO: 300, и кодирует соответствующую вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 152.

[199] В дополнительных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по данному изобретению содержат полинуклеотиды, которые гибридизуются с полинуклеотидами, кодирующими описанные в данном документе антитела. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды гибридизуются с полинуклеотидом, выбранным из SEQ ID NO: 258-278 и SEQ ID NO: 301 и 302., и кодируют вариабельную область легкой цепи антитела, которое специфически связывается с белком DDR1. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды гибридизуются с полинуклеотидом, выбранным из SEQ ID NO: 279-299 и SEQ ID NO: 300, и кодируют вариабельную область тяжелой цепи антитела, которое специфически связывается с белком DDR1.

[200] Как правило, нуклеиновые кислоты гибридизуются в условиях умеренной или высокой жесткости с нуклеиновыми кислотами, которые кодируют описанные в данном

документе антитела, а также кодируют антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с белком DDR1. Молекула первой нуклеиновой кислоты «гибридуется» молекулой второй нуклеиновой кислоты, когда одноцепочечная форма молекулы первой нуклеиновой кислоты может гибридизоваться со второй молекулой нуклеиновой кислоты при соответствующих условиях температуры и ионной силы раствора (см. Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001). Условия температуры и ионной силы определяют «жесткость» гибридизации. Типовыми условиями гибридизации умеренной жесткости являются: 40% формамид, 5X или 6X SSC и 0,1% SDS при 42°C. Условиями гибридизации высокой жесткости являются: 50% формамид, 5X или 6X SSC (0,15M NaCl и 0,015M Na-цитрат) при 42°C или, необязательно, при более высокой температуре (например, 57 °C, 59 °C, 60 °C, 62 °C, 63 °C, 65 °C или 68 °C). Гибридизация требует, чтобы две нуклеиновые кислоты содержали комплементарные последовательности, хотя, в зависимости от жесткости гибридизации, возможны несоответствия между основаниями. Подходящая жесткость для гибридизации нуклеиновых кислот зависит от длины нуклеиновых кислот и степени комплементации, переменных, хорошо известных в данной области техники. Чем больше степень сходства или гомологии между двумя нуклеотидными последовательностями, тем выше жесткость, при которой нуклеиновые кислоты могут гибридизоваться. Для гибридов длиной более 100 нуклеотидов были получены уравнения для расчета температуры плавления (см. выше Sambrook et al.). Для гибридизации с более короткими нуклеиновыми кислотами, например, олигонуклеотидами, положение несовпадений становится более важным, и длина олигонуклеотида определяет его специфичность (см. выше Sambrook et al.).

[201] В некоторых вариантах осуществления, с полинуклеотидами, описанными в данном документе, можно манипулировать различными способами для обеспечения экспрессии кодируемого полипептида, например, переменная область легкой цепи или переменная область тяжелой цепи, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид функционально связан с контрольными последовательностями, включая, помимо прочего, промоторы транскрипции, лидерные последовательности, энхансеры транскрипции, сайты связывания или посадки рибосомы, последовательности терминации и последовательности полиаденилирования для экспрессии полинуклеотида и/или соответствующего полипептида. Манипуляции с выделенным полинуклеотидом перед его встраиванием в вектор могут быть желательны или необходимы в зависимости от вектора экспрессии. Методы модификации полинуклеотидов и последовательностей нуклеиновых кислот с применением методов рекомбинантной ДНК хорошо известны в данной области техники. Руководство представлено в публикации Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York (2001); и *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel. F. ed., Greene Pub. Associates (1998), обновления до 2020 года.

[202] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды могут быть частью

вектора экспрессии, при этом указанный вектор и полинуклеотид включают одну или большее количество функционально связанных контрольных последовательностей для контроля экспрессии полинуклеотида и/или экспрессии кодируемого полипептида. Рекомбинантный вектор экспрессии может быть любым вектором (например, плазмидой или вирусом), который можно легко подвергнуть процедурам рекомбинантной ДНК и который может вызвать экспрессию полинуклеотидной последовательности. Выбор вектора обычно будет зависеть от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую должен быть введен вектор. Векторы могут представлять собой линейные или замкнутые кольцевые плазмиды. Примеры векторов экспрессии включают, помимо прочего, векторы на основе промоторов T7 или T7lac (pACY: Novagen; pET); векторы на основе бакуловирусных промоторов (например, pBAC); векторы на основе промоторов Efl α и HTLV (например, pFUSE2; Invitrogen, штат Калифорния, США); векторы на основе энхансера CMV и промоторов генов легкой цепи ферритина человека (например, pFUSE: Invitrogen, штат Калифорния, США); векторы на основе промоторов CMV (например, pFLAG: Sigma, США); и векторы на основе промоторов дигидрофолатредуктазы (например, pEASE: Amgen, США). Для кратковременной или стабильной экспрессии представляющих интерес полипептидов можно применять различные векторы.

[203] В другом аспекте полинуклеотид, кодирующий полипептид, функционально связан с одной или большим количеством контрольных последовательностей для экспрессии полипептида в клетке-хозяине. Клетки-хозяева для экспрессии полипептидов хорошо известны в данной области техники и включают, помимо прочего, бактериальные клетки, такие как *E. coli*, дрожжевые клетки; клетки насекомых, такие как клетки *Drosophila* S2 и *Spodoptera* Sf9; клетки животных, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), почки африканской зеленой обезьяны (COS), почки детеныша хомячка (ВНК), мышью миеломы (например, NS0 и Sp2/0) и почки эмбриона человека (HEK); а также растительные клетки. Пригодные культуральные среды и условия роста для вышеописанных клеток-хозяев хорошо известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева и векторы экспрессии применяются для экспрессии представляющих интерес полипептидов.

[204] В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, содержащие векторы экспрессии и полинуклеотиды, описанные в данном документе, культивируют в пригодной среде и в условиях культивирования, пригодных для экспрессии кодируемого полипептида, например, полипептидов, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 108-128; SEQ ID NO: 150 и 151; SEQ ID NO: 129-149; и SEQ ID NO: 152. В некоторых вариантах осуществления система экспрессии *in vitro* может применяться с векторами экспрессии для экспрессии полипептида. Системы экспрессии *in vitro* включают те, которые основаны на *E. coli*., ретикулоцитах кролика, зародышах пшеницы, клетках насекомых и клетках человека. Независимо от того, экспрессируются ли они в клетке-хозяине или *in vitro*, экспрессированные полипептиды могут быть выделены или очищены, как дополнительно описано в данном документе.

IV. Способы получения антител и их модификации.

[205] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе моноклональные антитела могут быть получены с применением стандартных способов с последующим скринингом, характеристикой и функциональной оценкой. Например, переменные области могут быть секвенированы, а затем субклонированы в вектор экспрессии человека для получения генов химерных антител, которые затем экспрессируются и очищаются. Эти химерные антитела можно тестировать на связывание антигена, блокирование передачи сигналов и в экспериментах с ксенотрансплантатами.

A. Общие способы

[206] Следует понимать, что моноклональные антитела, связывающиеся с DDR1, будут иметь несколько применений. К ним относится производство диагностических наборов для выявления и диагностики рака, а также для лечения рака. В этих контекстах такие антитела можно связать с диагностическими или терапевтическими агентами, применять их в качестве агентов захвата или конкурентов в конкурентных анализах или применять их по отдельности без присоединения к ним дополнительных агентов. Антитела могут быть мутированы или модифицированы, как дополнительно обсуждается ниже. Способы получения и характеристики антител хорошо известны в данной области техники (см., например, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; патент США 4196,65).

[207] Способы получения моноклональных антител (MAb) обычно начинаются с тех же принципов, что и способы получения поликлональных антител. Первым этапом для этих обоих способов является иммунизация соответствующего хозяина. Как хорошо известно в данной области техники, данная композиция для иммунизации может различаться по своей иммуногенности. Поэтому часто необходимо стимулировать иммунную систему хозяина, что может быть достигнуто путем связывания пептидного или полипептидного иммуногена с носителем. Типовыми и предпочтительными носителями являются гемацианин лимфы улитки (KLH) и бычий сывороточный альбумин (BSA). Другие альбумины, такие как яичный альбумин, сывороточный альбумин мыши или сывороточный альбумин кролика, также могут быть применены в качестве носителей. Средства для конъюгации полипептида с белком-носителем хорошо известны в данной области техники и включают глутаровый альдегид, сложный эфир м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид, карбодиимид и бис-биазотированный бензидин. Как также хорошо известно в данной области техники, иммуногенность конкретной иммуногенной композиции может быть усилена путем применения неспецифических стимуляторов иммунного ответа, известных как адъюванты. Примеры и предпочтительные адъюванты включают полный адъювант Фрейнда (неспецифический стимулятор иммунного ответа, содержащий убитые микобактерии туберкулеза), неполные адъюванты Фрейнда и адъювант гидроксида алюминия.

[208] Количество иммуногенной композиции, применяемой для получения поликлональных антител, зависит от природы иммуногена, а также от животного, используемого для иммунизации. Для введения иммуногена можно применять различные

пути (подкожно, внутримышечно, внутрикожно, внутривенно и внутрибрюшинно). Производство поликлональных антител можно контролировать путем отбора образцов крови иммунизированного животного в различные моменты времени после иммунизации. Также может быть назначена вторая, бустерная инъекция. Процесс бустинга и титрования повторяют до тех пор, пока не будет достигнут подходящий титр. Когда достигается желаемый уровень иммуногенности, у иммунизированного животного можно брать кровь, выделять и хранить сыворотку, и/или животное можно использовать для получения МАб.

[209] После иммунизации соматические клетки, способные продуцировать антитела, в частности В-лимфоциты (В-клетки), отбирают для применения в протоколе получения МАб. Эти клетки могут быть получены при биопсии селезенки или лимфатических узлов или из циркулирующей крови. Продуцирующие антитела В-лимфоциты иммунизированного животного затем сливают с клетками бессмертной миеломной клетки, как правило, того же вида, что и иммунизированное животное, или с химерными клетками человека или человека/мыши. Клеточные линии миеломы, пригодные для применения в процедурах слияния, продуцирующих гибридомы, предпочтительно не продуцируют антитела, обладают высокой эффективностью слияния и дефицитом ферментов, что делает их неспособными к росту в определенных селективных средах, которые поддерживают рост только желаемых слитых клеток (гибридомы). Можно применять любые клетки миеломы, известные специалистам в данной области техники (Goding, стр. 65-66, 1986; Campbell, стр. 75-83, 1984). Способы создания гибридов клеток селезенки или лимфатических узлов, продуцирующих антитела, и клеток миеломы обычно включают смешивание соматических клеток с клетками миеломы в соотношении 2:1, хотя соотношение может варьироваться от около 20:1 до около 1:1 соответственно, в присутствии агента или агентов (химических или электрических), которые способствуют слиянию клеточных мембран. Способы слияния с применением вируса Sendai были описаны Kohler и Milstein (1975; 1976), а способы с применением полиэтиленгликоля (PEG), такого как 37% (об./об.) PEG, описаны Gefter et al. (1977). Применение способов электрически индуцированного синтеза также является целесообразным (Goding, стр. 71-74, 1986). Процедуры слияния обычно обеспечивают жизнеспособные гибриды при низких частотах, от около 1×10^{-6} до 1×10^{-8} . Однако это не представляет проблемы, поскольку жизнеспособные слитые гибриды дифференцируются от родительских слитых клеток (в частности, слитых клеток миеломы, которые в норме продолжают делиться бесконечно) путем культивирования в селективной среде. Селективная среда обычно представляет собой среду, содержащую агент, который блокирует синтез нуклеотидов *de novo* в культуральной среде ткани. Типовыми и предпочтительными агентами являются аминоптерин, метотрексат и азасерин. Аминоптерин и метотрексат блокируют синтез *de novo* как пуринов, так и пиримидинов, тогда как азасерин блокирует только синтез пуринов. При применении аминоптерина или метотрексата в среду добавляют гипоксантин и тимидин в качестве источника нуклеотидов (среда HAT). При применении азасерина среду дополняют гипоксантином. Убаин добавляют, если источником В-клеток является линия В-клеток человека,

трансформированная вирусом Эпштейна-Барр (EBV), для устранения линий, трансформированных EBV, которые не слились с миеломой.

[210] В некоторых вариантах осуществления предпочтительной средой для селекции является НАТ или НАТ с убаином. Только клетки, способные использовать пути спасения нуклеотидов, способны выжить в среде НАТ. Клетки миеломы являются дефектными по ключевым ферментам пути спасения, например, по гипоксантинфосфорибозилтрансферазе (HPRТ), и не могут выжить. В-клетки могут функционировать по этому пути, но они имеют ограниченный срок жизни в культуре и обычно погибают в течение около двух недель. Таким образом, единственными клетками, которые могут выжить в селективной среде, являются гибриды, образованные из миеломных и В-клеток. Когда источником В-клеток, применяемых для слияния, является линия В-клеток, трансформированных EBV, как описано в данном документе, убаин также применяется для лекарственной селекции гибридов, поскольку В-клетки, трансформированные EBV, восприимчивы к уничтожению лекарственными средствами, тогда как применяемый партнер миеломы выбирают так, чтобы он был устойчивым к убаинам.

[211] Культивирование обеспечивает популяцию гибридом, из которых отбирают специфические гибридомы. Как правило, отбор гибридом осуществляют путем культивирования клеток путем разведения отдельных клонов в титрационных микропланшетах с последующим тестированием супернатантов отдельных клонов (примерно через две-три недели) на желаемую реактивность. Анализ должен быть чувствительным, простым и быстрым, таким как радиоиммуноанализ, иммуоферментный анализ, анализ цитотоксичности, анализ бляшек, анализ дот-иммуносвязывания и т.п. Отобранные гибридомы затем серийно разбавляют или сортируют отдельные клетки с помощью проточной цитометрии и клонируют в отдельные клеточные линии, продуцирующие антитела, причем эти клоны затем можно размножить до бесконечности для получения mAb. Линии клеток можно использовать для продукции МАb двумя основными способами. Образец гибридомы можно инъецировать (часто в брюшную полость) животному (например, мышам). Необязательно, перед инъекцией животным проводят прайм-обработку углеродом, особенно маслами, такими как пристан (тетраметилпентадекан). Когда гибридомы человека применяются таким образом, оптимально делать инъекции мышам с ослабленным иммунитетом, таким как мыши SCID, для предотвращения отторжения опухоли. У инъецированного животного развиваются опухоли, секретирующие специфические моноклональные антитела, продуцируемые гибридом слитых клеток. Жидкости организма животного, такие как сыворотка или асцитная жидкость, затем могут быть отобраны для получения МАb в высокой концентрации. Отдельные клеточные линии можно также культивировать *in vitro*, при этом МАb естественным образом секретируются в культуральную среду, из которой их можно легко получить в высоких концентрациях. В альтернативном варианте, линии клеток гибридомы человека можно применять *in vitro* для получения иммуноглобулинов в клеточном супернатанте. Клеточные линии могут быть адаптированы для роста в

бессывороточной среде для оптимизации способности выделять человеческие моноклональные иммуноглобулины высокой чистоты.

[212] МАб, полученные любым способом, могут быть дополнительно очищены, при желании, с применением фильтрации, центрифугирования и различных хроматографических методов, таких как FPLC или аффинная хроматография. Фрагменты моноклональных антител по данному изобретению могут быть получены из очищенных моноклональных антител способами, включающими расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или расщепление дисульфидных связей путем химического восстановления. В альтернативном варианте, фрагменты моноклональных антител, охватываемые данным описанием, могут быть синтезированы с применением автоматического синтезатора пептидов.

[213] Также предполагается, что для получения моноклональных соединений может быть применен подход молекулярного клонирования. Для этого из гибридной линии и генов антител, полученных с помощью RT-PCR, можно выделить РНК и клонировать в вектор экспрессии иммуноглобулина. В альтернативном варианте, комбинаторные библиотеки иммуноглобулиновых фагмид готовят из РНК, выделенной из клеточных линий, и фагмиды, экспрессирующие соответствующие антитела, отбирают путем пэннинга с применением вирусных антигенов. Преимущества этого подхода по сравнению с обычными гибридными способами заключаются в том, что за один цикл можно получить и скринировать примерно в 10⁴ раз больше антител, а также в том, что новые специфичности генерируются комбинацией Н и L цепей, что еще больше увеличивает вероятность обнаружения подходящих антител.

[214] Другие патенты США, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки, описывающие получение антител, применимых в данном изобретении, включают патент США 5565332, который описывает получение химерных антител с помощью комбинаторного подхода; патент США 4816567, в котором описаны препараты рекомбинантного иммуноглобулина; и патент США 4867973, в котором описаны конъюгаты антитело-терапевтическое средство.

В. Конструирование последовательностей антител

[215] В различных вариантах осуществления данного изобретения последовательности идентифицированных антител можно выбирать по целому ряду факторов, таких как улучшенная экспрессия, улучшенная перекрестная реактивность или уменьшенное нецелевое связывание. Ниже приводится общее обсуждение соответствующих методов конструирования антител.

[216] Гибридомы можно культивировать, затем лизировать клетки и экстрагировать общую РНК. Случайные гексамеры можно применять с RT для создания копий кДНК РНК, а затем проводить PCR с использованием мультиплексной смеси праймеров для PCR, которые, как ожидается, будут амплифицировать все последовательности переменных генов человека. Продукт PCR можно клонировать в вектор pGEM-T Easy, а затем секвенировать с помощью автоматического секвенирования ДНК с применением

стандартных векторных праймеров. Анализ связывания и нейтрализации можно проводить с применением антител, собранных из супернатантов гибридомы и очищенных с помощью FPLC с применением колонок с белком G. Рекомбинантные полноразмерные антитела IgG могут быть получены путем субклонирования Fv-ДНК тяжелой и легкой цепей из клонирующего вектора в плазмидный вектор IgG, трансфицированный в клетки 293 Freestyle или клетки CHO, и антитела, собранные из супернатанта клеток 293 или CHO.

[217] Быстрая доступность антител, полученных в той же клетке-хозяине и в том же процессе культивирования клетки, что и конечный процесс производства cGMP, может сократить продолжительность программ разработки процессов. Компания Lonza разработала генерический способ с применением объединенных трансфектантов, выращенных в среде CDACF, для быстрого получения малых количеств (до 50 г) антител в клетках CHO. Хотя это немного медленнее, чем истинная переходная система, преимущества включают более высокую концентрацию продукта и применение того же хозяина и процесса, что и линия продуцирования клеток. Пример роста и продуктивности пулов GS-CHO, экспрессирующих модельное антитело, в биореакторе одноразового применения: в биореакторе с одноразовым мешком (рабочий объем 5 л), работающем в периодическом режиме с подпиткой, концентрация собранных антител 2 г/л была достигнута в течение 9 недель после трансфекции.

[218] Молекулы антител могут содержать фрагменты (такие как F(ab'), F(ab')₂), которые продуцируются, например, протеолитическим расщеплением mAb, или одноцепочечные иммуноглобулины, продуцируемые, например, рекомбинантными способами. Такие производные антител являются моновалентными. В одном варианте осуществления такие фрагменты можно комбинировать друг с другом или с другими фрагментами антител или лигандами рецепторов с образованием «химерных» связывающих молекул. Важно отметить, что такие химерные молекулы могут содержать заместители, способные связываться с разными эпитопами одной и той же молекулы.

1. Модификации связывания антигена

[219] В родственных вариантах осуществления данного изобретения антитело представляет собой производное описанных антител, например, антитело, содержащее последовательности CDR, идентичные последовательностям описанных антител (например, химерное антитело или антитело с привитым CDR). В альтернативном варианте может потребоваться модификация, например, введение консервативных изменений в молекулу антитела. При проведении таких изменений можно учитывать индекс гидропатичности аминокислот. Важность индекса гидропатической аминокислот в придании белку интерактивной биологической функции общеизвестна в данной области техники (Kyte и Doolittle, 1982). Принято считать, что относительная гидропатичность аминокислоты способствует формированию вторичной структуры образуемого белка, что, в свою очередь, определяет взаимодействие белка с другими молекулами, например, ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антителами, антигенами, и тому подобное.

[220] Также в данной области техники известно, что замену подобных аминокислот

можно эффективно проводить на основании гидрофильности. В патенте США 4554101, включенном в данный документ посредством ссылки, утверждается, что наибольшая локальная средняя гидрофильность белка, определяемая гидрофильностью соседних аминокислот, коррелирует с биологическим свойством белка. Как подробно описано в патенте США 4554101, аминокислотным остаткам были присвоены следующие значения гидрофильности: основные аминокислоты: аргинин (+3,0), лизин (+3,0) и гистидин (-0,5); кислые аминокислоты: аспартат (+3,0 ± 1), глутамат (+3,0 ± 1), аспарагин (+0,2), глутамин (+0,2); гидрофильные, неионогенные аминокислоты: серин (+0,3), аспарагин (+0,2), глутамин (+0,2), треонин (-0,4), серосодержащие аминокислоты: цистеин (-1,0) и метионин (-1,3); гидрофобные, неароматические аминокислоты: валин (-1,5), лейцин (-1,8), изолейцин (-1,8), пролин (-0,5 ± 1), аланин (-0,5), глицин (0); гидрофобные, ароматические аминокислоты: триптофан (-3,4), фенилаланин (-2,5) и тирозин (-2,3).

[221] Следует понимать, что одну аминокислоту можно заменить другой, обладающей аналогичной гидрофильностью, и продуцировать биологически или иммунологически модифицированный белок. При таких изменениях предпочтительной является замена аминокислот, чьи значения гидрофильности находятся в пределах ± 2, особенно предпочтительно в пределах ± 1 и даже более предпочтительно в пределах ± 0,5.

[222] Как указано выше, аминокислотные замены обычно основаны на относительном сходстве заместителей боковой цепи аминокислоты, например, на их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и т.п. Примеры замен, учитывающих различные вышеуказанные характеристики, хорошо известны специалистам в данной области техники и включают: аргинин и лизин; глутамат и аспартат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; а также валин, лейцин и изолейцин.

[223] Данное изобретение также предусматривает модификацию изотипа. Путем модификации Fc-области для получения другого изотипа можно достичь различных функциональных возможностей. Например, переход на IgG1 может повысить антителозависимую клеточную цитотоксичность, переход на класс А может улучшить распределение в тканях, а переход на класс М может оптимизировать валентность.

[224] Модифицированные антитела могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области техники, включая экспрессию стандартными способами молекулярной биологии или химический синтез полипептидов. Способы рекомбинантной экспрессии рассматриваются в другом месте этого документа.

2. Модификации Fc области

[225] Как обсуждалось выше, описанные в данном документе антитела также могут быть сконструированы таким образом, чтобы они включали модификации в Fc-области, как правило, для изменения одного или большего количества функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или эффекторной функции (например, антигензависимая клеточная цитотоксичность). Кроме того, описанные в данном документе антитела могут быть химически модифицированы (например, к антителу может быть присоединена одна или

большее количество химических частей) или антитела могут быть модифицированы для изменения гликозилирования, опять же для изменения одного или большего количества функциональных свойств антитела. Каждый из предложенных вариантов осуществления более подробно описан ниже. Нумерация остатков в Fc-области соответствует EU индексу по Kabat. Описанные в данном документе антитела также включают антитела с модифицированными (или заблокированными) Fc-областями для обеспечения измененных эффекторных функций. См., например, патент США 5 624 821; WO 2003/086310; WO 2005/120571; WO 2006/0057702. Такая модификация может быть применена для усиления или подавления различных реакций иммунной системы с возможными благоприятными эффектами для диагностики и терапии. Изменения Fc-области включают замены аминокислот (замены, делеции и вставки), гликозилирование или дегликозилирование и добавление множества Fc. Изменения в Fc-области также могут изменить период полужизни антител в терапевтических антителах, что позволит реже вводить дозы и, таким образом, повысить удобство и сократить применение материала. Сообщалось, что эта мутация устраняет гетерогенность дисульфидных мостиков между тяжелыми цепями в шарнирной области.

[226] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область СН1 модифицирована таким образом, что количество цистеиновых остатков в шарнирной области увеличивается или уменьшается. Типовой подход подробно описан в патенте США 5 677 425. Количество остатков цистеина в шарнирной области СН1 изменяют, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для повышения или уменьшения стабильности антитела. В другом варианте осуществления антитело модифицируют для увеличения его биологического периода полужизни. Возможны различные подходы. Например, может быть введена одна или большее количество из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США 6277375. В альтернативном варианте, для увеличения биологического периода полужизни антитело может быть изменено в области СН1 или СL, чтобы содержать эпитоп, связывающий рецептор спасения, взятый из двух петель домена СН2 Fc-области IgG, как описано в патентах США 5 869 046 и 6 121 022. В других вариантах осуществления Fc-область изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторной функции (функций) антител. Например, одна или большее количество аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, могут быть заменены другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело будет иметь измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность в отношении которого изменяется, может быть, например, Fc-рецептором или компонентом комплемента С1. Этот подход более подробно описан в патентах США 5 624 821 и 5 648 260.

[227] В другом примере один или большее количество аминокислотных остатков в аминокислотных положениях 231 и 239 изменяются, тем самым изменяя способность

антитела фиксировать комплемент. Этот подход дополнительно описан в РСТ публикации WO 94/29351. В еще одном примере Fc-область модифицируют для увеличения или уменьшения способности антител опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для увеличения или уменьшения аффинности антител к рецептору Fc γ путем модификации одной или большего количества аминокислот в следующих положениях: 238, 239, 243, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Этот подход дополнительно описан в РСТ публикации WO 00/42072. Кроме того, были картированы сайты связывания Fc γ R1, Fc γ RII, Fc γ RIII и FcRn на IgG1 человека и описаны варианты с улучшенным связыванием. Было продемонстрировано, что специфические мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с Fc γ RIII. Кроме того, было продемонстрировано, что следующие комбинированные мутанты улучшают связывание Fc γ RIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A.

[228] В одном варианте осуществления Fc-область модифицирована для снижения способности антител опосредовать эффекторную функцию и/или для усиления противовоспалительных свойств путем модификации остатков 243 и 264. В одном варианте осуществления Fc-область антитела модифицируют путем замены остатков в положениях 243 и 264 на аланин. В одном варианте осуществления Fc-область модифицирована для снижения способности антитела опосредовать эффекторную функцию и/или для усиления противовоспалительных свойств путем модификации остатков 243, 264, 267 и 328. В еще одном варианте осуществления антитело имеет определенный тип гликозилирования. Например, может быть получено агликозилированное антитело (т.е. антитело без гликозилирования). Профиль гликозилирования антитела может быть изменен, например, для увеличения аффинности или авидности антитела к антигену. Такие модификации могут быть выполнены, например, путем изменения одного или большего количества сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно произвести одну или большее количество аминокислотных замен, которые приводят к удалению одного или большего количества сайтов гликозилирования каркаса варибельной области, тем самым устраняя гликозилирование в этом сайте. Такое агликозилирование может повысить аффинность или авидность антитела к антигену. См., например, патенты США 5714350 и 6350861.

[229] Также может быть получено антитело, в котором характер гликозилирования включает гипофукозилированные или афукозилированные гликаны, такие как гипофукозилированные антитела или афукозилированные антитела, имеющие уменьшенное количество фукозильных остатков на гликане. Антитела могут также включать гликаны, имеющие повышенное количество разделяющих пополам структур GlcNac. Было продемонстрировано, что такие измененные модели гликозилирования повышают способность антител к ADCC. Указанные модификации могут быть выполнены,

например, путем экспрессии антител в клетке-хозяине, в которой путь гликозилирования был генетически сконструирован для получения гликопротеинов с определенными профилями гликозилирования. Указанные клетки, описанные в данной области техники, могут быть применены в качестве клеток-хозяев, в которых можно экспрессировать рекомбинантные антитела по данному изобретению, чтобы таким образом получить антитело с измененным гликозилированием. Например, в клеточных линиях Ms704, Ms705 и Ms709 отсутствует ген фукозилтрансферазы, FUT8 (α (1,6)-фукозилтрансфераза), таким образом что антитела, экспрессируемые в клеточных линиях Ms704, Ms705 и Ms709, не содержат фукозы на своих углеводах. Клеточные линии Ms704, Ms705 и Ms709 FUT8-/- были созданы путем целенаправленного разрушения гена FUT8 в клетках CHO/DG44 с применением двух замещающих векторов (см. публикацию патента США № 20040110704. В качестве другого примера в EP 1176195 описана клеточная линия с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, таким образом, что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, проявляют гипофукозилирование за счет снижения или устранения фермента, связанного с α -1,6-связью. В EP 1 176 195 также описанные клеточные линии с низкой ферментативной активностью для добавления фукозы к N-ацетилглюкозамину, который связывается с Fc-областью антитела или не обладает ферментативной активностью, например клеточная линия миеломы крысы YB2/0 (CRL 1662 ATCC). В публикации PCT WO 03/035835 описан вариант линии клеток CHO, клеток Lec13, со сниженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине. Антитела с модифицированным профилем гликозилирования также могут быть получены в куриных яйцах, как описано в публикации PCT WO 06/089231. В альтернативном варианте, антитела с модифицированным профилем гликозилирования могут быть получены в растительных клетках, таких как *Lemna* (патент США 7 632 983). Способы получения антител в растительной системе описанные в патентах США 6 998 267 и 7 388 081. В публикации PCT WO 99/54342 описаны клеточные линии, сконструированные для экспрессии модифицирующих гликопротеин гликозилтрансфераз (например, β (1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), таким образом, что антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, проявляют повышенное количество расщепляющихся пополам структур GlcNac, которые приводят к увеличению ADCC-активности антител.

[230] В альтернативном варианте, остатки фукозы антител можно отщепить с помощью фермента фукозидазы; например, фукозидаза α -L-фукозидаза удаляет фукозильные остатки из антител. Антитела, описанные в данном документе, дополнительно включают антитела, продуцируемые в клетках-хозяевах низших эукариот, в частности в клетках-хозяевах грибов, таких как дрожжи и мицелиальные грибы, которые были генетически сконструированы для продукции гликопротеинов, которые имеют профили гликозилирования, подобные млекопитающим или человеку. Особым преимуществом указанных, генетически модифицированных клеток-хозяев, по сравнению с применяемыми

в настоящее время клеточными линиями млекопитающих, является способность контролировать профиль гликозилирования гликопротеинов, которые продуцируются в клетках, таким образом, что могут быть получены композиции гликопротеинов, в которых преобладает конкретная структура N-гликанов (см. например, патенты США 7 029 872 и 7 449 308). Указанные генетически модифицированные клетки-хозяева применялись для получения антител, которые имеют преимущественно определенные структуры N-гликанов.

[231] Кроме того, поскольку грибы, такие как дрожжи или мицелиальные грибы, не обладают способностью продуцировать фукозилированные гликопротеины, в антителах, продуцируемых такими клетками, будет отсутствовать фукоза, если только клетки не будут дополнительно модифицированы для включения ферментативного пути образования фукозилированных гликопротеинов (см., например, публикацию РСТ WO 2008112092). В конкретных вариантах осуществления изобретения антитела, описанные в данном документе, дополнительно включают антитела, продуцируемые в низших эукариотических клетках-хозяевах и содержащие фукозилированные и нефукозилированные гибридные и сложные N-гликаны, в том числе бисекционные и многоантенные виды, включая, помимо прочего, N-гликаны, такие как $\text{GlcNAc}(1-4)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{Gal}(1-4)\text{GlcNAc}(1-4)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{NANA}(1-4)\text{Gal}(1-4)\text{GlcNAc}(1-4)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. В конкретных вариантах осуществления композиции антител, представленные в данном документе, могут содержать антитела, содержащие по меньшей мере один гибридный N-гликан, выбранный из группы, состоящей из $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$; $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$; и $\text{NANAGalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$. В конкретных аспектах гибридный N-гликан является преобладающим видом N-гликана в композиции. В дополнительных аспектах гибридный N-гликан представляет собой конкретный вид N-гликана, который включает около 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% гибридных N-гликанов в композиции.

[232] В конкретных вариантах осуществления композиции антител, представленные в данном документе, содержат антитела, содержащие по меньшей мере один сложный N-гликан, выбранный из группы, состоящей из: $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{NANAGalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; и $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. В конкретных аспектах сложный N-гликан является преобладающим видом N-гликана в композиции. В дополнительных аспектах сложный N-гликан представляет собой конкретный вид N-гликана, который включает около 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% сложных N-гликанов в композиции. В конкретных вариантах осуществления N-гликан является фукозилированным. В общем, фукоза связана $\alpha 1,3$ -связью с GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана, $\alpha 1,6$ -связью с GlcNAc на восстанавливающем конце N-гликана, $\alpha 1,2$ -связью с Gal на невосстанавливающем конце N-гликана, $\alpha 1,3$ -связью с GlcNAc на невосстанавливающем конце N-гликана или $\alpha 1,4$ -связью с GlcNAc на

невосстанавливаемом конце N-гликана.

[233] Следовательно, в конкретных аспектах вышеуказанных гликопротеиновых композиций, гликоформ представляет собой фукозу с α 1,3-связью или α 1,6-связью для получения гликоформы, выбранной из группы, состоящей из: Man5GlcNAc2(Fuc), GlcNAcMan5GlcNAc2(Fuc), Man3GlcNAc2. (Fuc), GlcNAcMan3GlcNAc2(Fuc), GlcNAc2Man3GlcNAc2(Fuc), GalGlcNAc2Man3GlcNAc2(Fuc), Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2(Fuc), NANAGal2GlcNAc2Man3GlcNAc2(Fuc) и NANA2Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2(Fuc); фукозу с α 1,3-связью или α 1,4-связью для получения гликоформы, выбранной из группы, состоящей из: GlcNAc(Fuc)Man5GlcNAc2, GlcNAc(Fuc)Man3GlcNAc2, GlcNAc2(Fuc1-2)Man3GlcNAc2, GalGlcNAc2(Fuc1-2)Man3GlcNAc2, Gal2GlcNAc2(Fuc1-2)Man3GlcNAc2, NANAGal2GlcNAc2(Fuc1-2)Man3GlcNAc2 и NANA2Gal2GlcNAc2(Fuc1-2)Man3GlcNAc2; или фукозу с α 1,2-связью для получения гликоформы, выбранной из группы, состоящей из: Gal(Fuc)GlcNAc2Man3GlcNAc2, Gal2(Fuc1-2)GlcNAc2Man3GlcNAc2, NANAGal2(Fuc1-2)GlcNAc2Man3GlcNAc2 и NANA2Gal2(Fuc1-2)GlcNAc2Man3GlcNAc2.

[234] В дополнительных аспектах антитела содержат N-гликаны с высоким содержанием маннозы, включая, помимо прочего, Man8GlcNAc2, Man7GlcNAc2, Man6GlcNAc2, Man5GlcNAc2, Man4GlcNAc2 или N-гликаны, которые состоят из N-гликановой структуры Man3GlcNAc2. В дополнительных аспектах вышеизложенного комплексные N-гликаны дополнительно включают фукозилированные и нефукозилированные бисекционные и мультиантенные виды. В контексте данного документа, термины «N-гликан» и «гликоформа» применяются взаимозаменяемо и относятся к N-связанному олигосахариду, например, к тому, который присоединен связью аспарагин-N-ацетилглюкозамин к аспарагиновому остатку полипептида. N-связанные гликопротеины содержат остаток N-ацетилглюкозамина, связанный с амидным азотом остатка аспарагина в белке.

С. Одноцепочечные антитела

[235] Одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) представляет собой слияние переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов, связанных между собой коротким (обычно сериновым, глициновым) линкером. Эта химерная молекула сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкерного пептида. Указанная модификация обычно оставляет специфичность неизменной. Эти молекулы исторически были созданы для облегчения фагового дисплея, в котором очень удобно экспрессировать антигенсвязывающий домен в виде одного пептида. В альтернативном варианте, scFv можно создать непосредственно из субклонированных тяжелых и легких цепей, полученных из гибридомы. У одноцепочечных переменных фрагментов отсутствует константная Fc-область, присутствующая в полных молекулах антител, и, следовательно, общие сайты связывания (например, белок A/G), применяемые для очистки антител. Указанные фрагменты часто можно очистить/иммобилизовать с применением белка L, поскольку белок L взаимодействует с

вариабельной областью легких каппа-цепей.

[236] Гибкие линкеры обычно состоят из аминокислотных остатков, стимулирующих спираль и поворот, таких как алаин, серин и глицин. Однако могут функционировать и другие остатки. Tang *et al.* (1996) применяли фаговый дисплей как средство быстрого выбора адаптированных линкеров для одноцепочечных антител (scFv) из библиотек белковых линкеров. Была сконструирована библиотека случайных линкеров, в которой гены вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей были связаны сегментом, кодирующим 18-аминокислотный полипептид переменного состава. Репертуар scFv (примерно 5×10^6 различных представителей) был представлен на нитевидном фаге и подвергнут аффинной селекции с гаптенем. Популяция выбранных вариантов продемонстрировала значительное увеличение связывающей активности, но сохранила значительное разнообразие последовательностей. В результате скрининга 1054 индивидуальных вариантов впоследствии получили каталитически активный scFv, который эффективно производился в растворимой форме. Анализ последовательности выявил консервативный пролин в линкере через два остатка после V_H на С-конце и обилие аргининов и пролинов в других положениях как единственные общие характеристики выбранных цепей.

[237] Рекомбинантные антитела по данному изобретению могут также включать последовательности или фрагменты, обеспечивающие димеризацию или мультимеризацию рецепторов. Такие последовательности включают последовательности, полученные из IgA, которые обеспечивают образование мультимеров в сочетании с J-цепью. Другой домен мультимеризации представляет собой домен димеризации Gal4. В других вариантах осуществления цепи могут быть модифицированы такими агентами, как биотин/авидин, что позволяет комбинировать два антитела.

[238] В отдельном варианте одноцепочечное антитело может быть создано путем соединения легкой и тяжелой цепей рецептора с применением непептидного линкера или химического звена. Как правило, легкая и тяжелая цепи будут продуцироваться в отдельных клетках, очищаться и, впоследствии, связываться друг с другом соответствующим образом (т. е. N-конец тяжелой цепи будет присоединен к С-концу легкой цепи с помощью соответствующего химического моста).

[239] Сшивающие реагенты применяются для образования молекулярных мостиков, связывающих функциональные группы двух разных молекул, например, стабилизирующий и коагулирующий агент. Однако предполагается, что могут быть созданы димеры или мультимеры одного и того же аналога или гетеромерные комплексы, состоящие из разных аналогов. Чтобы связать два разных соединения поэтапно, можно применять гетеробифункциональные сшивающие агенты, которые устраняют нежелательное образование гомополимера.

[240] Типовой гетеробифункциональный сшивающий агент содержит две реакционноспособные группы: одну, реагирующую с первичной аминогруппой (например, N-гидроксисукцинимид), и другую, реагирующую с тиольной группой (например,

пиридилдисульфид, малеимиды, галогены и т.д.). Через группу, реагирующую с первичным амином, сшивающий агент может реагировать с остатком(ами) лизина одного белка (например, выбранного антитела или его фрагмента), а через группу, реагирующую с тиолом, сшивающий агент, уже связанный с первым белком, реагирует с цистеиновым остатком (свободная сульфгидрильная группа) другого белка (например, селективного агента).

[241] Предпочтительно применять сшивающий агент, обладающий приемлемой стабильностью в крови. Известны многочисленные типы линкеров, содержащих дисульфидную связь, которые можно успешно применять для конъюгации средств направленного действия и терапевтических/профилактических средств. Линкеры, содержащие пространственно затрудненную дисульфидную связь, могут обеспечивать большую стабильность *in vivo*, предотвращая высвобождение нацеливающего пептида до того, как он достигнет места действия. Таким образом, указанные линкеры представляют собой одну группу связывающих агентов.

[242] Другим сшивающим реагентом является SMPT, который представляет собой бифункциональный сшивающий агент, содержащий дисульфидную связь, которая «стерически затруднена» соседним бензольным кольцом и метильными группами. Считается, что стерические затруднения дисульфидной связи выполняют функцию защиты связи от воздействия тиолат-анионов, таких как глутатион, которые могут присутствовать в тканях и крови, и тем самым помогают предотвратить отделение конъюгата перед доставкой присоединенного агента к целевому сайту.

[243] Сшивающий реагент SMPT, как и многие другие известные сшивающие реагенты, придает способность сшивать функциональные группы, такие как SH цистеина или первичные амины (например, эpsilon-аминогруппа лизина). Другой возможный тип сшивающего агента включает гетеробифункциональные фотореактивные фенилазиды, содержащие расщепляемую дисульфидную связь, такие как сульфосукцинимидил-2-(п-азидосалициламидо) этил-1,3'-дитиопропионат. N-гидроксисукцинимидильная группа реагирует с первичными аминогруппами, а фенилазид (при фотолизе) неселективно реагирует с любым аминокислотным остатком.

[244] В дополнение к затрудненным сшивателям в контексте данного документа также могут быть применены незатрудненные линкеры. Другие полезные сшивающие агенты, которые не считаются содержащими или образующими защищенный дисульфид, включают SATA, SPDP и 2-иминотиолан (Wawrzynczak & Thorpe, 1987). Применение таких сшивающих агентов хорошо известно в данной области техники. Другой вариант осуществления включает применение гибких линкеров.

[245] В патенте США 4 680 338 описаны бифункциональные линкеры, пригодные для получения конъюгатов лигандов с аминокислотными полимерами и/или белками, особенно для образования конъюгатов антител с хелаторами, лекарственными средствами, ферментами, детектируемыми метками и т.п. Патенты США 5 141 648 и 5 563 250 описывают расщепляемые конъюгаты, содержащие лабильную связь, которая

расщепляется в различных мягких условиях. Этот линкер особенно полезен тем, что представляющий интерес агент может быть связан непосредственно с линкером, при этом расщепление приводит к высвобождению активного агента. Конкретные применения включают добавление свободной аминогруппы или свободной сульфгидрильной группы к белку, такому как антитело или лекарственное средство.

[246] В патенте США 5 856 456 предложены пептидные линкеры для применения в соединении полипептидных компонентов для получения слитых белков, *например*, одноцепочечных антител. Линкер имеет длину до около 50 аминокислот, содержит по меньшей мере одно вхождение заряженной аминокислоты (предпочтительно аргинина или лизина), за которой следует пролин, и характеризуется большей стабильностью и пониженной агрегацией. В патенте США 5 880 270 описаны аминоксисодержащие линкеры, которые можно применять в различных способах иммунодиагностики и разделения.

D Очистка

[247] В некоторых вариантах осуществления антитела по данному изобретению можно очистить. Термин «очищенный», в контексте данного документа, предназначен для обозначения композиции, которую можно выделить из других компонентов, в которой белок очищен в любой степени по сравнению с его природным состоянием. Таким образом, очищенный белок также относится к белку, свободному от окружающей среды, в которой он может встречаться в природе. Когда применяется термин «по существу очищенный», это обозначение будет относиться к композиции, в которой белок или пептид составляет основной компонент композиции, например, составляющий около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 95% или более белков в композиции.

[248] Способы очистки белков хорошо известны специалистам в данной области техники. Эти методы включают, на одном уровне, грубое фракционирование клеточной среды на полипептидные и неполипептидные фракции. После отделения полипептида от других белков, представляющий интерес полипептид может быть дополнительно очищен с применением хроматографических и электрофоретических методов для достижения частичной или полной очистки (или очистки до гомогенности). Аналитические способы, особенно подходящие для получения чистого пептида, включают ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию; электрофорез в полиакриламидном геле; изоэлектрическую фокусировку. Другие способы очистки белка включают осаждение сульфатом аммония, PEG, антителами и т.п. или денатурацию нагреванием с последующим центрифугированием; гель-фильтрацию, обращенно-фазовую, гидроксиапатитную и аффинную хроматографию; и комбинации таких и других методов.

[249] При очистке антитела по данному изобретению желательно экспрессировать полипептид в прокариотической или эукариотической системе экспрессии и экстрагировать белок с применением денатурирующих условий. Полипептид может быть очищен от других клеточных компонентов с применением аффинной колонки, которая связывается с меченой частью полипептида. Как известно в данной области техники, считается, что порядок

проведения различных этапов очистки может быть изменен или некоторые этапы могут быть исключены, но при этом все равно будет получен подходящий способ получения по существу очищенного белка или пептида.

[250] Обычно полные антитела фракционируют с применением агентов (например, белка А), которые связывают Fc-фрагмент антитела. В альтернативном варианте, антигены можно применять для одновременной очистки и выбора подходящих антител. В таких способах часто применяют средство для отбора, связанное с подложкой, такой как колонка, фильтр или гранула. Антитела связываются с подложкой, загрязняющие вещества удаляются (например, путем вымывания) и антитела высвобождаются при определенных условиях (соль, тепло и т. д.).

[251] Различные способы количественного определения степени очистки белка или пептида будут известны специалистам в данной области техники в свете данного изобретения. К ним относятся, например, определение специфической активности активной фракции или оценка количества полипептидов во фракции с помощью анализа SDS/PAGE. Другим способом оценки чистоты фракции является вычисление удельной активности фракции, сравнение ее с удельной активностью исходного экстракта и, таким образом, расчет степени чистоты. Фактические единицы, используемые для представления количества активности, будут, конечно, зависеть от конкретного метода анализа, выбранного для последующей очистки, и от того, проявляет ли экспрессированный белок или пептид обнаруживаемую активность.

[252] Известно, что миграция полипептида может варьировать, иногда значительно, при различных условиях SDS/PAGE (Capaldi *et al.*, 1977). Поэтому следует понимать, что при различных условиях электрофореза кажущиеся молекулярные массы очищенных или частично очищенных продуктов экспрессии могут различаться.

[253]

V. Применение и композиции антител анти-DDR1

A. Терапевтические способы и применение

1. Лечение рака

[254] Хотя гиперпролиферативные заболевания могут быть ассоциированы с любым заболеванием, вызывающим бесконтрольное размножение клетки, типичным примером является рак. Одной из ключевых характеристик рака является то, что нормальный цикл апоптоза клетки прерывается, и поэтому агенты, которые прерывают рост клеток, важны в качестве терапевтических средств для лечения этих заболеваний. В данном изобретении антитела анти-DDR1 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут применяться для уменьшения количества раковых клеток и, как таковые, потенциально могут применяться для лечения различных типов линий рака. В некоторых аспектах антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению могут применяться для лечения рака, включая солидные опухоли, в частности, рака, который секретирует белок DDR1 или его части (например, внеклеточный домен DDR1) и/или содержит DDR1 на поверхности раковой клетки или раковой стволовой клетки. В

некоторых вариантах осуществления рак или раковые клетки, которые сверхэкспрессируют белок DDR1, выбирают для лечения антителами по данному изобретению.

[255] В некоторых вариантах осуществления рак и типы раковых клеток, которые можно лечить в соответствии с данным изобретением, включают, помимо прочего, рак или раковые клетки мочевого пузыря, крови, кости, костного мозга, головного мозга, молочной железы, толстой кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта, десны, головы, почки, печени, легкого, носоглотки, шеи, яичника, предстательной железы, кожи, желудка, поджелудочной железы, яичка, языка, шейки матки или матки. Кроме того, рак может конкретно относиться к следующему гистологическому типу, хотя и не ограничивается им: новообразование, злокачественное; карцинома; карцинома недифференцированная; гигантская и веретенчатая карцинома; мелкоклеточная карцинома; папиллярная карцинома; плоскоклеточная карцинома; лимфоэпителиальная карцинома; базально-клеточная карцинома; пиломатриксная карцинома; переходно-клеточная карцинома; папиллярная переходно-клеточная карцинома; аденокарцинома; гастринома злокачественная; холангиокарцинома; гепатоцеллюлярная карцинома; комбинированная гепатоцеллюлярная карцинома и холангиокарцинома; трабекулярная аденокарцинома; аденоидно-кистозная карцинома; аденокарцинома в аденоматозном полипе; аденокарцинома, семейный полипоз толстой кишки; солидная карцинома; карциноидная опухоль, злокачественная; бронхиоло-альвеолярная аденокарцинома; папиллярная аденокарцинома; хромофобная карцинома; ацидофильная карцинома; оксифильная аденокарцинома; базофильная карцинома; светлоклеточная аденокарцинома; зернистоклеточная карцинома; фолликулярная аденокарцинома; папиллярная и фолликулярная аденокарцинома; неинкапсулирующая склерозирующая карцинома; карцинома коры надпочечников; эндометриодная карцинома; карцинома придатков кожи; апокрिनная аденокарцинома; сальная аденокарцинома; церуминозная аденокарцинома; мукоэпидермоидная карцинома; цистаденокарцинома; папиллярная цистаденокарцинома; папиллярная серозная цистаденокарцинома; муцинозная цистаденокарцинома; муцинозная аденокарцинома; перстневидно-клеточная карцинома; инфильтрирующая карцинома протоков; медуллярная карцинома; дольковая карцинома; воспалительная карцинома; болезнь Педжета, молочной железы; ацинарно-клеточная карцинома; аденосквамозная карцинома; аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией; тимома злокачественная; опухоль стромы яичника злокачественная; текома злокачественная; гранулезоклеточная опухоль, злокачественная; андробластома злокачественная; карцинома клеток Сертоли; опухоль из клеток Лейдига злокачественная; опухоль из липидных клеток злокачественная; парагангиома злокачественная; экстрамаммарная парагангиома злокачественная; феохромоцитома; гломангиосаркома; злокачественная меланома; амеланотическая меланома; поверхностно распространяющаяся меланома; злокачественная меланома в гигантском пигментном невусе; эпителиоидноклеточная меланома; голубой невус злокачественный; саркома; фибросаркома; фиброзная гистиоцитома злокачественная; миксосаркома; липосаркома; лейомиосаркома; рабдомиосаркома; эмбриональная

рабдомиосаркома; альвеолярная рабдомиосаркома; стромальная саркома; смешанная опухоль злокачественная; мюллерова смешанная опухоль; нефробластома; гепатобластома; карциносаркома; мезенхимомы злокачественная; опухоль Бреннера злокачественная; опухоль филлоидная злокачественная; синовиальная саркома; мезотелиома злокачественная; дисгерминома; эмбриональная карцинома; тератома злокачественная; струма яичников злокачественная; хориокарцинома; мезонефрома злокачественная; гемангиосаркома; гемангиоэндотелиома злокачественная; саркома Капоши; гемангиоперицитомы злокачественная; лимфангиосаркома; остеосаркома; юкстакортикальная остеосаркома; хондросаркома; хондробластома злокачественная; мезенхимальная хондросаркома; гигантоклеточная опухоль кости; Саркома Юинга; одонтогенная опухоль злокачественная; амелобластная одонтосаркома; амелобластома злокачественная; амелобластная фибросаркома; пинеалома злокачественная; хордома; глиома злокачественная; эпендимомы; астроцитомы; протоплазматическая астроцитомы; фибриллярная астроцитомы; астробластома; глиобластома; олигодендроглиома; олигодендробластома; примитивная нейроэктодермальная опухоль; саркома мозжечка; ганглионейробластома; нейробластома; ретинобластома; нейрогенная опухоль обонятельного центра; менингиома злокачественная; нейрофибросаркома; неврилеммома злокачественная; зернистоклеточная опухоль злокачественная; злокачественная лимфома; болезнь Ходжкина; парагранулема; малая лимфоцитарная злокачественная лимфома; крупноклеточная, диффузная злокачественная лимфома; злокачественная фолликулярная лимфома; грибовидный микоз; другие уточненные неходжкинские лимфомы; злокачественный гистиоцитоз; множественная миелома; тучноклеточная саркома; иммунопролиферативное заболевание тонкой кишки; лейкоз; лимфолейкоз; лейкоз плазматических клеток; эритролейкоз; лимфосаркомоклеточный лейкоз; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; тучноклеточный лейкоз; мегакариобластный лейкоз; миелоидная саркома; и волосатоклеточный лейкоз. В определенных аспектах опухоль может включать остеосаркому, ангиосаркому, рабдосаркому, лейомиосаркому, саркому Юинга, глиобластома, нейробластома или лейкоз.

[256] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применяют для лечения рака поджелудочной железы; рака легкого, включая мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак легкого; рака толстой и прямой кишки; рака головы и шеи, рака желудка (гастрального рака); рака яичников; рака молочной железы; рака почки; рака печени; рака предстательной железы, рака шейки матки, рака головного мозга; рака кожи, включая меланому; или рака кости. В некоторых вариантах осуществления рак, выбранный для лечения, представляет собой рак молочной железы, включая различные подтипы рака молочной железы, как дополнительно обсуждается ниже.

[257] В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, имеет рак, который секретирует белок DDR1 или его часть, и/или имеет белок DDR1, присутствующий на клеточной

поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает этап определения того, секретирует ли рак, подлежащий лечению, белок DDR1 и/или экспрессируется ли белок DDR1 на поверхности раковых клеток.

[258] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применяют для лечения гематологического рака или рака крови, включая, помимо прочего, следующие заболевания: злокачественная лимфома; болезнь Ходжкина; парагранулема; малая лимфоцитарная злокачественная лимфома; крупноклеточная, диффузная злокачественная лимфома; фолликулярная злокачественная лимфома; грибовидный микоз; другие уточненные неходжкинские лимфомы; злокачественный гистиоцитоз; множественная миелома; тучноклеточная саркома; иммунопролиферативное заболевание тонкой кишки; лейкоз; лимфолейкоз; лейкоз плазматических клеток; эритролейкоз; лимфосаркомоклеточный лейкоз; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; тучноклеточный лейкоз; мегакариобластный лейкоз; миелоидная саркома; и волосатоклеточный лейкоз.

[259] В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, имеет рак, который секретирует белок DDR1 или его часть, и/или имеет белок DDR1, присутствующий на клеточной поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает этап определения того, секретирует ли рак, подлежащий лечению, белок DDR1 и/или экспрессируется ли белок DDR1 на поверхности раковых клеток. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способ лечения рака у субъекта включает определение наличия секретируемого белка DDR1 или присутствия белка DDR1 на поверхности раковых клеток у субъекта, и если определено, что раковые клетки имеют секретируемый белок DDR1 или имеют DDR1, присутствующий на поверхности раковых клеток, указанный способ включает лечение рака у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе.

2. Лечение рака молочной железы

[260] В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий лечению, представляет собой рак молочной железы, который обычно возникает в молочной железе, как правило во внутренней выстилке молочных протоков или долек. Существуют разные типы рака молочной железы с разными стадиями (распространением), агрессивностью и генетическим строением. При наилучшем лечении 10-летняя безрецидивная выживаемость колеблется от 98% до 10%. Способ лечения выбирают из хирургического вмешательства, лекарственных средств (химиотерапия) и лучевой терапии. В США в 2004 году было зарегистрировано 216 000 случаев инвазивного рака молочной железы и 40 000 смертей. Во всем мире рак молочной железы является вторым наиболее распространенным типом рака после рака легких (10,4% всех случаев рака, учитываемых для обоих полов) и пятой по частоте причиной смерти от рака. В 2004 году рак молочной железы стал причиной 519 000 смертей во всем мире (7% смертей от рака; почти 1% всех смертей). Рак молочной железы

примерно в 100 раз чаще встречается у женщин, чем у мужчин, но показатели выживаемости у обоих полов одинаковы.

[261] Первым симптомом или субъективным признаком рака молочной железы обычно является уплотнение, которое на ощупь отличается от окружающей ткани молочной железы. Согласно *Руководству Merck*, более 80% случаев рака молочной железы обнаруживаются, когда женщина обнаруживает указанное уплотнение. По данным Американского онкологического общества, первый клинический признак или объективное указание на рак молочной железы, определяемый врачом, обнаруживается при маммографии. На рак молочной железы также могут указывать уплотнения, обнаруженные в лимфатических узлах, расположенных в подмышечных впадинах. Признаки рака молочной железы, кроме уплотнения, могут включать изменения размера или формы груди, ямочки на коже, инверсию сосков или спонтанные выделения из одного соска. Боль («мастодиния») является ненадежным инструментом для определения наличия или отсутствия рака молочной железы, но может свидетельствовать о других проблемах со здоровьем молочной железы.

[262] Когда клетки рака молочной железы проникают в дермальные лимфатические сосуды - мелкие лимфатические сосуды в коже молочной железы - это может напоминать воспаление кожи и поэтому называется воспалительным раком молочной железы (ИВС). Симптомы воспалительного рака молочной железы включают боль, отек, повышение температуры и покраснение по всей груди, а также наличие текстуры апельсиновой корки на коже, называемую «peau d'orange». Еще одним симптомокомплексом рака молочной железы является болезнь Педжета молочной железы. Этот синдром проявляется в виде экзематоидных изменений кожи, таких как покраснение и легкое шелушение кожи сосков. По мере прогрессирования болезни Педжета симптомы могут включать покалывание, зуд, повышенную чувствительность, жжение и боль. Также могут быть выделения из соска. Приблизительно у половины женщин с диагнозом болезни Педжета также имеется уплотнение в груди.

[263] Иногда рак молочной железы представляет собой метастатическое заболевание, то есть рак, который распространился за пределы первично пораженного органа. Метастатический рак молочной железы вызывает симптомы, которые зависят от локализации метастазов. Наиболее частые локализации метастазирования включают кости, печень, легкие и головной мозг. Необъяснимая потеря веса может иногда предвещать скрытый рак молочной железы, как и симптомы лихорадки или озноба. Боли в костях или суставах иногда могут быть проявлениями метастатического рака молочной железы, также как и желтха или неврологические симптомы. Эти симптомы являются «неспецифическими», то есть они также могут быть проявлениями многих других заболеваний.

[264] Основными выявленными факторами риска являются пол, возраст, деторождение, гормоны, диета с высоким содержанием жиров, употребление алкоголя, ожирение и факторы окружающей среды, такие как табакокурение, влияние радиации и

посменная работа. Для 95% случаев рака молочной железы этиология неизвестна, в то время как примерно 5% новых случаев рака молочной железы связаны с наследственными синдромами. В частности, у носителей генов предрасположенности к раку молочной железы, BRCA1 и BRCA2, риск рака молочной железы и яичников повышен на 30-40%, в зависимости от того, в какой части белка происходит мутация. Эксперты считают, что 95% случаев наследственного рака молочной железы связаны с одним из этих двух генов. Наследственный рак молочной железы может принимать форму локализованного наследственного рака молочной железы - рак, поражающий только молочную железу, - или рака, поражающего молочную железу и яичники, и других типов рака. Рак молочной железы может передаваться наследственно как от родственников женского, так и мужского пола.

[265] Подтипы рака молочной железы обычно классифицируют на иммуногистохимической основе. Определения подтипов обычно следующие:

нормальный (ER+, PR+, HER2+, цитокератин 5/6+ и HER1+)

люминальный А (ER+ и/или PR+, HER2-)

люминальный В (ER+ и/или PR+, HER2+)

трижды негативный (ER-, PR-, HER2-)

HER2+/ER- (ER-, PR- и HER2+)

неклассифицированный (ER-, PR-, HER2-, цитокератин 5/6- и HER1-)

[266] В случае трижды негативных клеток рака молочной железы рост опухоли не обусловлен эстрогеном или прогестероном или сигналами роста, исходящими от белка HER2. Точно так же такие раковые клетки не реагируют на гормональную терапию, такую как тамоксифен или ингибиторы ароматазы, или на терапию, нацеленную на рецепторы HER2, такую как Герцептин®. Около 10-20% раковых состояний молочной железы оказываются трижды негативными. Важно идентифицировать эти типы рака, чтобы можно было избежать дорогостоящих и токсических методов лечения, которые вряд ли будут успешными, и сосредоточиться на методах лечения, которые можно применять для лечения трижды негативного рака молочной железы. Как и другие формы рака молочной железы, трижды негативный рак молочной железы можно лечить хирургическим путем, лучевой терапией и/или химиотерапией. Одним из особенно многообещающих подходов является «неoadъювантная» терапия, при которой химио- и/или лучевая терапия проводится до оперативного вмешательства. Другой лекарственной терапией является применение поли(ADP-рибозо)полимеразы или ингибиторов PARP.

[267] Хотя рассмотренные выше методы скрининга являются пригодными для определения возможного метода лечения рака, необходимо дальнейшее тестирование, чтобы подтвердить, является ли новообразование, обнаруженное при скрининге, раком, а не доброкачественным альтернативным состоянием, например, простой кистой. В клинических условиях рак молочной железы обычно диагностируется с помощью «тройного теста» клинического обследования молочной железы (обследование молочной железы квалифицированным практикующим врачом), маммографии и цитологического

исследования с тонкоигольной аспирационной биопсией. Как с помощью маммографии, так и клинического обследования молочной железы, также применяемых для скрининга, можно определить приблизительную вероятность того, что опухоль является раком, а также можно выявить любые другие поражения. Тонкоигольная аспирационная биопсия и цитологическое исследование (FNAC), выполняемые в амбулаторных условиях под местной анестезией, включают попытку извлечения небольшой порции жидкости из уплотнения. При наличии прозрачной жидкости очень маловероятно, чтобы опухоль была раковой, но кровянистую жидкость можно отправить на микроскопическое исследование на предмет наличия раковых клеток. Вместе эти три инструмента можно применять для диагностики рака молочной железы с хорошей степенью точности. Другие варианты биопсии включают пункционную биопсию, при которой удаляется часть опухоли молочной железы, и эксцизионную биопсию, при которой удаляется вся опухоль.

[268] При проведении скрининга на рак молочной железы ставят цель обнаружить рак у здоровых индивидуумов. Наиболее распространенным методом скрининга для женщин является сочетание рентгеновской маммографии и клинического обследования молочных желез. У женщин с более высоким риском, чем обычно, например, у женщин с отягощенным семейным анамнезом рака, дополнительные инструменты могут включать генетическое тестирование или магнитно-резонансную томографию молочных желез.

[269] Самообследование молочных желез было формой скрининга, который активно пропагандировался в прошлом, но в последствии не получил одобрения, поскольку несколько крупных исследований продемонстрировали, что он не приносит пользы для выживания женщин и часто вызывает значительное беспокойство. Считается, что это связано с тем, что рак, который можно обнаружить, как правило, уже находится на относительно поздней стадии, в то время как другие методы дают возможность выявлять рак на более ранней стадии, когда чаще можно применить радикальное лечение.

[270] Рентгеновская маммография использует рентгеновские лучи для исследования молочной железы на наличие каких-либо нехарактерных масс или уплотнений. Регулярная маммография рекомендуется в ряде стран женщинам старше определенного возраста в качестве инструмента скрининга.

[271] Генетическое тестирование на рак молочной железы обычно включает тестирование на наличие мутаций в генах BRCA. Как правило, этот метод не является рекомендуемым, за исключением лиц с повышенным риском рака молочной железы.

[272] Основой лечения рака молочной железы является хирургическое вмешательство, если опухоль локализована, с возможной адъювантной гормональной терапией (с тамоксифеном или ингибитором ароматазы), химиотерапией и/или лучевой терапией. В настоящее время рекомендации по лечению после оперативного вмешательства (адъювантная терапия) следуют определенной схеме. В зависимости от клинических критериев (возраст, тип рака, размер, метастазирование) пациентов условно делят на пациентов с высоким и низким риском, при этом для каждой категории риска применяются разные правила терапии. Возможности лечения включают лучевую терапию,

химиотерапию, гормональную терапию и иммунную терапию.

[273] Таргетная терапия рака представляет собой лечение, нацеленное на определенные характеристики раковых клеток, такие как белок, который позволяет раковым клеткам расти быстрым или аномальным образом. Таргетная терапия, как правило, с меньшей вероятностью, чем химиотерапия, будет поражать нормальные, здоровые клетки. Некоторые таргетные методы лечения представляют собой антитела, которые действуют подобно антителам, естественным образом вырабатываемым иммунной системой. Эти типы таргетной терапии иногда называют иммунотаргетной терапией.

[274] В настоящее время врачи применяют 3 таргетных метода лечения рака молочной железы. Герцептин® (трастузумаб) действует против HER2-положительного рака молочной железы, блокируя способность раковых клеток получать химические сигналы, которые способствуют росту клеток. Тикерб® (лапатиниб) действует против HER2-положительного рака молочной железы, блокируя определенные белки, которые могут вызывать неконтролируемый рост клеток. Авастин® (бевацизумаб) блокирует рост новых кровеносных сосудов, от которых зависит рост и функционирование раковых клеток.

[275] Гормональная (антиэстрогенная) терапия действует против рака молочной железы, положительного по гормональному рецептору, двумя способами: во-первых, за счет снижения количества гормона эстрогена в организме, а во-вторых, за счет блокирования действия эстрогена в организме. Большая часть эстрогена в женском организме вырабатывается яичниками. Эстроген вызывает рост рака молочной железы, положительного по гормональному рецептору. Таким образом, уменьшение количества эстрогена или блокирование его действия может способствовать уменьшению рака молочной железы, положительного по гормональному рецептору, и снижению риска рецидива рака молочной железы, положительного по гормональному рецептору. Гормональные терапевтические препараты не эффективны против рака молочной железы, негативного по гормональному рецептору.

[276] Существует несколько типов препаратов для гормональной терапии, в том числе ингибиторы ароматазы, селективные модуляторы рецепторов эстрогена и подавляющие регуляторы рецепторов эстрогена. В некоторых случаях яичники и фаллопиевы трубы могут быть удалены хирургическим путем для лечения рака молочной железы, положительного по гормональному рецептору, или в качестве профилактической меры для женщин с очень высоким риском рака молочной железы. Функцию яичников также можно временно отключить с помощью лекарственных средств.

[277] При планировании лечения врачи также могут применять PCR-тесты, такие как Oncotype DX, или микроматричные тесты, которые позволяют прогнозировать риск рецидива рака молочной железы на основе экспрессии генов. В феврале 2007 года первый предиктор рака молочной железы получил официальное одобрение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов. Это новый генный тест, который помогает прогнозировать, будет ли через 5 или 10 лет рецидив рака молочной железы, диагностированного у женщин на ранней стадии, и может способствовать

определению степени интенсивности лечения первоначальной опухоли.

[278] Для уничтожения раковых клеток, которые могут остаться после операции, также применяется лучевая терапия. Облучение может снизить риск рецидива на 50-66% при условии, что оно проводится в правильной дозе.

[279] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты применяют для лечения рака молочной железы, включая каждый из описанных выше подтипов рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению применяют в комбинации со вторым терапевтическим агентом, при этом указанный второй терапевтический агент включает один или большее количество агентов, описанных в данном документе (например, облучение, химиотерапевтические агенты, гормоны и иммунотерапевтические агенты). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак молочной железы или его подтип, который имеет белок DDR на клеточной поверхности или секретирует белок DDR1, лечат антителами или антигенсвязывающими фрагментами.

3. Лечение фиброзных нарушений

[280] В дополнение к экспрессии при раке, белок DDR1 также экспрессируется в почках, легких, желудочно-кишечном тракте, коже и головном мозге, а также в других органах и участвует в процессе фибрирования кожи, легких и печени (публикация Moll *et al.* 2019, включенная в данный документ посредством ссылки). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитела анти-DDR1 или их антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению можно применять отдельно или в комбинации с другими видами терапии для лечения фиброзных нарушений. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фиброзное нарушение представляет собой фиброз органа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фиброзное нарушение представляет собой фиброз кожи, почек, печени, легких или сердца. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фиброзное нарушение, подлежащее лечению, представляет собой, помимо прочего, гипертрофические рубцы на коже, идиопатический фиброз легкого, цирроз печени и фиброз почек.

[281] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фиброзное нарушение, подлежащее лечению, представляет собой фиброз легкого. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект, подлежащий лечению, страдает интерстициальным заболеванием легких. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект, подлежащий лечению, страдает идиопатическим легочным фиброзом (IPF) или рубцеванием легких.

В. Составление и введение

[282] В другом аспекте данного изобретения предлагаются фармацевтические композиции, содержащие антитела анти-DDR1 и антигены для их получения. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество антитела или его фрагмента и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретном

варианте осуществления данного изобретения термин «фармацевтически приемлемый» обозначает одобренный регуляторным ведомством Федерального правительства или правительством штата, или приведенный в Фармакопее США патент или другой общепризнанный фармакопее для применения для животных, а более конкретно для человека. Термин «носитель» относится к разбавителю, вспомогательному веществу или несущей среде, с которыми вводится данное терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является особым носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. В качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций также можно применять солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина. Другие пригодные фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерин, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т. п.

[283] Композиция, если желательно, также может содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или буферных агентов для поддержания pH. Данные композиции могут находиться в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Пероральные составы могут включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния фармацевтической степени чистоты и т.д. Примеры подходящих агентов описаны в публикации «Remington's Pharmaceutical Sciences». Такие композиции будут содержать профилактически или терапевтически эффективное количество антитела или его фрагмента, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Лекарственная форма должна соответствовать способу введения, который может быть пероральным, внутривенным, внутриартериальным, внутрибуккальным, интраназальным, через небулайзер, бронхиальной ингаляцией или путем искусственной вентиляции легких.

[284] Антитела по данному изобретению, как описано в данном документе, могут быть приготовлены для парентерального введения, например, могут быть приготовлены для инъекций внутрикожным, внутривенным, внутримышечным, подкожным, внутриопухолевым или даже внутрибрюшинным путями. В альтернативном варианте, антитела можно вводить местно непосредственно на слизистую оболочку, например, в виде назальных капель, ингаляции или с помощью небулайзера. Фармацевтически приемлемые соли включают кислые соли и те, которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т.п. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических

оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин, и тому подобное.

[285] Как правило, ингредиенты композиций по данному изобретению поставляются либо по отдельности, либо смешиваются друг с другом в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Когда предполагается введение композиции путем инфузии, ее можно наливать во флакон для инфузий, содержащий воду или солевой раствор фармацевтической степени чистоты. Когда композицию вводят путем инъекции, то может прилагаться ампула стерильной воды для инъекций или солевой раствор, чтобы ингредиенты можно было смешивать перед введением.

[286] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения описанные в данном документе композиции составлены в виде нейтральных веществ или в форме солей. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как производные соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т. д., и соли, образованные с катионами, такими как производные натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин и т. д.

[287] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в количестве, эффективном для лечения заболевания или нарушения, в частности рака, такого как рак молочной железы. Количество вводимого анти-DDR1-антитела будет зависеть от множества факторов, включая, помимо прочего, конкретный тип подлежащего лечению рака, стадию подлежащего лечению рака, способ введения, частоту введения, желаемый терапевтический эффект, пользу и другие параметры, такие как возраст, вес и другие характеристики пациента и т. д.

[288] Дозы, эффективные для обеспечения терапевтического эффекта, могут быть первоначально оценены на животных моделях *in vivo* или в клинических исследованиях. Подходящие модели животных для различных заболеваний известны в данной области техники, и определение доз, эффективных для обеспечения терапевтического эффекта при определенных способах и частоте введения, находится в пределах возможностей специалистов в данной области техники.

[289] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-DDR1 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в диапазоне 0,0001-100 мг/кг массы тела. Следует ожидать широких вариаций вводимых доз ввиду разнообразия доступных композиций антител и различной эффективности различных способов введения. Вариации этих уровней доз можно регулировать с помощью стандартных эмпирических методов оптимизации, как это хорошо известно специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения для лечения показаний, описанных в данном документе, эффективная доза антитела по данному изобретению

может составлять от около 0,001 до около 75 мг/кг массы тела; от 0,005 мг/кг до около 50 мг/кг массы тела; от около 0,01 мг/кг до около 30 мг/кг массы тела; или от около 0,01 до 5 мг/кг массы тела.

С. Клеточная терапия

[290] В другом аспекте данного изобретения предлагаются иммунные клетки, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR содержит антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белок CAR включает от N-конца к С-концу: лидерный пептид, вариабельный домен тяжелой цепи анти-DDR1, линкерный домен, вариабельный домен легкой цепи анти-DDR1, IgG1-CH2-CH3 человека, спейсерную область, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен анти-DDR1 и внутриклеточный сигнальный домен CD3 ζ Т-клеток.

[291] Также предлагаются способы иммунотерапии, включающие введение эффективного количества иммунных клеток по данному изобретению. В одном варианте осуществления данного изобретения клиническое заболевание или нарушение лечат путем переноса популяции иммунных клеток, вызывающей иммунный ответ. В определенных вариантах осуществления данного изобретения рак или инфекцию лечат путем переноса популяции иммунных клеток, вызывающей иммунный ответ. В данном изобретении предлагаются способы лечения или замедления прогрессирования рака у индивидуума, включающие введение указанному индивидууму эффективного количества антигенспецифической клеточной терапии.

[292] Иммунные клетки могут представлять собой Т-клетки (например, регуляторные Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки или гамма-дельта Т-клетки), NK-клетки, инвариантные NK-клетки, NKT-клетки или макрофаги. Также в данном изобретении предлагаются способы получения и конструирования иммунных клеток, а также способы применения и введения клеток для адоптивной клеточной терапии, и в этом случае клетки могут быть аутологичными или аллогенными. Таким образом, иммунные клетки можно применять в качестве иммунотерапии, например, для нацеливания на раковые клетки.

[293] Иммунные клетки могут быть выделены у субъектов, в частности у людей. Иммунные клетки могут быть получены от здоровых людей, здоровых добровольцев или здоровых доноров. Иммунные клетки могут быть получены от субъекта, представляющего интерес, такого как субъект с подозрением на наличие определенного заболевания или патологического состояния, субъект с подозрением на предрасположенность к определенному заболеванию или патологическому состоянию, или субъект, который получает терапию по поводу определенного заболевания или патологического состояния. Иммунные клетки можно собирать из любого места, где они находятся у субъекта, включая, помимо прочего, кровь, пуповинную кровь, селезенку, тимус, лимфатические узлы и костный мозг. Выделенные иммунные клетки можно применять непосредственно или их

можно хранить в течение определенного периода времени, например, путем замораживания.

[294] Иммунные клетки могут быть обогащены/очищены из любой ткани, в которой они находятся, включая, помимо прочего, кровь (включая кровь, собранную банками крови или банками пуповинной крови), селезенку, костный мозг, ткани, удаленные и/или доступные во время хирургических процедур, и ткани, полученные с помощью процедур биопсии. Ткани/органы, из которых обогащены, выделены и/или очищены иммунные клетки, могут быть выделены как от живых, так и от неживых субъектов, при этом неживые субъекты являются донорами органов. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения иммунные клетки выделяют из крови, такой как периферическая кровь или пуповинная кровь. В некоторых аспектах иммунные клетки, выделенные из пуповинной крови, обладают повышенной иммуномодулирующей способностью, например, измеряемой по подавлению CD4- или CD8-положительных Т-клеток. В конкретных аспектах иммунные клетки выделяют из объединенной крови, особенно объединенной пуповинной крови, для повышения иммуномодулирующей способности. Объединенная кровь может быть получена из 2 или большего количества источников, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или большего количества (например, доноров).

[295] Популяцию иммунных клеток можно получить от субъекта, нуждающегося в терапии или страдающего заболеванием, ассоциированным со сниженной активностью иммунных клеток. Таким образом, такие клетки будут аутологичными для субъекта, нуждающегося в терапии. В альтернативном варианте, популяция иммунных клеток может быть получена от донора, предпочтительно от донора, подходящего по гистосовместимости. Популяцию иммунных клеток можно собирать из периферической крови, пуповинной крови, костного мозга, селезенки или любого другого органа/ткани, в которых находятся иммунные клетки указанного субъекта или донора. Иммунные клетки могут быть выделены из пула субъектов и/или доноров, например, из пула пуповинной крови.

[296] Когда популяцию иммунных клеток получают от донора, отличного от субъекта, донор предпочтительно является аллогенным, при условии, что полученные клетки совместимы с субъектом в том смысле, что они могут быть введены субъекту. Аллогенные донорские клетки могут быть или не быть совместимыми с человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA). Чтобы сделать аллогенные клетки совместимыми с субъектами, их можно обработать для снижения иммуногенности.

[297] Иммунные клетки могут быть генетически сконструированы для экспрессии антигенных рецепторов, таких как сконструированные TCR и/или химерные антигенные рецепторы (CAR). Например, клетки-хозяева (например, аутологичные или аллогенные Т-клетки) модифицируют для экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR), обладающего антигенной специфичностью в отношении ракового антигена. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения НК-клетки сконструированы для экспрессии TCR. НК-клетки могут быть дополнительно сконструированы для экспрессии CAR. Множество

CAR и/или TCR, например, к разным антигенам, могут быть добавлены к одному типу клеток, такому как Т-клетки или NK-клетки.

[298] Подходящие способы модификации известны в данной области техники. См., например, публикации Sambrook *et al.*, *выше*; и Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994. Например, клетки можно трансдуцировать для экспрессии Т клеточного рецептора (TCR), обладающего антигенной специфичностью в отношении ракового антигена, с помощью методов трансдукции, описанных в публикации Heemskerk *et al.* (2008) и Johnson *et al.* (2009).

[299] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки содержат одну или большее количество нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, которые кодируют один или большее количество антигенных рецепторов, и генетически модифицированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма или клетки, который, например, обычно не обнаруживается в сконструированной клетке и/или организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные нуклеиновые кислоты не встречаются в природе, например, нуклеиновая кислота, не встречающаяся в природе (*например*, химерная).

D. Комбинированная терапия

[300] Также может быть желательным обеспечить комбинированное лечение с применением антител по данному изобретению в сочетании с дополнительными противораковыми терапевтическими средствами. Эти терапевтические средства могут быть предоставлены в комбинированном количестве, эффективном для достижения снижения одного или большего количества параметров заболевания. Этот процесс может включать приведение в контакт клеток/субъектов с обоими агентами/лекарственными средствами одновременно, например, с применением одной композиции или фармакологического препарата, который включает оба агента, или путем приведения в контакт клетки/субъекта с двумя различными композициями или препаратами в одно и то же время. одновременно, при этом одна композиция включает антитело, а другая включает другой агент.

[301] В альтернативном варианте, применение антитела может предшествовать другому лечению или следовать за ним с интервалами от нескольких минут до недель. Как правило, следует следить за тем, чтобы между моментом каждой доставки не истекал значительный период времени, так что терапевтические средства по-прежнему могли бы оказывать благоприятное комбинированное воздействие на клетку/субъект. В таких случаях предполагается, что контакт с клеткой будет осуществляться обоими модальностями с интервалом времени около 12-24 часов, с интервалом времени 6-12 часов или с задержкой только около 12 часов. В некоторых ситуациях может быть желательно значительно продлить период лечения; однако, когда между соответствующими введениями проходит от около 10 дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4,

5, 6, 7 или 8).

[302] Также возможно, что потребуются более одного введения антитела анти-DDR1 или другого терапевтического средства. Можно применять различные комбинации, где антитело обозначается как «А», а другое терапевтического средство - как «В», как показано ниже:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B
 A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A
 A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

[303] Предполагается применение также и других комбинаций. Чтобы уничтожить клетки, ингибировать рост клеток, ингибировать метастазирование, ингибировать ангиогенез или иным образом обратить вспять или уменьшить злокачественный фенотип опухолевых клеток с помощью способов и композиций по данному изобретению, можно привести в контакт клетку-мишень или сайт с антителом и по меньшей мере одним другим терапевтическим средством. Эти терапевтические средства могут быть предоставлены в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения или ингибирования пролиферации раковых клеток. Этот процесс может включать одновременное приведение в контакт клеток/сайта/субъекта с агентами/лекарственными средствами.

[304] Конкретные агенты, рассматриваемые для комбинированной терапии с антителами по данному изобретению, включают химиотерапию и трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. Химиотерапия может включать цитарабин (ara-C) и антрациклин (чаще всего даунорубицин), только высокие дозы цитарабина, полностью транс-ретиноевую кислоту (ATRA) в дополнение к индукционной химиотерапии, обычно антрациклин, дигидрохлорид гистамина (целпен) и интерлейкин 2 (Proleukin) после завершения консолидирующей терапии, гемтузумаб озогамидин (Mylotarg) для пациентов в возрасте старше 60 лет с рецидивом AML, которым не показана высокодозная химиотерапия, клофарабин, а также таргетная терапия, такая как ингибиторы киназ, ингибиторы фарнезилтрансферазы, децитабин и ингибиторы MDR1 (белок с множественной лекарственной устойчивостью), триоксид мышьяка или рецидивирующий острый промиелоцитарный лейкоз (APL).

[305] В определенных вариантах осуществления данного изобретения агенты для комбинированной терапии представляют собой одно или большее количество лекарственных средств, выбранных из группы, состоящей из ингибитора топоизомеразы, антрациклинового ингибитора топоизомеразы, антрациклина, даунорубицина, нуклеозидного ингибитора метаболизма, цитарабина, гипометилирующего агента, цитарабина в низких дозах (LDAC), комбинации даунорубицина и цитарабина, липосом даунорубицина и цитарабина для инъекций, Vuxeos®, азацитидина, Vidaza®, децитабина, полностью транс-ретиноевой кислоты (ATRA), мышьяка, триоксида мышьяка, дигидрохлорида гистамина, Ceplene®, интерлейкина-2, альдеслейкина, Proleukin®, гемтузумаба, озогамидина, Mylotarg®, ингибитора FLT-3, мидостаурина, Rydapt®, клофарабина, ингибитора фарнезилтрансферазы, децитабина, ингибитора IDH1,

иводидениба, Tibsovo®, ингибитора IDH2, энаседенаба, Idhifa®, сглаженного ингибитора (СМО), глаздегиба, ингибитора аргиназы, ингибитора IDO, эпакадостата, ингибитора BCL-2, венетоклакса, Venclexta®, комплексного производного платины, оксалиплатина, ингибитора киназы, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора киназы PI3, ингибитора ВТК, ибрутиниба, IMBRUVICA®, акалбрутиниба, CALQUENCE®, занубрутиниба, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA-4, антитела к LAG3, антитела к ICOS, антитела к TIGIT, антитела к TIM3, антитела к CD40, антитела к 4-1BB, антитела к CD47, антитела к SIRP1 α или слитого белка, антагониста E-селектина, антитела, связывающегося с опухолевым антигеном, антитела, связывающегося с маркером поверхности Т-клеток, антитела, связывающегося с маркером поверхности миелоидных клеток или NK-клеток, алкилирующего агента, нитромочевинного агента, антиметаболита, противоопухолевого антибиотика, алкалоида, полученного из растения, препарата для гормональной терапии, антагониста гормонов, ингибитора ароматазы и ингибитора Р-гликопротеина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения агент, применяемый для комбинированной терапии, представляет собой агент, который ранее применялся в качестве терапии по определенному показанию, такому как определенный тип рака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения конкретным показанием является рак молочной железы, а агент, применяемый в комбинации с антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, представляет собой агент, который одобрен для лечения рака молочной железы

VI. Конъюгаты антител

[306] Антитела по данному изобретению могут быть связаны по меньшей мере с одним агентом с образованием конъюгата антител. Для повышения эффективности молекул антител в качестве диагностических или терапевтических агентов обычно осуществляют связывание или ковалентное связывание или образуют комплексы по меньшей мере с одной желаемой молекулой или фрагментом. Такой молекулой или фрагментом может быть, помимо прочего, по меньшей мере одна эффекторная или репортерная молекула. Эффекторные молекулы включают молекулы, обладающие желаемой активностью, например, цитотоксической активностью. Неограничивающие примеры эффекторных молекул, присоединенных к антителам, включают токсины, противоопухолевые агенты, терапевтические ферменты, радионуклиды, противовирусные агенты, хелатирующие агенты, цитокины, факторы роста и олиго- или полинуклеотиды. Напротив, репортерная молекула определяется как любая часть, которая может быть обнаружена с помощью анализа. Неограничивающие примеры репортерных молекул, которые были конъюгированы с антителами, включают ферменты, радиоактивные метки, гаптены, флуоресцентные метки, фосфоресцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, хромофоры, фотоаффинные молекулы, окрашенные частицы или лиганды, такие как биотин.

[307] Конъюгаты «антитело-лекарственное средство» стали революционным подходом к разработке противоопухолевых препаратов. Конъюгаты «антитело-

лекарственное средство» (ADC) включают моноклональные антитела (MAb), которые ковалентно связаны с лекарственными средствами, уничтожающими клетки. Этот подход сочетает высокую специфичность MAb в отношении их антигенных мишеней с сильнодействующими цитотоксическими препаратами, что приводит к «вооруженным» MAb, которые доставляют полезную нагрузку (лекарственное средство) к опухолевым клеткам с повышенным уровнем антигена. Направленная доставка препарата также сводит к минимуму его воздействие на нормальные ткани, что приводит к снижению токсичности и улучшению терапевтического индекса. Одобрение FDA двух препаратов ADC, ADCETRIS® (брентуксимаб ведотин) в 2011 г. и KADCYLA® (трастузумаб эмтанзин или T-DM1) в 2013 г., подтвердило эффективность этого подхода. В настоящее время более 30 препаратов-кандидатов ADC находятся на различных стадиях клинических исследований для лечения рака. (Leal et al., 2014). Поскольку инженерия антител и оптимизация полезной нагрузки линкера становятся все более и более усовершенствованными, открытие и разработка новых ADC все больше зависят от идентификации и валидации новых мишеней, пригодных для этого подхода, и создания нацеливающих MAb. Двумя критериями мишеней ADC являются повышенная регуляция/высокий уровень экспрессии в опухолевых клетках и надежная интернализация.

[308] Конъюгаты антител также предпочтительны для применения в качестве диагностических агентов. Диагностические антитела обычно подпадают под два класса: те, которые применяются в диагностике *in vitro*, например, в различных иммунологических анализах, и те, которые применяются в диагностических протоколах *in vivo*, обычно известных как «визуализация, -направленная на антитела». В данной области техники известны многие подходящие визуализирующие агенты, а также способы их присоединения к антителам (см., например, патенты США 5 021 236, 4 938 948 и 4 472 509). Применяемые фрагменты для визуализации могут представлять собой парамагнитные ионы, радиоактивные изотопы, флуорохромы, вещества, обнаруживаемые с помощью ЯМР, и агенты рентгеновской визуализации.

[309] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фрагмент, присоединенный к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, представляет собой парамагнитный ион, который может быть выбран, среди прочего, из хрома (III), марганца (II), железа (III), железа (II), кобальта (II), никеля (II), меди (II), неодима (III), самария (III), иттербия (III), гадолиния (III), ванадия (II), тербия (III), диспрозия (III), гольмия (III) и/или эрбия (III), при этом особенно предпочтительным является гадолиний. Ионы, применяемые в других контекстах, таких как рентгеновская визуализация, включают, помимо прочего, лантан (III), золото (III), свинец (II) и особенно висмут (III).

[310] В случае радиоактивных изотопов для терапевтического и/или диагностического применения изотоп может быть выбран из астатина²¹¹, ¹⁴углерода, ⁵¹хрома, ³⁶хлора, ⁵⁷кобальта, ⁵⁸кобальта, ⁶⁷меди, ¹⁵²Eu, галлия⁶⁷, ³водорода, йода¹²³, йода¹²⁵, йода¹³¹, индия¹¹¹, ⁵⁹железа, ³²фосфора, рения¹⁸⁶, рения¹⁸⁸, ⁷⁵селена, ³⁵серы, техниция^{99m} и/или иттрия⁹⁰. ¹²⁵I часто предпочтительнее для применения в определенных вариантах

осуществления данного изобретения, а техний^{99m} и/или индий¹¹¹ также часто предпочтительнее из-за их низкой энергии и пригодности для обнаружения на большом расстоянии. Радиоактивно меченные моноклональные антитела по данному изобретению могут быть получены в соответствии с хорошо известными в данной области техники способами. Например, моноклональные антитела могут быть йодированы контактом с йодидом натрия и/или калия и химическим окислителем, таким как гипохлорит натрия, или ферментативным окислителем, таким как лактопероксидаза. Моноклональные антитела в соответствии с данным изобретением могут быть помечены технецием^{99m} в процессе замены лиганда, например, восстановлением пертехната раствором двухвалентного олова, хелатированием восстановленного технеция на колонке с сефадексом и нанесением антитела на эту колонку. В альтернативном варианте, можно применять способы прямого мечения, *например*, путем инкубации пертехната, восстанавливающего агента, такого как SnCl_2 , буферного раствора, такого как раствор фталата натрия-калия, и антитела. Промежуточные функциональные группы, которые часто применяются для связывания с антителом радиоизотопов, существующих в виде ионов металлов, представляют собой диэтиленetriаминпентауксусную кислоту (DTPA) или этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA).

[311] К числу флуоресцентных меток, предполагаемых для применения в качестве конъюгатов, относятся Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade синий, Cy3, Cy5, 6-FAM, изотиоцианат флуоресцеина, HEX, 6-JOE, орегонский зеленый 488, орегонский зеленый 500, орегонский зеленый 514, Pacific синий, REG, родаминовый зеленый, родаминовый красный, ренографин, ROX, TAMRA, TET, тетраметилродамин и/или тexasский красный.

[312] Другой тип конъюгата антитела, рассматриваемый в данном изобретении, предназначен в первую очередь для применения *in vitro*, когда антитело связано со вторичным связывающим лигандом и/или с ферментом (ферментная метка), который образует окрашенный продукт при контакте с хромогенным субстратом. Примеры подходящих ферментов включают уреазу, щелочную фосфатазу, гидропероксидазу (хрена) или глюкозооксидазу. Предпочтительными вторичными связывающими лигандами являются соединения биотина, авидина и стрептавидина. Применение таких меток хорошо известно специалистам в данной области техники и описано, например, в патентах США 3 817 837, 3 850 752, 3 939 350, 3 996 345, 4 277 437, 4 275 149 и 4 366 241.

[313] Еще один известный способ сайт-специфического присоединения молекул к антителам включает реакцию антител с аффинными метками на основе гаптена. По существу, аффинные метки на основе гаптена реагируют с аминокислотами в антигенсвязывающем сайте, тем самым разрушая этот сайт и блокируя специфическую антигенную реакцию. Однако это может быть невыгодно, поскольку приводит к потере связывания антигена конъюгатом антител.

[314] Молекулы, содержащие азидогруппы, также можно применять для

образования ковалентных связей с белками через реакционноспособные нитреновые промежуточные соединения, которые генерируются ультрафиолетовым светом низкой интенсивности (Potter and Haley, 1983). В частности, 2- и 8-азидоаналоги пуриновых нуклеотидов применялись в качестве сайт-направленных фотозондов для идентификации белков, связывающих нуклеотиды, в неочищенных клеточных экстрактах (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985). 2- и 8-азидонуклеотиды также применялись для картирования нуклеотидсвязывающих доменов очищенных белков (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989; Dholakia et al., 1989) и могут применяться в качестве агентов, связывающих антитела.

[315] В данной области техники известно несколько способов присоединения или конъюгации антитела к его фрагменту конъюгата. Некоторые способы присоединения включают применение металлохелатного комплекса с использованием, например, органического хелатирующего агента, такого как ангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТРА); этилентриаминтетрауксусная кислота; N-хлор-р-толуолсульфонамид; и/или тетрахлор-3 α -6 α -дифенилгликоурил-3, присоединенный к антителу (патенты США 4 472 509 и 4 938 948). Моноклональные антитела также могут реагировать с ферментом в присутствии связующего агента, такого как глутаровый альдегид или периодат. Конъюгаты с флуоресцеиновыми маркерами готовят в присутствии этих связующих агентов или реакцией с изотиоцианатом. В патенте США 4 938 948 визуализация опухолей молочной железы достигается с применением моноклональных антител, а обнаруживаемые фрагменты визуализации связываются с антителом с применением линкеров, таких как метил-р-гидроксибензимидаз или N-сукцинимидил-3-(4-гидроксифенил)пропионат.

[316] В других вариантах осуществления данного изобретения рассматривается дериватизация иммуноглобулинов путем селективного введения сульфгидрильных групп в Fc область иммуноглобулина с применением условий реакции, которые не изменяют сайт связывания антитела. Описано, что конъюгаты антител, полученные в соответствии с этой методологией, проявляют повышенную продолжительность жизни, специфичность и чувствительность (патент США 5 196 066, включенный в данный документ посредством ссылки). Сайт-специфическое присоединение эффекторных или репортерных молекул, при котором репортерная или эффекторная молекула конъюгирована с углеводным остатком в Fc области, также описано в литературе (O'Shannessy et al., 1987). Сообщалось, что этот подход дает диагностически и терапевтически перспективные антитела, которые в настоящее время проходят клиническую оценку.

VII. Способы иммунодиагностики

[317] В дополнительных вариантах своего осуществления данное изобретение относится к способам иммунодетекции для связывания, очистки, удаления, количественного определения и иного общего обнаружения раковых состояний, связанных с DDR1. Хотя такие способы могут применяться в традиционном смысле, другое применение будет заключаться в контроле качества и мониторинге запасов вакцин и других вирусов, когда антитела в соответствии с данным изобретением могут применяться для

оценки количества или целостности (*т. е.* долгосрочной стабильности) антигенов Н1 в вирусах. В альтернативном варианте, указанные способы могут применяться для скрининга различных антител на соответствующие/желаемые профили реактивности.

[318] Некоторые способы иммунодетекции включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), иммунорадиометрический анализ, флюороиммуноанализ, хемилюминесцентный анализ, биоломинесцентный анализ и Вестерн-блоттинг, и это лишь некоторые из них. В частности, также предлагается конкурентный анализ для обнаружения и количественного определения DDR1. Этапы различных пригодных способов иммунодетекции описаны в научной литературе, *например*, в публикациях Doolittle and Ben-Zeev (1999), Gulbis and Galand (1993), De Jager *et al.* (1993), а также Nakamura *et al.* (1987). Как правило, указанные способы иммуносвязывания включают получение образца, предположительно содержащего рак, связанный с DDR1, и приведение образца в контакт с первым антителом в соответствии с данным изобретением, в зависимости от обстоятельств, в условиях, эффективных для образования иммунокомплексов.

[319] Эти способы включают способы обнаружения или очистки DDR1 или раковых клеток, связанных с DDR1, из образца. Антитело предпочтительно будет связано с твердой подложкой, например, в виде матрицы колонки, а образец, предположительно содержащий раковые клетки, связанные с DDR1, будет нанесен на иммобилизованное антитело. Нежелательные компоненты будут вымыты из колонки, при этом останутся клетки, экспрессирующие DDR1, в иммунокомплексе с иммобилизованным антителом, которое затем будет собрано путем удаления организма или антигена из колонки.

[320] Способы иммуносвязывания также включают способы обнаружения и количественного определения количества раковых клеток, связанных с DDR1, или родственных компонентов в образце, а также обнаружения и количественного определения любых иммунных комплексов, образующихся в процессе связывания. В данном случае можно было бы получить образец, предположительно содержащий раковые клетки, связанные с DDR1, и привести образец в контакт с антителом, которое связывает DDR1 или их компоненты, с последующим обнаружением и количественной оценкой количества иммунных комплексов, образованных в определенных условиях. С точки зрения обнаружения антигена, анализируемым биологическим образцом может быть любой образец, который предположительно содержит рак, связанный с DDR1, например, срез или образец ткани, гомогенизированный экстракт ткани, биологическая жидкость, включая кровь и сыворотку, или секрет, такой как фекалии или моча.

[321] Приведение выбранного биологического образца в контакт с антителом в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для образования иммунных комплексов (первичных иммунных комплексов), как правило, заключается в простом добавлении композиции антител к образцу и инкубации смеси в течение периода времени, достаточного для того, чтобы антитела образовали иммунные комплексы с DDR1, *т. е.* связались с ними. По истечении этого времени композицию образец-антитело, такую

как срез ткани, планшет для ELISA, дот-блоттинг или вестерн-блоттинг, обычно промывают для удаления любых неспецифически связанных видов антител, что позволяет обнаруживать только те антитела, которые специфически связаны с первичными иммунными комплексами.

[322] В общем, обнаружение образования иммунных комплексов хорошо известно в данной области техники и может быть достигнуто за счет применения многочисленных подходов. Эти способы обычно основаны на обнаружении метки или маркера, такого как любая из этих радиоактивных, флуоресцентных, биологических или ферментативных меток. Патенты, в которых описано применение таких меток, включают патенты США 3 817 837, 3 850 752, 3 939 350, 3 996 345, 4 277 437, 4 275 149 и 4 366 241. Конечно, можно найти дополнительные преимущества за счет применения вторичного связывающего лиганда, такого как второе антитело и/или расположение связывания лиганда биотин/авидин, как известно в данной области техники.

[323] Антитело, применяемое при обнаружении, само по себе может быть связано с обнаруживаемой меткой, при этом можно было бы просто детектировать эту метку, тем самым позволяя определить количество первичных иммунных комплексов в композиции. В альтернативном варианте, первое антитело, которое связывается с первичными иммунными комплексами, может быть обнаружено с помощью второго связывающего лиганда, обладающего аффинностью связывания с антителом. В этих случаях второй связывающий лиганд может быть связан с обнаруживаемой меткой. Второй связывающий лиганд сам по себе часто представляет собой антитело, которое, таким образом, можно назвать «вторичным» антителом. Первичные иммунные комплексы контактируют с меченым вторичным связывающим лигандом или антителом в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для образования вторичных иммунных комплексов. Затем вторичные иммунные комплексы обычно промывают для удаления любых неспецифически связанных меченых вторичных антител или лигандов, после чего можно обнаружить оставшуюся метку во вторичных иммунных комплексах.

[324] Другие способы включают обнаружение первичных иммунных комплексов с помощью двухэтапного подхода. Второй связывающий лиганд, такой как антитело, обладающее аффинностью связывания с антителом, применяется для образования вторичных иммунных комплексов, как описано выше. После промывки вторичные иммунные комплексы контактируют с третьим связывающим лигандом или антителом, обладающим аффинностью связывания со вторым антителом, опять же в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для образования иммунных комплексов (третичных иммунных комплексов). Третий лиганд или антитело связывают с обнаруживаемой меткой, что позволяет обнаруживать образованные таким образом третичные иммунные комплексы. Эта система может предусматривать усиление сигнала, если это необходимо.

[325] В одном способе иммунодетекции применяются два разных антитела. Первое биотинилированное антитело применяется для обнаружения целевого антигена, а второе

антитело затем применяется для обнаружения биотина, присоединенного к биотину в комплексе. В этом способе тестируемый образец сначала инкубируют в растворе, содержащем антитело первого этапа. Если целевой антиген присутствует, часть антитела связывается с антигеном с образованием биотинилированного комплекса «антитело/антиген». Затем комплекс «антитело/антиген» амплифицируют путем инкубации в последовательных растворах стрептавидина (или авидина), биотинилированной ДНК и/или комплементарной биотинилированной ДНК, при этом на каждом этапе добавляются дополнительные сайты биотина в комплекс «антитело/антиген». Этапы амплификации повторяют до тех пор, пока не будет достигнут подходящий уровень амплификации, после чего образец инкубируют в растворе, содержащем антитело второго этапа против биотина. Это второе антитело метят, например, ферментом, который можно применять для обнаружения присутствия комплекса «антитело/антиген» с помощью гистоэнзимологии с применением хромогенного субстрата. При подходящей амплификации можно получить конъюгат, видимый макроскопически.

[326] В другом известном способе иммунодетекции применяется методика иммуно-PCR (полимеразная цепная реакция). Метод PCR аналогичен методу Кантора вплоть до инкубации с биотинилированной ДНК, однако вместо применения нескольких циклов инкубации стрептавидина и биотинилированной ДНК, комплекс «ДНК/биотин/стрептавидин/антитело» вымывается буфером с низким pH или высоким содержанием солей, который высвобождает антитело. Полученный промыточный раствор затем применяют для проведения реакции PCR с подходящими праймерами и соответствующими контролями. По меньшей мере теоретически, огромные возможности амплификации и специфичность PCR могут быть использованы для обнаружения одной молекулы антигена.

A. ELISA

[327] Иммунологические анализы, в их самом простом и прямом смысле, представляют собой анализы связывания, включающие связывание между антителами и антигеном. Некоторыми предпочтительными иммунологическими анализами являются различные типы твердофазных иммуноферментных анализов (ELISA) и радиоиммунологических анализов (RIA), известных в данной области техники. Также особенно полезным является иммуногистохимическое обнаружение с применением срезов тканей. Однако следует понимать, что обнаружение не ограничивается такими методами, и также можно применять вестерн-блоттинг, дот-блоттинг, FACS-анализ и т.п.

[328] В одном иллюстративном ELISA антитела по данному изобретению иммобилизируют на выбранной поверхности, проявляющей аффинность к белкам, такой как лунка в полистироловом микротитрационном планшете. Затем в лунки можно добавить тестируемую композицию, предположительно содержащую раковые клетки, связанные с DDR1. После связывания и промывки для удаления неспецифически связанных иммунных комплексов можно обнаружить связанный антиген. Обнаружение может быть достигнуто путем добавления другого антитела анти-DDR1, связанного с обнаруживаемой меткой.

Этот тип анализа ELISA представляет собой простой «сэндвич-ELISA». Обнаружение также может быть достигнуто путем добавления второго антитела анти-DDR1 с последующим добавлением третьего антитела, обладающего аффинностью связывания со вторым антителом, причем третье антитело связывается с обнаруживаемой меткой.

[329] В другом типом ELISA образцы с подозрением на содержание раковых клеток, связанных с DDR1, иммобилизуют на поверхности лунки, а затем приводят в контакт с антителами анти-DDR1 по данному изобретению. После связывания и промывки для удаления неспецифически связанных иммунных комплексов обнаруживают связанные антитела анти-DDR1. Когда исходные антитела анти-DDR1 связаны с обнаруживаемой меткой, иммунные комплексы могут быть обнаружены напрямую. Опять же, иммунные комплексы могут быть обнаружены с применением второго антитела, обладающего аффинностью связывания с первым антителом анти-DDR1, при этом второе антитело может быть связано с обнаруживаемой меткой.

[330] Независимо от применяемого формата, анализы ELISA имеют определенные общие характеристики, такие как покрытие, инкубация и связывание, промывка для удаления неспецифически связанных видов и обнаружение связанных иммунных комплексов. Указанные характеристики описаны ниже.

[331] При покрытии планшета антигеном или антителом лунки планшета обычно инкубируют с раствором антигена или антитела либо в течение ночи, либо в течение определенного периода времени. Затем лунки планшета промывают для удаления не полностью адсорбированного материала. Любые оставшиеся доступные поверхности лунок затем «покрывают» неспецифическим белком, антигенно нейтральным по отношению к тестируемым антисывороткам. К ним относятся бычий сывороточный альбумин (BSA), казеин или растворы сухого молока. Покрытие позволяет блокировать сайты неспецифической адсорбции на иммобилизующей поверхности и, таким образом, снижает фон, вызванный неспецифическим связыванием антисывороток с поверхностью.

[332] В ELISA, вероятно, более предпочтительным является применение средств вторичной или третичной детекции, а не прямой процедуры. Таким образом, после связывания белка или антитела с лункой, покрытия нереактивным материалом для снижения фона и промывки для удаления несвязавшегося материала иммобилизующая поверхность контактирует с тестируемым биологическим образцом в условиях, эффективных для образования иммунного комплекса (антиген/антитело). Затем для обнаружения иммунного комплекса требуется меченый вторичный связывающий лиганд или антитело и вторичный связывающий лиганд или антитело в сочетании с меченым третичным антителом или третьим связывающим лигандом.

[333] Фраза «в условиях, эффективных для образования иммунного комплекса (антиген/антитело)» означает, что условия предпочтительно включают разведение антигенов и/или антител растворами, такими как BSA, бычий гамма-глобулин (BGG) или фосфатно-солевой буфер (PBS)/Tween. Эти добавленные агенты также способствуют снижению неспецифического фона.

[334] Термин «подходящие» условия также означает, что инкубация проводится при температуре или в течение периода времени, достаточных для обеспечения эффективного связывания. Этапы инкубации обычно длятся от около 1 до 2-4 часов или около того при температуре предпочтительно порядка от 25°C до 27°C или могут длиться в течение ночи при температуре около 4 °C.

[335] После всех этапов инкубации в ELISA контактирующую поверхность промывают, чтобы удалить несвязавшийся материал. Предпочтительная процедура промывки включает промывание раствором, таким как PBS/Tween, или боратным буфером. После образования специфических иммунных комплексов между тестируемым образцом и первоначально связанным материалом и последующей промывкой можно определить наличие даже незначительных количеств иммунных комплексов.

[336] Чтобы обеспечить средства обнаружения, второе или третье антитело будет иметь ассоциированную метку, позволяющую осуществлять обнаружение. Предпочтительно, чтобы это был фермент, вызывающий окрашивание при инкубации с подходящим хромогенным субстратом. Так, например, желателен приводить в контакт или инкубировать первый и второй иммунные комплексы с антителами, конъюгированными с уреазой, глюкозооксидазой, щелочной фосфатазой или пероксидазой водорода, в течение периода времени и в условиях, которые благоприятствуют развитию дальнейшего образования иммунных комплексов (например, инкубация в течение 2 часов при комнатной температуре в растворе, содержащем PBS, таком как PBS-Tween).

[337] После инкубации с меченым антителом и последующей промывки для удаления несвязавшегося материала, количество метки определяется количественно, например, путем инкубации с хромогенным субстратом, таким как мочевины и бромкрезоловый пурпурный или 2,2'-азино-ди-(3-этил-бензтиазолин-6-сульфоукислота (ABTS) или H₂O₂, в случае пероксидазы в качестве ферментной метки. Затем проводят количественную оценку путем измерения степени генерируемого цвета, например, с помощью спектрофотометра видимого спектра.

В. Вестерн-блот

[338] Вестерн-блот (в альтернативном варианте - белковый иммуоблот) представляет собой аналитический метод, применяемый для обнаружения специфических белков в данном образце гомогената или экстракта ткани. Этот метод использует гель-электрофорез для разделения нативных или денатурированных белков по длине полипептида (условия денатурации) или по трехмерной структуре белка (условия нативного/неденатурирующего действия). Затем белки переносят на мембрану (обычно из нитроцеллюлозы или PVDF), где их анализируют (детектируют) с применением антител, специфичных к целевому белку.

[339] Образцы могут быть взяты из цельной ткани или из клеточной культуры. В большинстве случаев твердые ткани сначала разрушают механически с помощью блендера (для больших объемов образца), с помощью гомогенизатора (меньшие объемы) или с помощью ультразвука. Клетки также могут быть разрушены одним из вышеперечисленных

механических способов. Однако следует отметить, что источником белка могут быть бактерии, вирусы или образцы из окружающей среды, поэтому Вестерн-блоттинг не ограничивается только клеточными исследованиями. Для стимулирования лизиса клеток и растворения белков могут быть применены различные детергенты, соли и буферы. Чтобы предотвратить расщепление образца его собственными ферментами, часто добавляют ингибиторы протеазы и фосфатазы. Подготовку тканей часто проводят при низких температурах, чтобы избежать денатурации белка.

[340] Белки образца разделяют с помощью гель-электрофореза. Разделение белков может осуществляться по изоэлектрической точке (pI), молекулярной массе, электрическому заряду или комбинации этих факторов. Характер разделения зависит от обработки образца и природы геля. Это очень удобный способ определения белка. Также можно применять двумерный (2-D) гель, который распределяет белки из одного образца в двух измерениях. Белки разделяются в соответствии с изоэлектрической точкой (pI, при которой они имеют нейтральный суммарный заряд) в первом измерении и в соответствии с их молекулярной массой во втором измерении.

[341] Чтобы сделать белки доступными для обнаружения антителами, их перемещают из геля на мембрану из нитроцеллюлозы или поливинилидендифторида (PVDF). Мембрану помещают поверх геля, а поверх нее кладут стопку фильтровальной бумаги. Вся стопку помещают в буферный раствор, который под действием капиллярных сил движется вверх по бумаге, увлекая за собой белки. Другой способ переноса белков называется электроблоттингом и использует электрический ток для переноса белков из геля на мембрану из PVDF или нитроцеллюлозы. Белки перемещаются изнутри геля на мембрану, сохраняя при этом организацию, которую они имели внутри геля. В результате этого процесса блоттинга белки экспонируются на тонком поверхностном слое для обнаружения (см. ниже). Обе разновидности мембран выбирают из-за их неспецифических свойств связывания белков (т.е. они одинаково хорошо связывают все белки). Связывание с белком основано на гидрофобных взаимодействиях, а также на заряженных взаимодействиях между мембраной и белком. Мембраны из нитроцеллюлозы дешевле, чем PVDF, и гораздо более хрупкие, а также плохо выдерживают повторные измерения. Равномерность и общую эффективность переноса белка из геля на мембрану можно проверить, окрашивая мембрану красителями: бриллиантовый синий Кумасси или Понсо S. После переноса белки обнаруживают с применением меченых первичных антител или немеченых первичных антител с последующим непрямым обнаружением с применением меченого белка А или вторично меченых антител, связывающихся с Fc-областью первичных антител.

С. Иммуногистохимия

[342] В некоторых вариантах осуществления антитела по данному изобретению также можно применять в сочетании со свежемороженными и/или фиксированными формалином тканевыми блоками, залитыми в парафин, подготовленными для исследования с помощью иммуногистохимии (ИНС). Способ приготовления тканевых блоков из этих

образцов частиц успешно применялся в предыдущих исследованиях ИНС различных прогностических факторов и хорошо известен специалистам в данной области техники (Brown *et al.*, 1990; Abbondanzo *et al.*, 1990; Allred *et al.*, 1990).

[343] Если описывать вкратце, замороженные срезы можно приготовить путем регидратации 50 нг замороженной «измельченной» ткани при комнатной температуре в фосфатно-солевом буфере (PBS) в небольших пластиковых капсулах; осаждения частиц центрифугированием; ресуспендирования их в вязкой среде для заливки (ОСТ); переворачивания капсулы и/или повторного осаждения центрифугированием; быстрой заморозки в изопентане -70°C ; разрезания пластиковой капсулы и/или удаления замороженного цилиндра ткани; закрепления тканевого цилиндра на держателе микротомы криостата; и/или вырезания из капсулы 25-50 серийных срезов. В альтернативном варианте, образцы цельной замороженной ткани могут быть применены для получения серийных срезов.

[344] Постоянные срезы можно приготовить аналогичным способом, включающим регидратацию образца 50 мг в пластиковой пробирке для микроцентрифуги; гранулирование; ресуспендирование в 10% формалине с фиксацией 4 часа; промывание/гранулирование; ресуспендирование в теплом 2,5% агаре; гранулирование; охлаждение в ледяной воде для затвердевания агара; удаление блока ткани/агара из пробирки; пропитка и/или заливка блока парафином; и/или получение до 50 постоянных серийных срезов. Опять же, образцы цельной ткани могут быть заменены.

D. Наборы для иммунодетекции

[345] В дополнительных вариантах осуществления данное изобретение относится к наборам для иммунодетекции для применения с описанными выше способами иммунодетекции. Поскольку антитела можно применять для обнаружения раковых клеток, связанных с DDR1, они могут быть включены в набор. Таким образом, наборы для иммунодетекции будут содержать в подходящем контейнере первое антитело, которое связывается с DDR1, и, необязательно, реагент для иммунодетекции.

[346] В некоторых вариантах осуществления антитело может быть предварительно связано с твердой подложкой, такой как матрица колонки и/или лунка микротитрационного планшета. Реагенты для иммунодетекции из набора могут принимать любую из множества форм, включая те обнаруживаемые метки, которые ассоциированы с данным антителом или связаны с ним. Также рассматриваются поддающиеся обнаружению метки, которые ассоциированы или прикреплены к вторичному связывающему лиганду. Примерами вторичных лигандов являются такие вторичные антитела, которые обладают аффинностью связывания с первым антителом.

[347] Дополнительные реагенты для иммунодетекции, подходящие для применения в настоящих наборах, включают двухкомпонентный реагент, который содержит вторичное антитело, обладающее аффинностью связывания с первым антителом, наряду с третьим антителом, обладающим аффинностью связывания со вторым антителом, при этом третье антитело связано с обнаруживаемой меткой. Как отмечалось выше, в данной области

техники известен ряд примерных меток, и все такие метки могут быть применены по данному изобретению.

[348] Наборы могут дополнительно содержать подходящую аликвотную композицию DDR1, как меченых, так и немеченых, которую можно применять для получения стандартной кривой для анализа обнаружения. Наборы могут содержать конъюгаты «антитело-метка» либо в полностью конъюгированной форме, либо в форме промежуточных соединений, либо в форме отдельных фрагментов, которые пользователь набора должен конъюгировать. Компоненты наборов могут быть упакованы как в водной среде, так и в лиофилизированной форме.

[349] Контейнеры в наборах, как правило, будут включать по меньшей мере один из следующих элементов: ампулу, пробирку, колбу, флакон, шприц или другие контейнеры, в которые может быть помещено антитело или, что предпочтительнее, подходящим образом аликвотировано. Наборы по данному изобретению также обычно включают средства для хранения антител, антигенов и любых других контейнеров с реагентами в ограниченном пространстве для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать пластиковые контейнеры, изготовленные методом литья под давлением или выдувным формованием, в которых хранятся нужные флаконы.

Е. Проточная цитометрия и FACS

[350] Антитела по данному изобретению также можно применять в проточной цитометрии или FACS. Проточная цитометрия представляет собой лазерную или импедансную технологию, применяемую во многих анализах обнаружения, включая подсчет клеток, сортировку клеток, обнаружение биомаркеров и белковую инженерию. Эта технология подвешивает клетки в потоке жидкости и пропускает их через электронный детекторный аппарат, что позволяет проводить одновременный многопараметрический анализ физических и химических характеристик до тысячи частиц в секунду. Проточная цитометрия обычно применяется для диагностики заболеваний, особенно рака крови, но также имеет множество других применений в фундаментальных исследованиях, клинической практике и клинических исследованиях.

[351] Флуоресцентная сортировка клеток (FACS) представляет собой специализированный тип цитометрии. Он обеспечивает способ сортировки гетерогенной смеси биологических клеток в два или большее количество контейнеров, по одной клетке за раз, на основе специфических характеристик светорассеяния и флуоресценции каждой клетки. В общем, технология включает в себя клеточную суспензию, увлекаемую в центр узкой, быстро текущей струей жидкости. Поток организован так, что имеется большое расстояние между клетками относительно их диаметра. Вибрационный механизм заставляет поток клеток разбиваться на отдельные капли. Непосредственно перед тем, как поток распадается на капли, он проходит через станцию измерения флуоресценции, где измеряется флуоресценция каждой клетки. Электрическое зарядное кольцо находится как раз в том месте, где струя разбивается на капли. Заряд размещается на кольце непосредственно перед измерением интенсивности флуоресценции, а противоположный

заряд захватывается каплей, когда она отрывается от потока. Затем заряженные капли падают через электростатическую систему отклонения, которая направляет капли в контейнеры в зависимости от их заряда.

[352] В некоторых вариантах осуществления, для применения в проточной цитометрии или FACS, антитела по данному изобретению метят флуорофорами, а затем позволяют им связываться с представляющими интерес клетками, которые анализируют в проточном цитометре или сортируют на приборе FACS.

VIII. Примеры

[353] Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления данного изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методики, описанные в следующих примерах, представляют собой методики, которые, как обнаружил автор изобретения, хорошо себя зарекомендовали при практической реализации данного изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как составляющие предпочтительные способы для его практической реализации. Однако специалистам в данной области техники в свете настоящего описания должно быть понятно, что в конкретных описанных вариантах осуществления можно сделать множество изменений и при этом получить такой же или схожий результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

Пример 1 - Материалы и способы

[354] **CRISPR KO.** DDR1 выбивали (knock-out) в M-WNT, AT-3 и E0771 с применением набора DDR1 sgRNA CRISPR/Cas9 All-in-One Lentivector (ABM; Cat: #K4331005 K4331005) в соответствии с инструкциями производителя. Если описывать коротко, упаковку лентивируса осуществляли путем совместной трансфекции клеток HEK293T вектором DDR1 KO и двумя вспомогательными векторами (psPAX2 и pMD2.G) с помощью Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Cat: #11668027). Через два дня супернатант, содержащий лентивирус, собирали и применяли для заражения целевых опухолевых клеток. Отдельные клоны отбирали и размножали после отбора антибиотиков. Геномную ДНК всех выбранных клонов KO экстрагировали и секвенировали для верификации желаемых мутаций. Последовательности sgPHK являются следующими: sgPHK1, AAGCAGTGATGGAGATG (SEQ ID NO: 303); sgPHK2, TGTGTTCCCAAAGAAG (SEQ ID NO: 304); sgPHK3, GACCATGCAGTTATCTG (SEQ ID NO: 305). В качестве контроля применяли закодированную последовательность sgPHK.

[355] **Вестерн-блоттинг.** Для приготовления клеточного лизата клетки лизировали буфером Лэммли. Концентрацию белка оценивали с помощью набора BCA Protein Assay Kit (Pierce, 23225). Затем белок анализировали с помощью SDS-PAGE и переносили на мембрану в соответствии с установленными протоколами. Первичные антитела: анти-DDR1 (разведение: 1:1000; CST, 5583S) и анти-GAPDH (разведение: 1:5000; CST, 2118S).

[356] Для сбора белка в кондиционированных средах, среды собирали и центрифугировали при 6000 об/мин с последующим пропусканием через фильтры с размером пор 0,45 мкм для удаления любого клеточного детрита. Среду анализировали на

SDS-PAGE с последующим иммуноблоттингом с антителом анти-DDR1 ECD (разведение: 1:1000; R&D, AF2396).

[357] **qRT-PCR.** Экстракцию РНК и RT-qPCR проводили, как описано ранее (Sun et al., 2018). Если описывать вкратце, систему обратной транскрипции ImProm-II (Promega, A3800) применяли для обратной транскрипции РНК, а мастер-микс Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, K0364) применяли для настройки PCR в реальном времени. Соответствующие праймеры получали с помощью программного обеспечения Primer Premier. Последовательности праймеров являются следующими:

Col1a2-F	GGTGAGCCTGGTCAAACGG (SEQ ID NO: 306)
Col1a2-R	ACTGTGTCCTTTCACGCCTTT (SEQ ID NO: 307)
Col12a1-F	AGGCAGAAGTTGACCCACCT (SEQ ID NO: 308)
Col12a1-R	CAGTGGTACTAGCTGCAAGGG (SEQ ID NO: 309)
мАктин-F	CAACGAGCGGTTCCGATG (SEQ ID NO: 310)
мАктин-R	GCCACAGGATTCCATACCCA (SEQ ID NO: 311)

[358] **МТТ.** Опухолевые клетки высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в течение указанного периода времени перед анализом. В день сбора в отдельные лунки добавляли раствор МТТ (3 мг/мл) и планшеты инкубировали в течение 1 часа. Затем среду удаляли, а пурпурный осадок растворяли в 100 мкл DMSO. Поглощение при 570 нм измеряли для отдельных лунок.

[359] **Миграция и инвазия опухолевых клеток.** Для миграции клеток, опухолевые клетки суспендировали в культуральной среде без сыворотки, а затем высевали на верхнюю часть камеры transwell. Среду с 10% FBS помещали на дно камеры. Клетки культивировали в течение 12 часов перед анализом.

[360] Для инвазии клеток, на вставки наносили матрицу matrigel (Corning, 354483) в соответствии с инструкциями производителя и инкубировали при 37 °С в течение 30 минут. Опухолевые клетки высевали на верхнюю часть камеры вставок с 10%-ной средой, содержащей FBS на дне камеры. Затем клетки инкубировали при 37°С в течение 20 часов. Клетки на верхней стороне верхней части камеры осторожно удаляли, а клетки на дне верхней части камеры окрашивали кристаллическим фиолетовым и подсчитывали шесть случайных полей с помощью стандартного микроскопа.

[361] **Лечение мышей и исследование опухолей.** Все эксперименты на животных были одобрены Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию в Университете Джорджа Вашингтона. Для исследования опухолей использовали 8-недельных мышей дикого типа C57BL/6 (Jackson Lab, 000664), Rag1^{-/-} (Jackson Lab, 002216) или бестимусных мышей (Jackson Lab, 002019). Клетки E0771, AT-3 и M-Wnt вводили в жировую ткань молочной железы мышей в дозе 5×10⁵, 2×10⁵ и 2×10⁵ клеток на инокулят соответственно в объеме 100μл. Объемы опухоли (0,5 x длина x ширина²) измеряли штангенциркулем в указанные дни. После сбора опухоли, опухоли взвешивали и образцы применяли для иммунофенотипирования и ИНС.

[362] Для анализа трансплантации опухоли опухолевые клетки сначала инокулировали мышам Rag1^{-/-}. Когда объем опухоли достигал приблизительно 200~300 мм³ (обычно через 20 дней после инокуляции), мышам дикого типа C57BL/6 трансплантировали 60 мг опухолевого органоида. Образцы опухоли собирали на день 12 для иммуноокрашивания.

[363] Для эксперимента по повторному введению опухолевых клеток, мышам WT C57BL/6 сначала вводили только 0,5 миллиона DDR1 KO E0771 или PBS в одну сторону (паховую) жирового тела молочной железы. Через 30 дней тем же мышам инокулировали 0,5 млн опухолевых клеток DDR1 WT E0771 с обеих сторон жирового тела молочной железы. Объемы опухоли измеряли, как указано выше.

[364] Для лечения антителом DDR1 *in vivo*, как контрольные IgG собственного изготовления, так и антитела анти-huDDR1 ECD вводили локально в опухоль в дозе 10 мг/кг через день после того, как размер превышал 100 мм³, до конца эксперимента.

[365] **Децеллюляризация.** Клетки E0771 высевали во вставки с размером пор 5 мкм (Costar, Corning Inc., 3422) по 2000 клеток на вставку и культивировали в среде DMEM+10% FBS+1% PS в течение 2 дней. Полученный ECM из клеток DDR1 WT или KO промывали PBS и децеллюляризировали путем инкубации в течение 5 мин при 37°C в PBS, содержащем 0,5% Triton X-100 и 20 mM NH₄OH. Децеллюляризованный ECM промывали 3 раза PBS, затем 3 раза промывали дистиллированной водой и сразу же применяли в экспериментах по миграции Т-клеток.

[366] **Анализ выделения и миграции CD8⁺ Т-клеток *in vitro*.** CD8⁺ Т-клетки выделяли из спленоцитов C57BL/6-наивных мышей с помощью набора EasySep™ для CD8⁺ отрицательного выделения у мышей (Stemcell, 19853) в соответствии с руководством производителя. Анализ миграции CD8⁺ Т-клеток проводили с поликарбонатными мембранами диаметром 6,5 мм и вставками с размером пор 5 мкм (Costar, Corning Inc., 3422). 0,5 миллиона очищенных CD8⁺ Т-клеток добавляли в верхнюю камеру и оставляли мигрировать при 37°C в течение 2 часов в присутствии рекомбинантного CCL21 (100 нг/мл, системы R&D, 4576C025CF) вместе с кондиционированной опухолью средой на дне камеры. CD8⁺ Т-клетки, которые мигрировали в нижнюю камеру, определяли количественно с помощью проточной цитометрии. Для нейтрализации антитела huDDR1, антитело сначала совместно инкубировали с кондиционированной средой при 37°C в течение 1 часа, а затем следовали процедуре, описанной выше.

[367] **Генерация второй гармоники и иммунофлуоресценция.** Опухолевую ткань молочной железы мыши помещали и сохраняли в соединении Optimal Cutting Temperature (OCT) при -80 °C. Перед нарезанием бразцы выдерживали при температуре -20 °C по меньшей мере 2 ч и нарезали срезы толщиной 20 мкм с помощью криостата. Предметные стекла оттаивали и инкубировали при 37°C в течение 30 минут, а затем переносили в кипящий раствор для демаскирования антигена (Vector labs, H-3300) на 10 минут. Образцы инкубировали с первичными антителами CD3ε (BD, 553057) и вторичными антителами Alexa-488 (Life Technologies). Каждый срез опухоли фиксировали с помощью среды

luminmount-G (VWR) на покровное стекло микроскопа (№ 1.5).

[368] Все образцы визуализировали с помощью многофотонного конфокального микроскопа Leica TCS SP8, и в ходе всех экспериментов применяли масляный иммерсионный объектив HC PL Apo, NA 0,7 с увеличением 20x.

[369] Длина волны возбуждения была настроена на 840 нм (Erikson et al., 2007), а для регистрации сигнала SHG коллагена применяли узкополосный эмиссионный фильтр 420 ± 5 нм. Сигнал SHG генерируется, когда два фотона падающего света взаимодействуют с нецентросимметричной структурой коллагеновых волокон, что приводит к тому, что результирующие фотоны имеют половину длины волны падающих фотонов. Изображения размером 1024×1024 пикселей получали с помощью программного обеспечения LAS X. Измерения коллагена осуществляли с помощью программного обеспечения CT Fire (доступно бесплатно по адресу loci.wisc.edu/software/ctfire). Для анализа коллагена из края опухоли брали образец площадью 60 мкм от границы опухоли.

[370] **Иммуногистохимическое окрашивание (ИНС).** Ткани опухоли молочной железы мыши фиксировали 10% забуференным формалином (Fisher Scientific, 23-427098) при 4 °C в течение ночи. Образцы фиксированных опухолей заливали парафином и разрезали на срезы толщиной 4 мкм для окрашивания. Образцы депарафинизировали и регидратировали в PBS. Срезы кипятили в демаскирующем растворе антигена (Vector labs, H-3300) в течение 20 мин, а затем блокировали 10% нормальной крупяной сывороткой в PBS при комнатной температуре в течение 1 ч. Первичные антитела к CD8 (Biorbyt, orb10325) и CD4 (Sino Biological Inc., 50134-R001) инкубировали при 4°C в течение ночи. Для обнаружения первичных антител применяли систему обнаружения пероксидазы ABC (Vector labs, PK-6105) с DAB (Vector labs, SK-4105) в качестве субстрата в соответствии с инструкциями производителя.

[371] **Деплетирование и адоптивный перенос CD8⁺ Т-клеток.** Для деплетирования CD8⁺ Т-клеток, мышам C57BL/6 внутрибрюшинно вводили 200 мкг/мышь антимышиного CD8 (клон 2.43, BioxCel, BE0061) или изотипического контроля IgG2b (клон LTF-2, BioxCel, BE0090) за два дня до инокуляции опухоли. а потом два раза в неделю.

[372] Для адоптивного переноса CD8⁺ Т-клеток, очищенные CD8⁺ Т-клетки (>90%) переносили мышам Rag1^{-/-}, несущим опухоль молочной железы E0771, через 17 дней после инокуляции опухоли в концентрации 5×10^6 клеток/мышь.

[373] **Окрашивание Picro Sirius красным (Picro-Sirius Red).** Фиксированные образцы опухоли молочной железы готовили и разрезали, как описано ранее (Sun et al., 2018). Если описывать вкратце, опухолевые ткани, залитые парафином, разрезали на срезы размером 4 мкм и окрашивали с помощью набора Picro Sirius Red Stain (Abcam, Cat: #ab150681). Срезы депарафинизировали и гидратировали в дистиллированной воде, на предметные стекла наносили красный раствор Picro-Sirius Red на 1 час. Затем срезы промывали раствором уксусной кислоты и обезвоживали в абсолютном спирте. Затем фиксированные срезы исследовали под стандартным микроскопом, а положительные

сигналы коллагеновых волокон определяли количественно с помощью программного обеспечения Image J.

[374] **ELISA.** Коллаген типа I разбавляли в PBS до концентрации 50 мкг/мл и добавляли в 96-луночные планшеты для микротитрования (50 мкл/лунку). Планшеты герметизировали и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре и трижды промывали промывочным буфером (R&D, WA126), а затем блокировали с применением 200 мкл разбавителя для реагентов (R&D, DY995) в течение 1 часа. После трехкратной промывки в планшет добавляли 100 мкл кондиционированной среды или рекомбинантного ECD (применяемого в качестве стандартов, Sino Biological, 10730-H08H) на 2 часа при комнатной температуре. После трехкратной промывки добавляли 100 мкл разведенного N-концевого антитела анти-DDR1 (1:500, R&D, AF2396) и инкубировали в течение 2 часов. После реакции с биотин-конъюгированным антителом в течение 1 часа в каждую лунку добавляли стрептавидин-HRP в разведении 1:2000 (R&D, 893975) и инкубировали в течение 20 минут в темноте. Добавляли 100 мкл раствора субстрата (R&D, DY999) и инкубировали еще 20 минут. После добавления 50 мкл стоп-раствора (R&D, DY994) планшет анализировали в считывателе ELISA при 450 нм.

[375] **Проточная цитометрия.** Клетки окрашивали на жизнеспособность с применением Ghost DyeTM Violet 450 (Tonbo Biosciences, 13-0863-T100) в разведении 1:1000 в PBS в течение 20 мин при 4°C в темноте с последующей промывкой PBS. Образцы блокировали анти-CD16/32 в разведении 1:100 (клон 2.4G2, Tonbo Biosciences, 70-0161-U100). Антитела инкубировали 30 мин при 4 °C в темноте. Применяли следующие коммерческие антитела: CD45-BV 645 (Invitrogen, 64-0451-82), CD3-eflour 660 (eBiosciences, 50-0032-82), CD4-FITC (eBiosciences, 35-0042-U500), CD8-APC-CyTM7 (BD, 557654).), CD44-BV 786 (Biolegend, 103059), CD62L-Pacific Blue (Biolegend, 104424). Данные получали на проточных цитометрах BD FACSCelesta и анализировали с помощью программного обеспечения FACSDiva или FlowJo (BD).

[376] **Сканирующая электронная микроскопия.** Клетки E0771, как WT, так и DDR1 KO, высевали с плотностью $0,1 \times 10^6$ и культивировали в течение двух дней в DMEM (10% FBS) для равномерного прилипания к поверхности покровных стекол. Затем клетки фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида и 1% раствором параформальдегида с последующим промыванием OsO₄ и водой. Затем образцы последовательно дегидратировали спиртовым градиентом и сушили в критической точке. После установки на SEM-заглушки покровные стекла покрывали иридием и исследовали под сканирующим электронным микроскопом (модель FEI) с детектором ETD при времени пребывания 10 мс и увеличении 12000.

[377] **Скрининг и генерирование моноклональных антител (mAb) к DDR1.** Белок внеклеточного домена (ECD) DDR1 человека (Sino Biological, 10730-H08H) применяли для иммунизации кроликов и получения моноклональных антител анти-huDDR1 с помощью ранее описанного метода (Gui et al., 2019b). Если описывать вкратце, новозеландским белым кроликам вводили внутривенно (в/вр) 0,5 мг рекомбинантного

белка DDR1 ECD человека для первичной иммунизации и серии из 3-4 бустеров после первичной иммунизации с интервалом в 3 недели. В-клетки памяти выделяли из РВМС, и отдельные В-клетки культивировали в течение 10-14 дней в 96-луночных планшетах для культивирования клеток с целью продукции антител. Супернатанты клеточных культур анализировали на связывание DDR1 с помощью ELISA, и положительные совпадения отбирали для клонирования гена антитела и анализа последовательности.

[378] Клетки из лунок с положительными культурами В-клеток лизировали, выделяли общую РНК и синтезировали кДНК с применением обратной транскриптазы II (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя. Последовательности ДНК переменных областей антител как из тяжелых цепей, так и из легких цепей амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) с помощью набора сконструированных праймеров и клонировали в вектор для секвенирования переменных областей каждого антитела. Клонированные переменные последовательности тяжелой и легкой цепей антитела встраивали в экспрессионный вектор млекопитающего в виде слияния с константной областью тяжелой и легкой каппа-цепи IgG1, соответственно, для экспрессии полноразмерного рекомбинантного антитела в клетках почки эмбриона человека (HEK) 293 (HEK293F) (Life science Technologies). Моноклональные антитела очищали из среды для культивирования клеток HEK293 с применением аффинной смолы с белком-A до степени чистоты >95%, с помощью способа, описанного ранее (O'Donnell et al., 2019). Очищенные антитела подвергали скринингу на нейтрализующую функцию в анализах клеточных культур и противоопухолевую активность в моделях опухолей мышей.

[379] **Статистика.** Для сравнения средних различий между двумя группами применяли критерий Стьюдента. Для сравнения средних различий между несколькими группами применяли однофакторный анализ (ANOVA) и апостериорное множественное сравнение. Кривые выживания анализировали с помощью логарифмического рангового анализа (Mantel-Cox). Корреляционный анализ Пирсона и всю остальную статистику выполняли в Graphpad Prism. $P < 0,05$ считалось достоверно значимым. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM.

Пример 2. Результаты

[380] Авторы изобретения специфически делетировали *Ddr1* во множественных опухолевых клетках молочной железы мыши с базальноподобными/TNBC характеристиками (E0771, AT-3 и M-Wnt; **Фиг. 1a, Фиг. 5b-d**). Нокаутные (КО) опухолевые клетки не проявляли каких-либо заметных дефектов клеточной пролиферации, миграции или инвазии *in vitro* (**Фиг. 1b-d, Фиг. 5e-f**). Кроме того, опухоли *Ddr1*-КО у иммунодефицитных хозяев росли с той же скоростью, что и у контрольных мышей дикого типа (WT) (**Фиг. 1e и Фиг. 5g**). Напротив, опухоли *Ddr1*-КО у иммунокомпетентного хозяина (C57BL/6) полностью регрессировали через 2 недели после инокуляции во всех трех протестированных моделях опухоли молочной железы (**Фиг. 1f-h**). Этот дефект роста опухолей КО у иммунокомпетентных хозяев по существу не облегчался трансплантацией увеличивающихся количеств опухолевых клеток КО ($0,5-20 \times 10^6$ клеток на инокулят, **Фиг.**

5h), а недостаточность роста не устранялась начальным ростом у иммунодефицитных хозяев (*Rag1^{-/-}*) и последующей ретрансплантацией интактным иммунокомпетентным мышам (Фиг. 1i-j). Кроме того, совместная трансплантация с применением смесей равных количеств родительских опухолевых клеток WT и КО приводила к устойчивому росту опухоли у иммунокомпетентных хозяев (Фиг. 5i-k), что указывает на доминирующее действие опухолевого DDR1. Когда опухолевые клетки дикого типа вводили иммунокомпетентным мышам, которым ранее инокулировали опухолевые клетки КО, либо в той же, либо в контралатеральной молочной железе, заметного роста повторно введенных родительских опухолей не наблюдалось (Фиг. 1k-m). Это указывает на то, что опухолевые клетки КО могут вакцинировать хозяев против опухолей WT. В совокупности эти данные позволяют предположить, что опухолевый DDR1 играет особую роль в росте опухоли у иммунокомпетентного хозяина.

[381] Иммуногистохимия (ИНС) продемонстрировала, что CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки были ограничены периферической областью родительских опухолей после ретрансплантации от иммунодефицитных к иммунокомпетентным хозяевам (Фиг. 2a). Напротив, эти лимфоциты в изобилии присутствовали как на краю, так и в центре опухолей *Ddr1*-КО (Фиг. 2a). В подтверждение, проточная цитометрия продемонстрировала, что общее количество инфильтрирующих опухоль CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток (нормализованное по массе опухоли) было существенно повышено в группе опухоли с нокаутом по сравнению с родительским контролем (Фиг. 2b-c). Интерферон (IFN)-γ-продуцирующие клетки CD8⁺ и CD4⁺, также были более многочисленны в опухолях КО по сравнению с аналогами дикого типа (Фиг. 2d-e). Кроме того, эффекторные и хелперные Т-клетки были более сильно активированы (CD44^{high}CD62L^{high}) в опухолях КО по сравнению с их родительскими контролями (Фиг. 2f-g). Однако при нормализации с соответствующими общими количествами Т-клеток, КО и родительские контроли не проявляли различий в процентном содержании CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток, которые являются положительными в отношении Ki67 (Фиг. 6a-b), IFNγ или Gzmb (Фиг. 2c-d). Это указывает на то, что опухолевый DDR1, вероятно, обеспечивает исключение опухолью Т-клеток без ослабления их пролиферации или противоопухолевой активности *как таковой*.

[382] Чтобы установить роль опухолевого DDR1 в противодействии противоопухолевому иммунитету, авторы изобретения лишили иммунокомпетентных мышей CD8⁺ Т-клеток путем нейтрализации их антителами. Опухоли *Ddr1*-КО росли так же интенсивно, как и их изогенные контроли WT, у хозяев с деплетированными CD8⁺ клетками (Фиг. 2h-j, Фиг. 2e-f), подобно данным, обнаруженным авторами изобретения, у иммунодефицитных хозяев (Фиг. 1e). В ответном эксперименте авторы изобретения адоптивно перенесли очищенные CD8⁺ Т-клетки иммунодефицитным мышам и сравнили рост родительских опухолей и опухолей КО. В отличие от иммунодефицитных хозяев, получавших имитацию лечения, мыши с трансплантированными CD8⁺ Т-клетками демонстрировали опухоли КО, которые были значительно меньше чем родительские опухоли (Фиг. 2k-m, Фиг. 6g). В совокупности эти результаты подтверждают мнение о том,

что, хотя опухолевый DDR1 и необязателен для внутреннего роста опухолей молочной железы, он играет важную роль в сдерживании инфильтрации Т-клеток.

[383] Внутриопухолевый перенос Т-клеток представляет собой высокодинамичный многоэтапный процесс, который включает экстравазацию через кровеносные сосуды, индуцированный опухолью хемотаксис и преодоление физического барьера на основе ECM (Slaney *et al.*, 2014; Sackstein *et al.*, 2017; Ager *et al.*, 2016). Гистологический анализ на основе CD31 не выявил каких-либо значительных иммуноваскулярных изменений между опухолями WT и KO (данные не приведены), а секвенирование РНК не продемонстрировало каких-либо различий в мРНК уровнях генов Т-клеточного хоуминга или генов, кодирующих хемокины, что может объяснить усиленную иммунную инфильтрацию в группе *Ddr1*-KO (**Фиг. 6h-i**). Учитывая аффинность DDR1 к коллагену, авторы изобретения попытались протестировать альтернативную модель, посредством которой взаимодействие опухолевого DDR1 с коллагеном делает опухоли менее проницаемыми для иммунных клеток. С этой целью авторы изобретения сначала определили, зависит ли иммуномодулирующая функция DDR1 от его киназной активности, путем введения следующих конструкций в опухолевые клетки *Ddr1*-KO (**Фиг. 3a**): (1) пустой вектор (EV), (2) полноразмерный мышинный DDR1 (FL), (3) ΔKD, укороченный DDR1 без внутриклеточного киназного домена KD, но сохраняющий свой трансмембранный (TM) домен, и (4) только ECD. Дефицит роста опухолей KO у иммунокомпетентных хозяев восстанавливался в аналогичной степени с помощью эктопически экспрессированного FL DDR1 и двух укороченных мутантов, ΔKD и ECD (**Фиг. 3a**). Дальнейший анализ делеций демонстрирует, что N-концевой домен гомологии дискоидина (DS, **Фиг. 3b**), который отвечает за связывание коллагена, полностью восстанавливал опухолевый рост клеток DDR1 KO (**Фиг. 7a-b**). В совокупности эти данные ясно указывают на то, что опухолевый DDR1 подавляет противоопухолевый иммунитет независимым от киназ образом.

[384] Основываясь на кристаллической структуре домена коллагена-DS (Leitinger, 2014; Carafoli *et al.*, 2012; Carafoli & Hohenester, 2013), авторы изобретения мутировали ряд ключевых аминокислотных остатков, связывающих коллаген (W54, T58, D71, K113, E114 и S176 в мышинном DDR1 соответствуют W53, T57, D70, K112, E113 и S175 в человеческом DDR1 соответственно; **Фиг. 3b**). Авторы изобретения также мутировали R33, остаток, удаленный от коллагеносвязывающего кармана и ответственный за трансмембранную передачу сигналов DDR1. Аффинность WT и мутантного ECD относительно связывания коллагена была подтверждена с помощью ELISA и co-IP *in vitro* (**Фиг. 3c**, **Фиг. 7c**), и их способность останавливать рост опухоли KO оценивали *in vivo* (**Фиг. 3d-k**). Как и ожидалось, R33A, который расположен вне коллагенсвязывающей области ECD, сохранил свою способность связываться с коллагеном и поддерживать рост опухоли (10/10 опухолей для WT ECD и 6/6 для R33A, **Фиг. 3c-e**). Напротив, W54A полностью утратил способность связываться с коллагеном *in vitro* и поддерживать рост опухоли (0/6 сайтов, **Фиг. 3f**). Мутанты D71A, K113A, E114A и S176A сохраняли умеренную коллагенсвязывающую

активность WT ECD (**Фиг. 3с**) и вызывали рост опухоли у части хозяев (2/6, 1/6, 3/6 и 1/6 опухолей, соответственно, **Фиг. 3h-k**). С другой стороны, T58A сохранял примерно 50% WT коллагенсвязывающей аффинности (**Фиг. 3с**) и 100% возникновение опухоли (6/6), но демонстрировал более медленную скорость роста опухоли, чем WT (**Фиг. 3g**). В контексте сильной корреляции коллагенсвязывающей аффинности аффинности и способности мутантов ECD к спасению опухоли авторы изобретения пришли к выводу, что связывание коллагена необходимо для ECD, чтобы препятствовать противоопухолевому иммунитету.

[385] Тот факт, что одного ectopического DDR1 ECD достаточно для поддержания роста опухоли у иммунокомпетентных хозяев, напоминает более ранние сообщения об отщеплении ECD от полноразмерного DDR1 (Vogel, 2020; Flynn *et al.*, 2010; Shitomi *et al.*, 2015), хотя биологическое значение отщепления ECD не было известно. В подтверждение этого авторы изобретения обнаружили ECD в среде, кондиционированной клетками родительской опухоли молочной железы мыши и подмножеством клеточных линий рака молочной железы человека (**Фиг. 7d**). Опубликованные биохимические исследования *in vitro* демонстрируют, что рекомбинантный ECD DDR1 может реконструировать структуру коллагеновых волокон (Flynn *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2007). В подтверждение этому сканирующая электронная микроскопия (SEM) продемонстрировала, что опухолевые клетки DDR1-WT, культивированные *in vitro*, ассоциировались с более заметной сетью ECM по сравнению с их аналогами KO (**Фиг. 3l**). Чтобы определить функциональность ECM, ассоциированного с опухолевыми клетками, авторы изобретения децеллюляризировали родительские и нокаутированные опухолевые клетки (Chen *et al.*, 2007) (Chen *et al.*, 2007) и оценили пенетрантность очищенных CD8⁺ Т-клеток через децеллюляризованный ECM в анализе Transwell (**Фиг. 3m**). ECM, полученный из родительской опухоли, значительно снижал миграцию Т-клеток, которая была смягчена в ECM, децеллюляризованном из опухолей *Ddr1*-KO (**Фиг. 3m**). Эффект, препятствующий Т-клеткам, был восстановлен до исходного уровня в ECM, происходящем из ECD-экспрессирующих опухолей KO (**Фиг. 3m**). Для того, чтобы подтвердить данные *in vitro*, авторы изобретения использовали микроскопию генерации второй гармоники (SHG) для непосредственной визуализации коллагеновых волокон в родительских опухолях и опухолях *Ddr1*-KO, ретрансплантированных от иммунодефицитных к иммунокомпетентным хозяевам. Коллагеновые волокна на краю родительских опухолей имели тенденцию ориентироваться параллельно краю опухоли (обозначены блок-стрелками, верхние панели на **Фиг. 3n**), напоминая защитную линию от инвазии опухолевых клеток. Как и ожидалось, CD3⁺ Т-клетки из тех же исходных опухолей были ограничены краем опухоли (**Фиг. 3n**). Напротив, коллагеновые волокна в опухолях KO были относительно короткими и неупорядоченными (**Фиг. 3n**). Соответственно, иммунные клетки проникали глубже в опухоли KO по сравнению с опухолями WT (**Фиг. 3n**). При измерении выравнивания волокон коэффициент вариации угла для коллагеновых волокон был значительно выше для опухолей KO по сравнению с родительскими опухолями (**Фиг. 3o**). Кроме того, средняя длина коллагеновых волокон в опухолях KO была значительно

короче, чем у родительских опухолях (**Фиг. 3p**). В подтверждение DDR1-зависимого ремоделирования коллагеновых волокон анализ путей данных секвенирования РНК из первичных опухолей *Ddr1*-WT и КО демонстрирует, что наиболее затронуты гены, участвующие в организации внеклеточного матрикса и коллагеновых фибрилл ($p < 1 \times 10^{-12}$, **Фиг. 7e**). В совокупности эти данные убедительно свидетельствуют о том, что ECD DDR1 помогает укрепить физический барьер на основе коллагена, препятствующий проникновению противоопухолевых иммунных клеток в микроокружение опухоли.

[386] Все современные низкомолекулярные ингибиторы DDR1, исследованные на предмет их терапевтического потенциала, нацелены на внутриклеточный киназный домен (Kothiwale *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015). Для того, чтобы эффективно нейтрализовать независимую от киназы активность ECD при блокировании инфильтрации иммунных клеток, авторы изобретения создали серию клонов моноклональных антител путем иммунизации кроликов рекомбинантным DDR1 (huDDR1) ECD человека и последующего выделения В-клеток памяти с антителами, как было описано ранее (Meng *et al.*, 2015; Gui *et al.*, 2019a). Для скрининга специфичных к huDDR1 нейтрализующих антител авторы изобретения эктопически экспрессировали huDDR1 в опухолевых клетках *Ddr1*-КО молочной железы мыши (**Фиг. 4a**). huDDR1 полностью восстановил дефект роста КО-опухолей мышей в организмах иммунокомпетентных хозяев (**Фиг. 4b, c**). С помощью анализа совместного культивирования *in vitro*, который оценивает влияние опухолевых клеток на миграцию Т-клеток (**Фиг. 8a**), авторы изобретения провели скрининг антител анти-huDDR1, которые могут эффективно нейтрализовать зависимое от huDDR1 вмешательство в миграцию Т-клеток (**Фиг. 8b**). Несколько основных нейтрализующих антител были дополнительно исследованы на их потенциал ингибирования опухоли *in vivo*. По сравнению с изотипическим контролем IgG введение антител анти-huDDR1 приводило к значительно более медленному росту опухолей, экспрессирующих huDDR1, снижению частоты возникновения опухоли и увеличению периода выживаемости хозяина без какого-либо заметного влияния на вес хозяина (**Фиг. 4d-f**, **Фиг. 8c-d**). Следует отметить, что введение такого же антитела иммунодефицитным хозяевам не приводило к какому-либо заметному ингибированию опухоли (**Фиг. 8e**), что свидетельствует о том, что указанное введение в первую очередь нейтрализует иммуноисключающую функцию DDR1. Микроскопия SHG демонстрирует, что опухоли, обработанные антителом анти-huDDR1, у иммунокомпетентных хозяев ассоциировались с менее выровненными, более короткими коллагеновыми волокнами и значительно усиленной противоопухолевой иммунной инфильтрацией (**Фиг. 4g-i**, **Фиг. 8f**). В совокупности, выводы авторов изобретения обеспечивают доказательство подхода с применением антитела анти-hDDR1 в качестве потенциальной противоопухолевой терапии.

[387] Применяя наборы данных TCGA RNA-seq и TIMER (Li *et al.*, 2018), общедоступный биоинформатический ресурс для оценки клинического воздействия корреляций опухолевого иммунитета, авторы изобретения обнаружили, что рак молочной железы демонстрирует обратную корреляцию между уровнями мРНК DDR1 и различными

сигнатурами генов противоопухолевого иммунитета, включая CD8, IFNG, GZMB и PRF1 (Фиг. 4j; Фиг. 8g-i). Следует отметить, что степень отрицательной корреляции, наблюдаемая для DDR1, сравнима с другими недавно идентифицированными ассоциированными с опухолью генами с иммуномодулирующими функциями (Pan *et al.*, 2018). Такая же корреляция наблюдалась в отдельной когорте образцов пациентов с TNBC, ранее не получавших лечения (n=37; Фиг. 4k-m), которые использовались для стратификации TNBC на основе фенотипа иммунного исключения (Grusso *et al.*, 2019). В совокупности, эти клинические корреляции убедительно свидетельствуют о том, что высокая экспрессия DDR1 ассоциируется с низкой инфильтрацией опухоли и низкой цитотоксической активностью CD8⁺ Т-клеток. Выясняя ранее неизученную, независимую от киназы функцию DDR1 в иницировании линии защиты от иммунного исключения (Фиг. 4n), это исследование дает информацию о разработке новых автономных терапевтических средств, нацеленных на активность DDR1 в ремоделировании ECM и блокаде противоопухолевого иммунитета. Авторы изобретения также предполагают, что их работа может помочь улучшить клинические результаты и эффективность современной иммунотерапии рака молочной железы и других типов фиброзного рака, таких как рак поджелудочной железы.

[388] Генерирование и клонирование моноклональных антител, нацеленных на DDR1 человека. Моноклональные антитела (mAb) против DDR1 получали путем иммунизации кроликов и выделения антител из отдельных В-клеток. Белок DDR1 человека применяли для получения антител и экспрессировали в клетках HEK293. Белок имел метку 6XHIS и был очищен до чистоты >95% с применением смолы Ni-NTA (Sino Biologicals). Кроликов (NZW, Charles River) иммунизировали рекомбинантно полученным DDR1, применяя стандартную процедуру иммунизации с 3 бустерными инъекциями после первичной примиряющей иммунизации. Титр анти-DDR1 сыворотки определяли серией разведений сыворотки в ELISA для связывания с белком DDR1, нанесенным на 96-луночные планшеты (планшеты max-sorb, Nunc). Когда титр сыворотки достигал >10⁶, у иммунизированных кроликов собирали образцы периферической крови для выделения В-клеток из свежеприготовленных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) с применением прибора для сортировки клеток с помощью флуоресценции (FACS) (BD FACSAria™ III, BD Biosciences). Отсортированные отдельные В-клетки собирали в 96-луночные планшеты для клеточных культур (Fisher Scientific) и культивировали в течение 7-10 дней в инкубаторе для клеточных культур с 5% CO₂ и влажностью 95% в культуральной среде RPMI с 10% FBS и добавленными цитокинами. Антитела в культуральных супернатантах анализировали на связывание DDR1. Клетки из положительных лунок лизировали, выделяли общую РНК и синтезировали кДНК с применением обратной транскриптазы II (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя. Последовательности ДНК переменных областей антител как из тяжелых цепей, так и из легких цепей амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) с помощью набора сконструированных праймеров и клонировали в вектор для

секвенирования переменных областей каждого антитела. Последовательности аминокислот и ДНК переменных областей антител приведены в **Таблицах 3 и 4 и Таблицах 8 и 9** соответственно. Аминокислотные последовательности для CDR легкой и тяжелой цепей моноклональных антител анти-DDR1 приведены в **Таблицах 1 и 2** соответственно.

[389] Выбранные хиты связывания DDR1 экспрессировали в виде полноразмерных IgG человека или химерных IgG кролика/человека с применением векторной системы экспрессии млекопитающих в клетках почки эмбриона человека (HEK293) (Invitrogen). Антитела очищали с применением аффинной смолы с белком-A методом быстрой белковой жидкостной хроматографии (FPLC). Очищенные антитела, связывающие DDR1, характеризовали по их биологическим свойствам.

[390] **Связывающую аффинность моноклональных антител анти-DDR1 определяли с помощью прибора Octet, на основе сенсора биослойной интерферометрии (BLI).** Для измерения аффинности антитела, антитела (30 мкг/мл) загружали на биосенсоры с белком А на 4 мин. После короткого исходного уровня в кинетическом буфере загруженные биосенсоры подвергали воздействию серии рекомбинантного белка DDR1 в концентрации 0,1-200 нМ, и для коррекции дрейфа сенсора использовали вычитание фона. Все эксперименты проводили при встряхивании со скоростью 1000 об/мин. Фоновые сдвиги длины волны измеряли для эталонных биосенсоров, которые были нагружены только антителом. Кинетические сенсограммы для каждого антитела продемонстрированы на **Фиг. 10А-В**. Программное обеспечение для анализа данных ForteBio применяли для сопоставления данных с моделью связывания 1:1 для определения скорости ассоциации и скорости диссоциации. K_D рассчитывали исходя из отношения k_{off}/k_{on} и оценочных значений K_D для mAb DDR1 в **Таблице 13**.

[391] **Объединение (биннинг) эпитопов mAb DDR1.** Парную конкуренцию за связывание среди mAb анти-DDR1 использовали для определения связывающих эпитопов каждого mAb с применением прибора Octet и биосенсоров на белок А. Наборы эпитопов приведены в **Таблице 14**.

[392] **Антитело анти-hECD ингибирует спонтанный рост опухоли.** Чтобы продемонстрировать влияние введения антитела анти-DDR1 на онкогенез молочной железы на различных стадиях, мышам MMTV-PyMT (фоновая линия C57BL/6) вводили контрольный IgG или антитело анти-DDR1 в течение двух недель, когда средний размер опухоли достигал 100 мм³ («постопухоловое введение»). Для этого исследования было выбрано гуманизированное антитело DDR1 #9 из-за его высокой аффинности к ECD как мыши, так и человека (данные не приведены). Лечение антителами не влияло на массу тела хозяина. Однако оно значительно уменьшало объем опухоли (**Фиг. 12А**) и частоту возникновения опухоли (**Фиг. 12b**). Соответственно, лечение антителами значительно нарушало выравнивание коллагена и способствовало массивной инфильтрации иммунных клеток (**Фиг. 12c**). Аналогичные результаты были также получены при применении антитела анти-DDR1 и онкогенеза молочной железы на различных стадиях у мышей

MMTV-РyMT другой фоновой линии (FVB).

[393] **Сравнение антител анти-hECD и ингибитора киназы DDR1:** В той же модели опухоли молочной железы, в которой антитело анти-hECD продемонстрировало значительную ингибирующую опухоль активность, ранее опубликованный низкомолекулярный ингибитор киназы DDR1, 7th, ингибировал тирозинкиназную активность DDR1 в опухолях, но не уменьшал рост опухоли. Это согласуется с утверждением, что DDR1-зависимое выключение противоопухолевого иммунитета не зависит от киназной активности (**Фиг. 13а-е**).

[394] **DDR1 требуется для роста некоторых типов опухолей:** Применение генетической абляции опухоли *Ddr1* на основе CRISPR значительно увеличивало выживаемость иммунокомпетентных хозяев, имеющих опухоли яичников ID8agg. Однако, *Ddr1* KO при меланоме B16 или колоректальных опухолях MC38 не влиял на рост опухоли у сингенных иммунокомпетентных хозяев (см. **Фиг. 14b-с**). В сочетании с результатами, полученными в отношении опухолей молочной железы, это исследование демонстрирует, что нацеливание на DDR1 может привести к ингибированию опухолей при множественных типах рака.

[395] **Корреляция DDR1 и маркеров противоопухолевого иммунитета.** Анализ набора данных транскриптома TCGA продемонстрировал необычно высокую экспрессию DDR1 при множественных раковых заболеваниях человека по сравнению с соответствующей нормальной тканью (данные не приведены). Кроме того, уровни мРНК DDR1 при многих типах рака отрицательно коррелировали с цитотоксическими иммунными маркерами, такими как гранзим В (GZMB, см. **Фиг. 15а**), что позволяет предположить о том, что DDR1 может функционировать, чтобы противодействовать противоопухолевому иммунитету при многих типах рака. Кроме того, анализ набора данных протеома TCGA продемонстрировал отрицательную корреляцию между белком DDR1 и CD8 (**Фиг. 15b**), а также между DDR1 и белками, участвующими в цитолитическом эффекторном пути противоопухолевого иммунитета (**Фиг. 15с**). Таким образом, как на уровне мРНК, так и на уровне белка высокая экспрессия DDR1 коррелирует с низким уровнем экспрессии противоопухолевого иммунного маркера. DDR1, по-видимому, действует как антагонист противоопухолевого иммунитета, поэтому ингибирование этого антагониста, например, с помощью антитела DDR1, может повысить противоопухолевый иммунитет при многих типах рака.

[396] **Высокий уровень белка DDR1 опухоли коррелирует с выключением иммунного ответа.** Как продемонстрировано на **Фиг. 16**, среди когорты пациентов с трижды негативным раком молочной железы (TNBC), ранее не подвергавшихся лечению, в мультиплексных изображениях ИHC, опухоли DDR1^{выс} продемонстрировали сниженный процент CD8⁺ Т-клеток, присутствующих в опухоли, и больший процент CD8⁺ Т-клеток, присутствующих на краю опухоли, в отличие от опухолей DDR1^{низк}, в которых больший процент CD8⁺ Т-клеток присутствовал как внутри опухоли, так и на краях опухоли. Такие клинические корреляции убедительно свидетельствуют о том, что опухолевый DDR1

ассоциирован со сниженным уровнем цитотоксической активности CD8⁺ Т-клеток и низкой инфильтрацией опухоли такими клетками.

[397] **Определение домена связывания антител.** Для определения связывания DDR1-9 (Фиг. 18В) и DDR1-14 (Фиг. 18С), и гуманизированного DDR1-9hu-Ab1 с доменами ECD и DS или DSL применяли метод ELISA (Фиг. 18А). Рекombинантный внеклеточный (ECD) белок DDR1 и белки с делецией домена наносили на 96-луночные планшеты с высоким связыванием в концентрации 2 мкг/мл. Титрование антитела DDR1 применяли для определения кривых связывания, при этом значения EC₅₀ приведены на Фиг.18. ECD и доменные белки экспрессировали в клетках HEK293 и очищали с применением смолы NTA до чистоты >85%. Рекombинантно экспрессированные доменные белки наносили на 96-луночный планшет с высоким связыванием (Fisher Scientific) в концентрации 2 мкг/мл. Серию титрований антител применяли для определения связывания EC₅₀. Делеция DSL домена DDR1 ECD нарушала связывание как антител DDR1-9, так и антител DDR1-14. Фрагмент с делецией домена DS продемонстрировал такое же или лучшее связывание, чем белок ECD. Фрагмент с делецией DSL полностью блокировал связывание DDR1-9, DDR1-14 и DDR1-9Hu.

[398] Делеция DS домена DDR1 ECD не влияла на связывание антител DDR1-9 и DDR1-14, но приводила к уменьшению связывания гуманизированным антителом DDR1-9hu. Делеция только одного DS-домена снижала связывание со значением EC₅₀-168 нг/мл против 83 нг/мл, в то время как делеция только одного DSL-домена полностью устраняла связывание всех трех антител DDR1.

Таблица 11. Аффинности связывания, определенные с помощью Octet на основе BLI.

Название антитела	Сочетание тяжелой/легкой цепи	KD (нМ)	kon(1/Мс)	kdis(1/с)	Полный R ²
DDR1-9Hu-Ab1	DDR1-9hu_Hv/DDR1-9hu_Lv1	0,39 ± 0,02	1,65E+05	6,52E-05	0,9967
DDR1-9Hu-Ab2	DDR1-9hu_Hv/DDR1-9hu_Lv2	0,77 ± 0,02	1,46E+05	1,13E-04	0,9957

Таблица 12. EC₅₀ моноклональных антител анти-DDR1

Название mAb	EC ₅₀ (μг/мл)
DDR1-3	0,0598
DDR1-9	0,1827
DDR1-14	0,0713
DDR1-33	0,1482

Таблица 13. Аффинность связывания с DDR1 человека, определенная с

помощью прибора Octet (96-Red)

Антитела	KD	kon(1/Mc)	kdis(1/c)	Полный X ²	Полный R ²
DDR1-3	1,100 ± 0,038 нМ	1,73E+06	1,91E-03	6,840	0,934
DDR1-9	0,236 ± 0,003 нМ	3,11E+05	7,35E-05	0,368	1,000
DDR1-14	0,113 ± 0,005 нМ	2,02E+05	2,27E-05	0,162	1,000
DDR1-33	0,797 ± 0,005 нМ	6,19E+05	4,93E-04	2,602	0,998

Таблица 14. Группы эпитопов mAb DDR1

mAb Название	Наборы эпитопов
DDR1-3	Набор 1
DDR1-9 DDR1-33	Набор 2
DDR1-14	Набор 3

[399] Для определения перекрестной реактивности панели моноклональных антител против DDR1 человека с DDR2 ECD человека применяли метод ELISA. Белок ECD DDR1 или ECD DDR2 наносили на планшет с высоким связыванием, и каждое из моноклональных антител наносили в концентрации 1 мкг/мл, при этом связывание определяли с применением конъюгированного с пероксидазой хрена антикроличьего антитела (Jackson ImmuneResearch, PA). Результаты приведены на Фиг. 19. Моноклональные антитела DDR1-3; DDR1-9; DDR1-10; DDR1-14 и DDR1-33 были специфичны для эпитопов DDR1, тогда как клоны DDR1-13; DDR1-15; DDR1-21; DDR1-22 и DDR1-34, по-видимому, распознают эпитопы, присутствующие как в ECD DDR1, так и в DDR2.

[400]

[401] Все способы, описанные и заявленные в данном документе, можно получать и осуществлять без излишних экспериментов в свете настоящего изобретения. Хотя композиции и способы по данному изобретению были описаны в терминах предпочтительных вариантов их осуществления, специалистам в данной области техники будет очевидно, что к способам и этапам или к последовательности этапов описанных в данном документе способов могут быть применены модификации без отклонения от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что некоторые агенты, которые являются родственными химически и физиологически, могут быть заменены агентами, описанными в данном документе, при этом будут достигнуты такие же или подобные результаты. Все такие подобные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, находятся в пределах сущности, объема и концепции изобретения, определяемых прилагаемой формулой изобретения.

ССЫЛКИ

Нижеприведенные ссылки в той степени, в которой они описывают типовые процедурные или иные детали, дополняющие изложенные в данном документе, явным образом включены в данный документ посредством ссылки.

Joyce & Fearon, T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 348, 74-80, doi:10.1126/science.aaa6204 (2015).

Binnewies et al., Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* 24, 541-550, doi:10.1038/s41591-018-0014-x (2018).

O'Donnell et al., Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 151-167, doi:10.1038/s41571-018-0142-8 (2019).

Gruosso et al., Spatially distinct tumor immune microenvironments stratify triple-negative breast cancers. *J Clin Invest* 129, 1785-1800, doi:10.1172/JCI96313 (2019).

Fu et al., Discoidin domain receptors: unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling. *J Biol Chem* 288, 7430-7437, doi:10.1074/jbc.R112.444158 (2013).

Leitinger, B. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int Rev Cell Mol Biol* 310, 39-87, doi:10.1016/B978-0-12-800180-6.00002-5 (2014).

Valiathan et al., Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 31, 295-321, doi:10.1007/s10555-012-9346-z (2012).

Rammal et al., Discoidin Domain Receptors: Potential Actors and Targets in Cancer. *Front Pharmacol* 7, 55, doi:10.3389/fphar.2016.00055 (2016).

Gao et al., Multi-organ Site Metastatic Reactivation Mediated by Non-canonical Discoidin Domain Receptor 1 Signaling. *Cell* 166, 47-62, doi:10.1016/j.cell.2016.06.009 (2016).

Bayer et al., DDR2 controls breast tumor stiffness and metastasis by regulating integrin mediated mechanotransduction in CAFs. *Elife* 8, doi:10.7554/eLife.45508 (2019).

Hidalgo-Carcedo et al., Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nature Cell Biol* 13, 49-58, doi:10.1038/ncb2133 (2011).

Marcotte et al., Essential gene profiles in breast, pancreatic, and ovarian cancer cells. *Cancer Discov* 2, 172-189, doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0224 (2012).

Moll et al., DDR1 role in fibrosis and its pharmacological targeting. *BBA-Molecular Cell Research* 1866, 118474, doi:10.1016/j.bbamcr.2019.04.004 (2019).

Takai et al., Discoidin domain receptor 1 (DDR1) ablation promotes tissue fibrosis and hypoxia to induce aggressive basal-like breast cancers. *Genes Dev* 32, 244-257, doi:10.1101/gad.301366.117 (2018).

Slaney et al., Trafficking of T cells into tumors. *Cancer research* 74, 7168-7174 (2014).

Sackstein et al., T-lymphocyte homing: an underappreciated yet critical hurdle for successful cancer immunotherapy. *Laboratory Investigation* 97, 669 (2017).

Ager et al., Homing to solid cancers: a vascular checkpoint in adoptive cell therapy using CAR T-cells. *Biochemical Society Transactions* 44, 377 (2016).

Carafoli et al., Structure of the discoidin domain receptor 1 extracellular region bound to

an inhibitory Fab fragment reveals features important for signaling. *Structure* 20, 688-697, doi:10.1016/j.str.2012.02.011 (2012).

Carafoli & Hohenester, Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. *Biochim Biophys Acta* 1834, 2187-2194, doi:10.1016/j.bbapap.2012.10.014 (2013).

Vogel, W. F. Ligand-induced shedding of discoidin domain receptor 1. *FEBS Lett* 514, 175-180 (2002).

Flynn et al., Inhibition of collagen fibrillogenesis by cells expressing soluble extracellular domains of DDR1 and DDR2. *J Mol Biol* 395, 533-543, doi:10.1016/j.jmb.2009.10.073 (2010).

Fu et al., Shedding of discoidin domain receptor 1 by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 288, 12114-12129, doi:10.1074/jbc.M112.409599 (2013).

Shitomi et al., ADAM10 controls collagen signaling and cell migration on collagen by shedding the ectodomain of discoidin domain receptor 1 (DDR1). *Mol Biol Cell* 26, 659-673, doi:10.1091/mbc.E14-10-1463 (2015).

Agarwal et al., Interaction of discoidin domain receptor 1 with collagen type 1. *J Mol Biol* 367, 443-455, doi:10.1016/j.jmb.2006.12.073 (2007).

Chen et al., Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J Bone Miner Res* 22, 1943-1956, doi:10.1359/Jbmr.070725 (2007).

Kothiwale et al., Discoidin domain receptor 1 (DDR1) kinase as target for structure-based drug discovery. *Drug Discov Today* 20, 255-261, doi:10.1016/j.drudis.2014.09.025 (2015).

Li et al., Small molecule discoidin domain receptor kinase inhibitors and potential medical applications. *J Med Chem* 58, 3287-3301, doi:10.1021/jm5012319 (2015).

Meng et al., Efficient generation of monoclonal antibodies from single rhesus macaque antibody secreting cells. *MAbs* 7, 707-718, doi:10.1080/19420862.2015.1051440 (2015).

Gui et al., Disrupting LILRB4/APOE Interaction by an Efficacious Humanized Antibody Reverses T-cell Suppression and Blocks AML Development. *Cancer Immunol Res* 7, 1244-1257, doi:10.1158/2326-6066.CIR-19-0036 (2019a).

Li et al., Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. *Genome Biol* 17, 174, doi:10.1186/s13059-016-1028-7 (2016).

Pan et al., A major chromatin regulator determines resistance of tumor cells to T cell-mediated killing. *Science* 359, 770-775, doi:10.1126/science.aao1710 (2018).

Sun et al., Tumor-extrinsic discoidin domain receptor 1 promotes mammary tumor growth by regulating adipose stromal interleukin 6 production in mice. *Journal of Biological Chemistry* 293, 2841-2849 (2018).

Erikson et al., Quantification of the second-order nonlinear susceptibility of collagen I using a laser scanning microscope. *Journal of biomedical optics* 12, 044002 (2007).

Gui et al., Disrupting LILRB4/APOE interaction by an efficacious humanized antibody reverses T-cell suppression and blocks AML development. *Cancer Immunology Research* 7, 1244-1257 (2019b).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком рецептора 1 домена дискоидина (DDR1), содержащее вариабельную область легкой цепи, имеющую LC-LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 в пределах вариабельной области легкой цепи, выбранной из SEQ ID NO:108-128, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 в пределах вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO:129-149, или ее варианты, при этом одна или большее количество LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации.

2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащее спаренные с клоном LC-LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3, выбранные из **Таблицы 1**, и HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3, выбранные из **Таблицы 2**, или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации.

3. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащее вариабельную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSIGSV (SEQ ID NO:11), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GVF, и LC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность QYIPYGSSP (SEQ ID NO:12), и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLNRY (SEQ ID NO:57), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность ISYGDIT (SEQ ID NO:58), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARADTGDNGYLGQL (SEQ ID NO:59) (DDR1-9), или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации.

4. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащее вариабельную область легкой цепи, имеющую LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность ESINSW (SEQ ID NO:41), LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GVF, и LC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность QSYYIINRSNYGNS (SEQ ID NO:42), и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLSSYY (SEQ ID NO:102), HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность ITTAGPL (SEQ ID NO:103), и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ARGHAGSIYYSYFDL (SEQ ID NO:104) (DDR1-32), или их варианты, при этом одна или большее количество из LC-CDR и/или HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации.

5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащее вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID No: 108-128 и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO. 129-149.

имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122 (DDR1-23K), и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143 (DDR1-23H); (p) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123 (DDR1-26K), и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144 (DDR1-26H); (q) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124 (DDR1-28K), и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145 (DDR1-28H); (r) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125 (DDR1-29K), и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146 (DDR1-29H); (s) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126 (DDR1-32K), и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147 (DDR1-32H); (t) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127 (DDR1-33K) и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148 (DDR1-33H); or (u) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128 (DDR1-34K), и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149 (DDR1-34H); или ее вариант, при этом аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи имеет 80% или более идентичности последовательности с исходной переменной областью легкой цепи, а аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи имеет 80% или более идентичности последовательности с исходной переменной областью тяжелой цепи, при этом указанный вариант специфически связывается с белком DDR1.

7. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по **п. 1**, содержащее переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112 (DDR1-9K), и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133 (DDR1-9H).

8. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по **п. 1**, содержащее переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126 (DDR1-32K), и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147 (DDR1-32H).

9. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по **п. 1 или 2**, отличающееся тем, что указанное выделенное моноклональное антитело представляет собой антитело мыши, грызуна, кролика, химерное, гуманизированное или человеческое антитело.

10. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по **п. 9**, отличающееся тем, что указанное выделенное моноклональное антитело представляет собой кроличье или химерное антитело.

11. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по **п. 9**, отличающееся тем, что указанное выделенное моноклональное антитело представляет собой кроличье или химерное антитело.

12. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по **пп. 1-4**, отличающееся тем, что указанное выделенное моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

13. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по **п. 1**, содержащее переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150 или 151 (DDR1-9hu_Lv1 или DDR1-9hu_Lc2), и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152 (DDR1-9hu_Hv); или варианты, при этом аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи имеет 80% или более идентичности последовательности с исходной переменной областью легкой цепи, а аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи имеет 80% или более идентичности последовательности с исходной переменной областью тяжелой цепи, при этом указанный вариант специфически связывается с белком DDR1.

14. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из **пп. 1-13**, отличающееся тем, что указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело ScFv (переменный одноцепочечный фрагмент), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент.

15. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается со всем эпитопом или его частью, или с тем же эпитопом, специфически связываемым выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из **пп. 1-14**.

16. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует за один и тот же эпитоп с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из **пп. 1-14**.

17. Конъюгат «антитело-лекарственное средство», содержащий выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из **пп. 1-16**, и противоопухолевое лекарственное средство, при этом указанное противоопухолевое лекарственное средство связано с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

18. Конъюгат «антитело-лекарственное средство» по **п. 17**, отличающийся тем, что указанное противоопухолевое лекарственное средство связано с антителом через фотолabile линкер или ферментативно расщепляемый линкер.

19. Конъюгат «антитело-лекарственное средство» по **п. 17** или **18**, отличающийся тем, что указанное противоопухолевое лекарственное средство представляет собой токсин, радиоизотоп, цитокин или фермент.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из **пп. 1-14**, и фармацевтически приемлемый носитель.

21. Выделенный полинуклеотид, кодирующий выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из **пп. 1-14**.
22. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по **п. 21**.
23. Вектор по **п. 22**, содержащий экспрессионный вектор, способный экспрессировать кодируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
24. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по **п. 21** или вектор по **п. 22** или **23**.
25. Клетка-хозяин по **п. 24**, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.
26. Клетка-хозяин по **п. 25**, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой клетку СНО.
27. Гибридома или сконструированная клетка, кодирующая и/или продуцирующая выделенное моноклональное антитело по любому из **пп. 1-14**.
28. Способ продуцирования антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из **пп. 24-26**, отличающийся тем, что указанная клетка-хозяин способна экспрессировать моноклональное антитело или его антигенный фрагмент, при этом указанный способ включает культивирование клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и выделения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.
29. Белок химерного антигенного рецептора (CAR), содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из **пп. 1-14**.
30. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая белок CAR по **п. 29**.
31. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по **п. 30**.
32. Вектор по **п. 31**, отличающийся тем, что указанный вектор способен экспрессировать белок CAR.
33. Сконструированная клетка, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по **п. 30** или вектор по **п. 32**.
34. Сконструированная клетка по **п. 33**, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой Т-клетку, NK-клетку или макрофаг.
35. Способ лечения или ослабления влияния рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из **пп. 1-14**, или сконструированной клетки по **п. 33** или **34**.
36. Способ по **п. 35**, отличающийся тем, что указанный способ уменьшает или устраняет опухолевую нагрузку у субъекта.
37. Способ по **п. 36**, отличающийся тем, что указанный способ уменьшает количество опухолевых клеток или уменьшает размер опухоли.
38. Способ по **п. 35**, отличающийся тем, что представляет собой солидный рак или опухоль.
39. Способ по **п. 38**, отличающийся тем, что рак выбирают из рака поджелудочной железы; рака легкого, включая мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак

легкого; рака толстой и прямой кишки; рака головы и шеи, рака желудка (гастрального рака); рака яичников; рака молочной железы; рака почки; рака печени; рака предстательной железы, рака шейки матки, рака головного мозга; рака кожи, включая меланому; а также рака кости.

40. Способ по п. 38, отличающийся тем, что рак представляет собой рак молочной железы.

41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что рак молочной железы представляет собой подтип рака молочной железы, выбранный из (а) люминального А (ER+ и/или PR+, HER2-); (b) люминального В (ER+ и/или PR+, HER2+); (c) трижды негативного (ER-, PR-, HER2-); (d) HER2+/ER- (ER-, PR-, и HER2+); и (e) неклассифицированного (ER-, PR-, HER2-, цитокератин 5/6- и HER1-).

42. Способ по любому из пп. 35-41, отличающийся тем, что раковые клетки рака идентифицированы как экспрессирующие или определены как потенциально экспрессирующие секретлируемый белок DDR1 и/или белок DDR1 на поверхности раковых клеток.

43. Способ по любому из пп. 35-42, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят внутривенно, внутриартериально, внутриопухолево или подкожно.

44. Способ по п. 35, дополнительно включающий введение субъекту одного или большего количества лекарственных средств, выбранных из группы, состоящей из ингибитора топоизомеразы, антрациклинового ингибитора топоизомеразы, антрациклина, даунорубицина, нуклеозидного ингибитора метаболизма, цитарабина, гипометилирующего агента, цитарабина в низких дозах (LDAC), комбинации даунорубицина и цитарабина, липосом даунорубицина и цитарабина для инъекций, Vuxeos®, азацитидина, Vidaza®, децитабина, полностью транс-ретиноевой кислоты (ATRA), мышьяка, триоксида мышьяка, дигидрохлорида гистамина, Ceplene®, интерлейкина-2, альдеслейкина, Proleukin®, гемтузумаба, озогамидина, Mylotarg®, ингибитора FLT-3, мидостаурина, Rydapt®, клофарабина, ингибитора фарнезилтрансферазы, децитабина, ингибитора IDH1, ивонидениба, Tibsovo®, ингибитора IDH2, энасиденаба, Idhifa®, сглаженного ингибитора (СМО), глаздегиба, ингибитора аргиназы, ингибитора IDO, эпикадостата, ингибитора BCL-2, венетоклакса, Venclexta®, комплексного производного платины, оксалиплатина, ингибитора киназы, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора киназы PI3, ингибитора ВТК, ибрутиниба, IMBRUVICA®, акалабрутиниба, CALQUENCE®, занубрутиниба, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA-4, антитела к LAG3, антитела к ICOS, антитела к TIGIT, антитела к TIM3, антитела к CD40, антитела к 4-1BB, антитела к CD47, антитела к SIRP1 α или слитого белка, антагониста E-селектина, антитела, связывающегося с опухолевым антигеном, антитела, связывающегося с маркером поверхности Т-клеток, антитела, связывающегося с маркером поверхности миелоидных клеток или NK-клеток, алкилирующего агента, нитромочевинного агента, антиметаболита, противоопухолевого антибиотика, алкалоида, полученного из растения, препарата для гормональной терапии,

антагониста гормонов, ингибитора ароматазы и ингибитора Р-гликопротеина.

45. Способ по любому из **пп. 35-44**, отличающийся тем, что выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит связанное с ним противоопухолевое лекарственное средство.

46. Способ по **п. 45**, отличающийся тем, что указанное противоопухолевое лекарственное средство представляет собой токсин, радиоизотоп, цитокин или фермент.

47. Способ лечения или ослабления влияния фиброза у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из **пп. 1-14**, или сконструированной клетки по **п. 33** или **34**.

48. Способ по **п. 47**, отличающийся тем, что у субъекта имеется фиброз органа.

49. Способ по **п. 48**, отличающийся тем, что у субъекта имеется фиброз почек, печени, легких или сердца.

50. Способ по **п. 49**, отличающийся тем, что у субъекта имеется фиброз легких.

51. Способ по **п. 50**, отличающийся тем, что у субъекта имеется интерстициальное заболевание легких.

52. Способ по **п. 50**, отличающийся тем, что у субъекта имеется идиопатический легочный фиброз (IPF) или рубцевание легких.

53. Способ обнаружения раковой клетки или раковой стволовой клетки в образце или в организме субъекта, включающий: (а) приведение субъекта или образца субъекта в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из **пп. 1-14**; а также (b) обнаружение связывания указанного антитела с раковой клеткой или раковой стволовой клеткой в организме указанного субъекта или в образце.

54. Способ по **п. 53**, отличающийся тем, что указанный образец представляет собой жидкость организма или биоптат.

55. Способ по **п. 54**, отличающийся тем, что указанный образец представляет собой кровь, костный мозг, мокроту, слезы, слюну, слизь, сыворотку, мочу или кал.

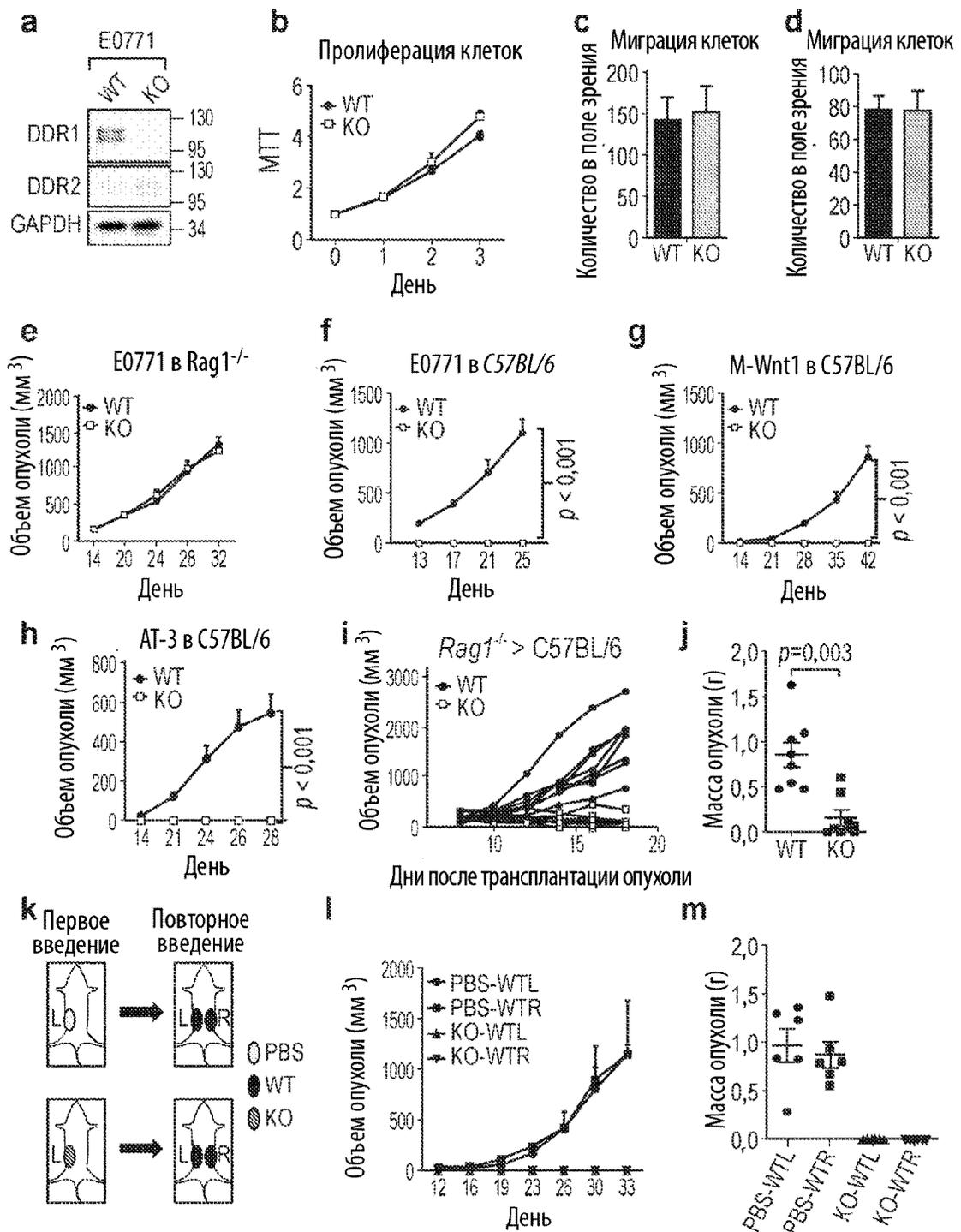
56. Способ по любому из **пп. 53-55**, отличающийся тем, что обнаружение включает иммуногистохимию, проточную цитометрию, FACS, ELISA, RIA или вестерн-блоттинг.

57. Способ по **п. 53**, дополнительно включающий выполнение этапов (а) и (b) во второй раз и определение изменения уровней обнаружения по сравнению с первым разом.

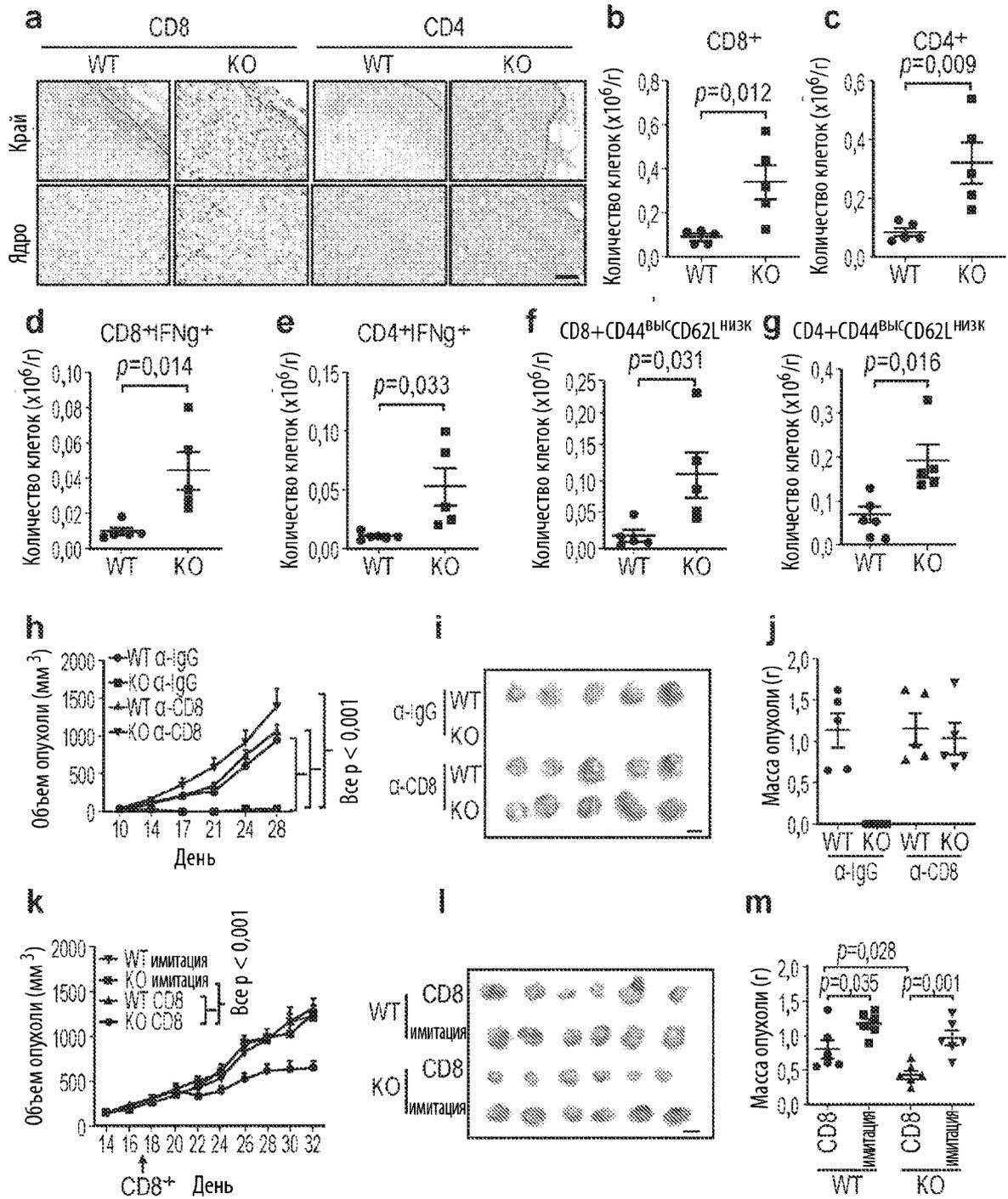
58. Способ по любому из **пп. 53-57**, отличающийся тем, что указанное выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат метку.

59. Способ по **п. 58**, отличающийся тем, что указанная метка представляет собой пептидную метку, фермент, магнитную частицу, хромофор, флуоресцентную молекулу, хемолюминесцентную молекулу или краситель.

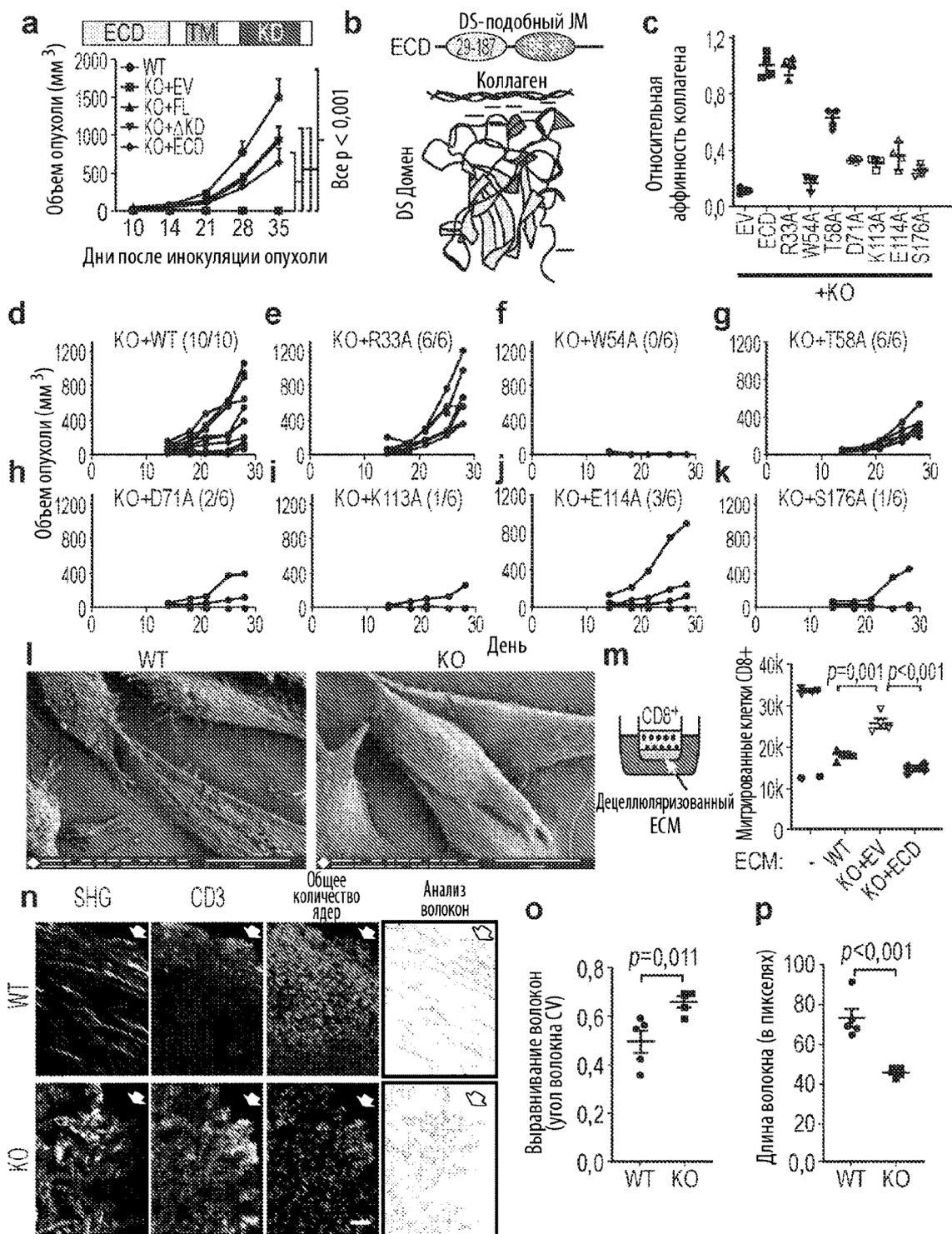
60. Способ по любому из **пп. 35-59**, отличающийся тем, что указанное выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгируют с липосомой или наночастицей. По доверенности



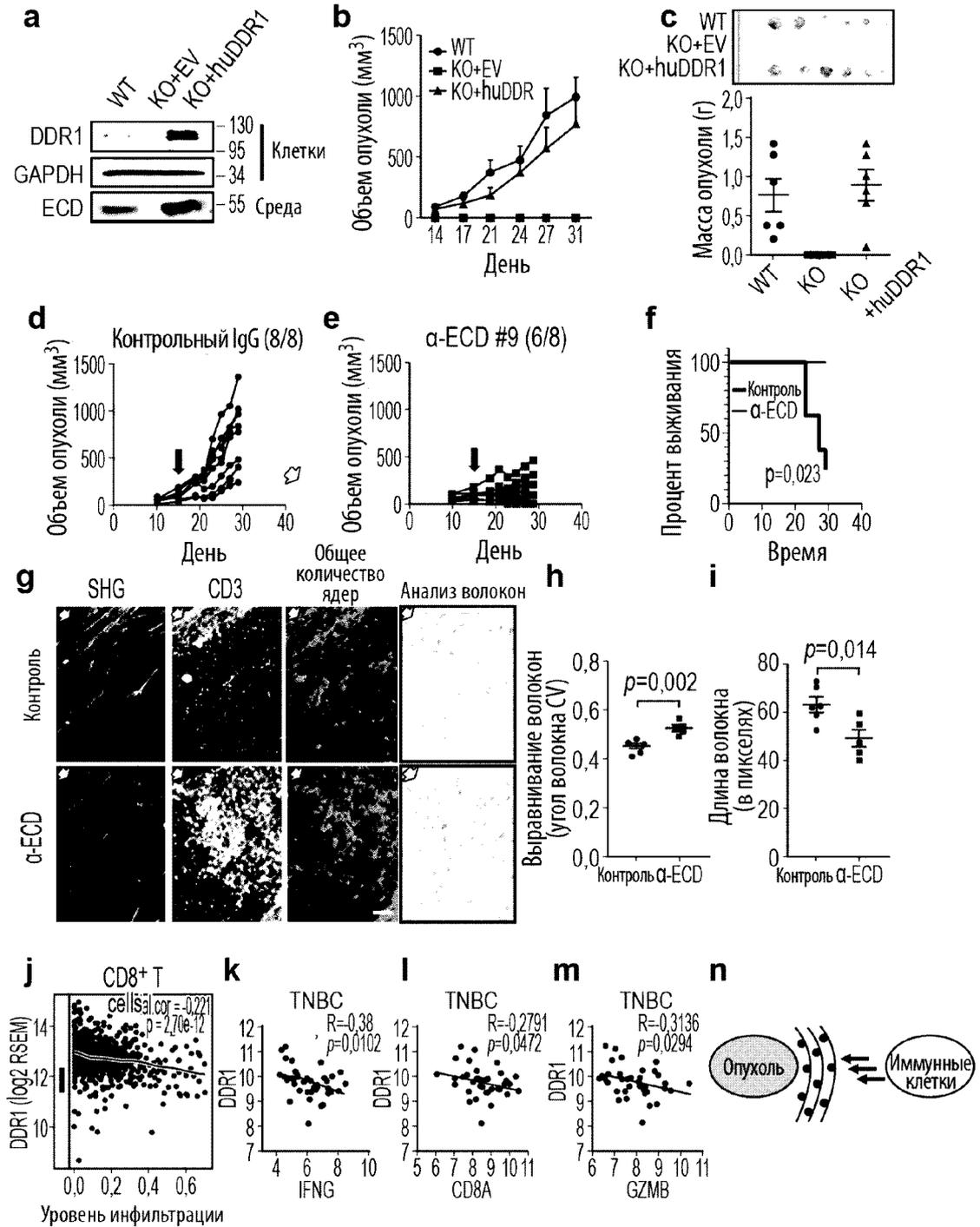
Фиг. 1А-М



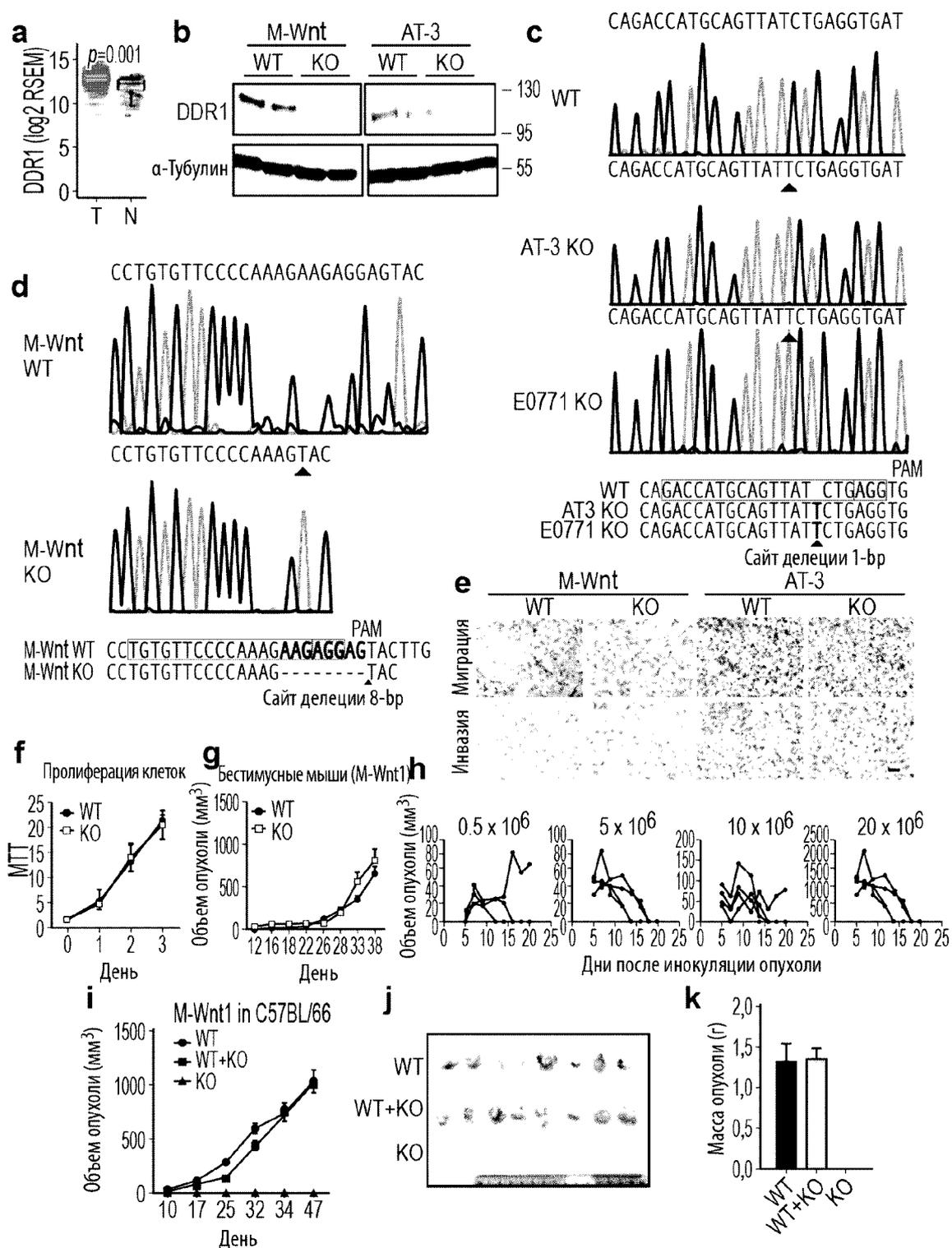
Фиг. 2А-М



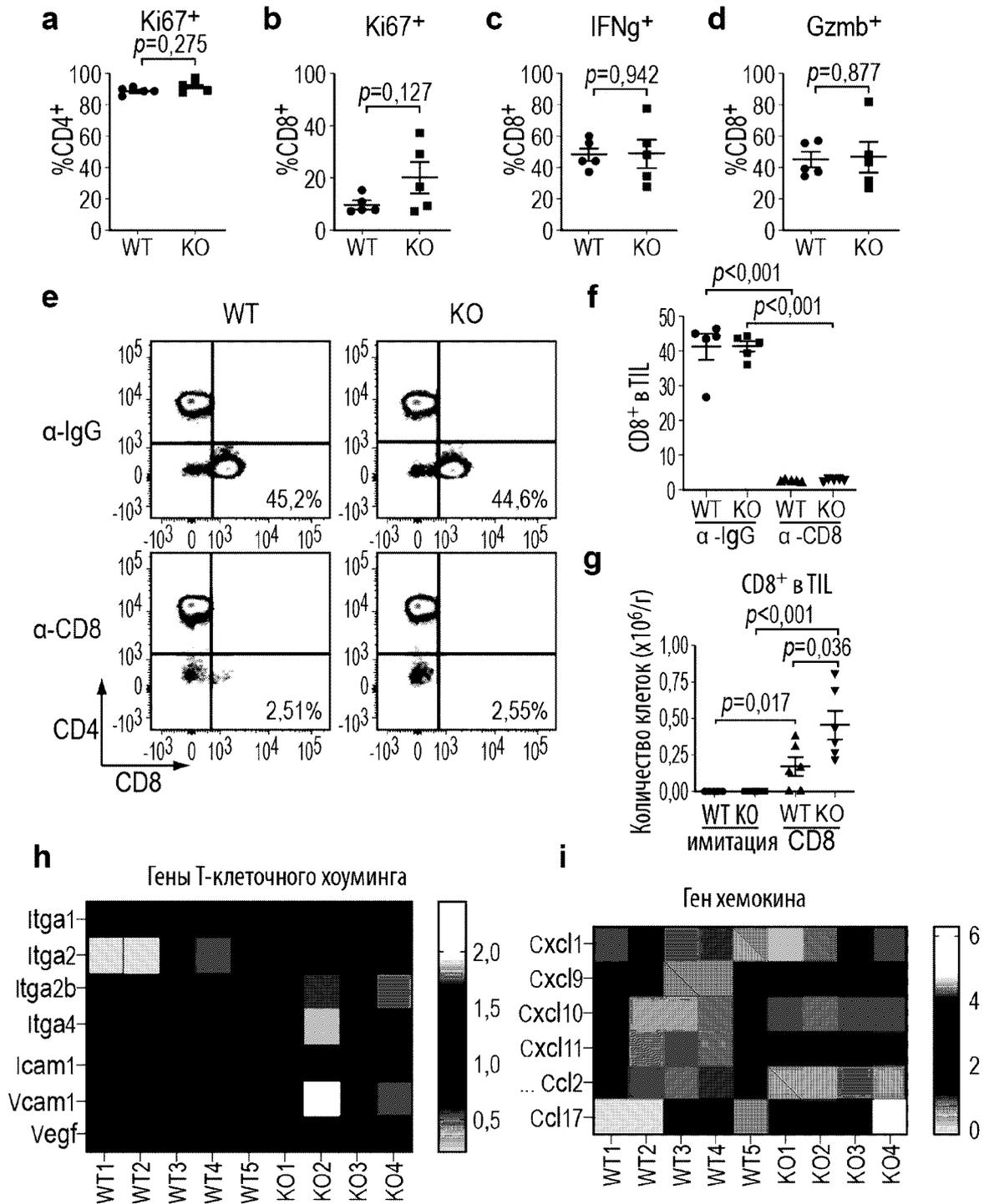
Фиг. 3А-Р



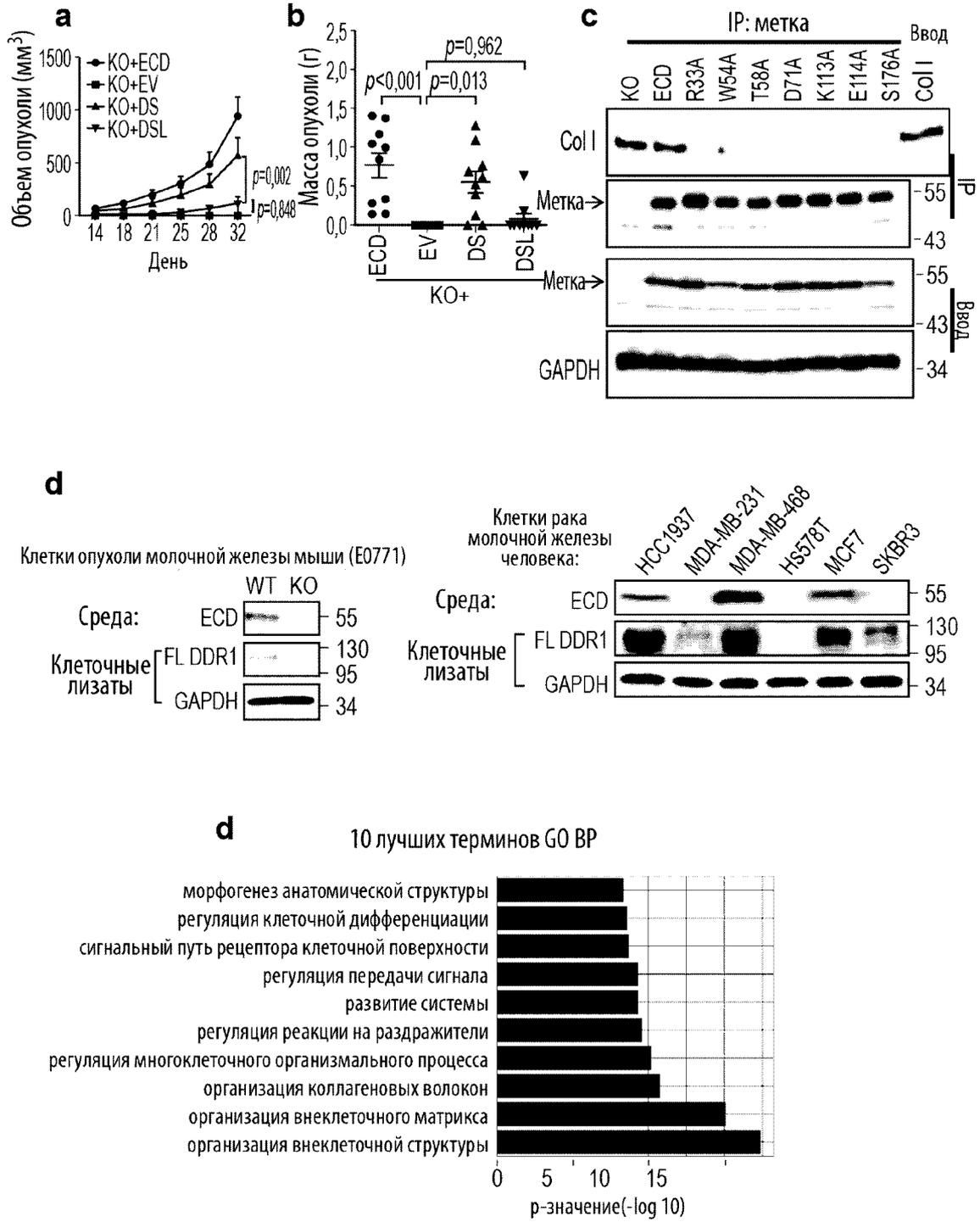
Фиг. 4А-Н



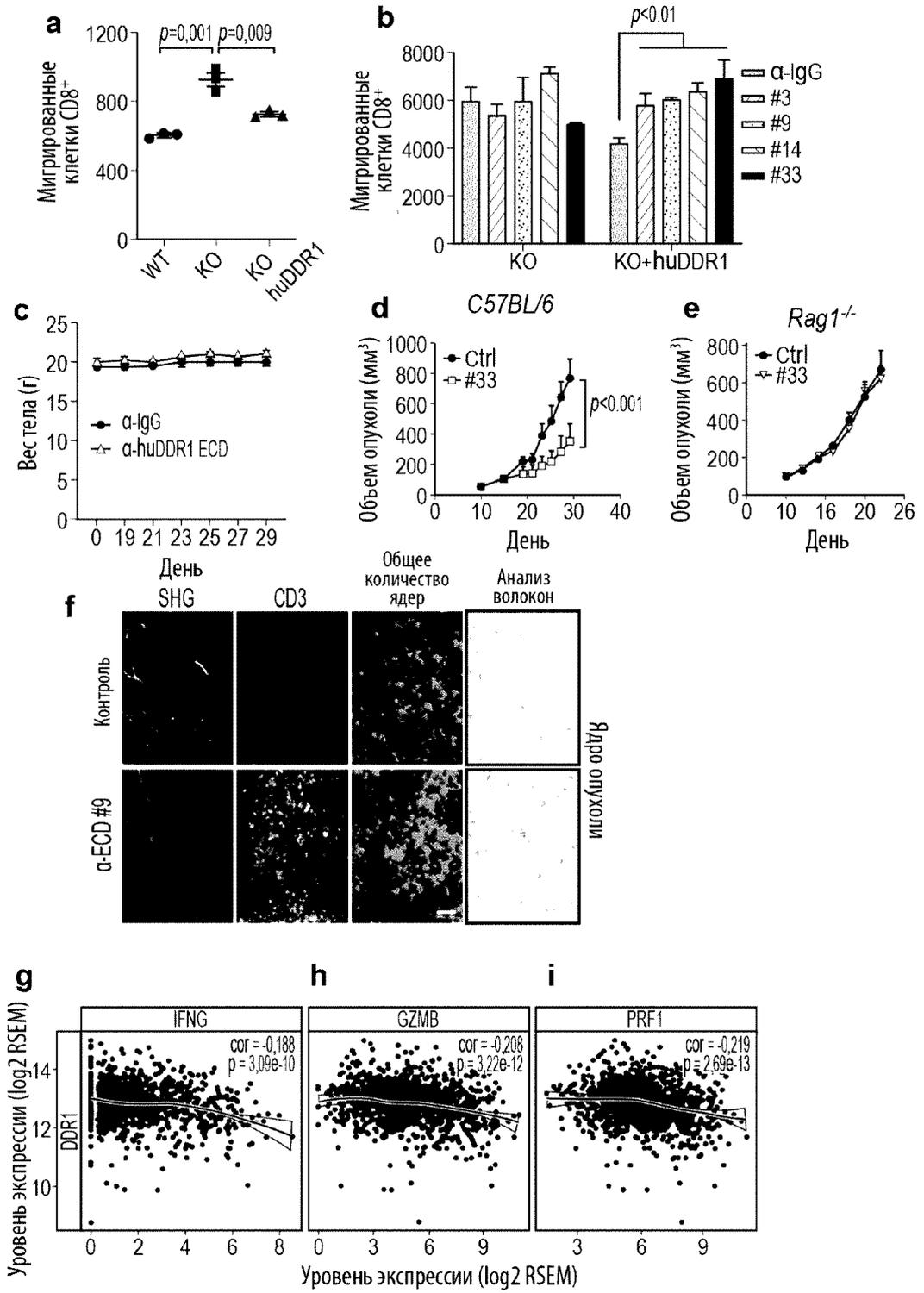
Фиг. 5А-К



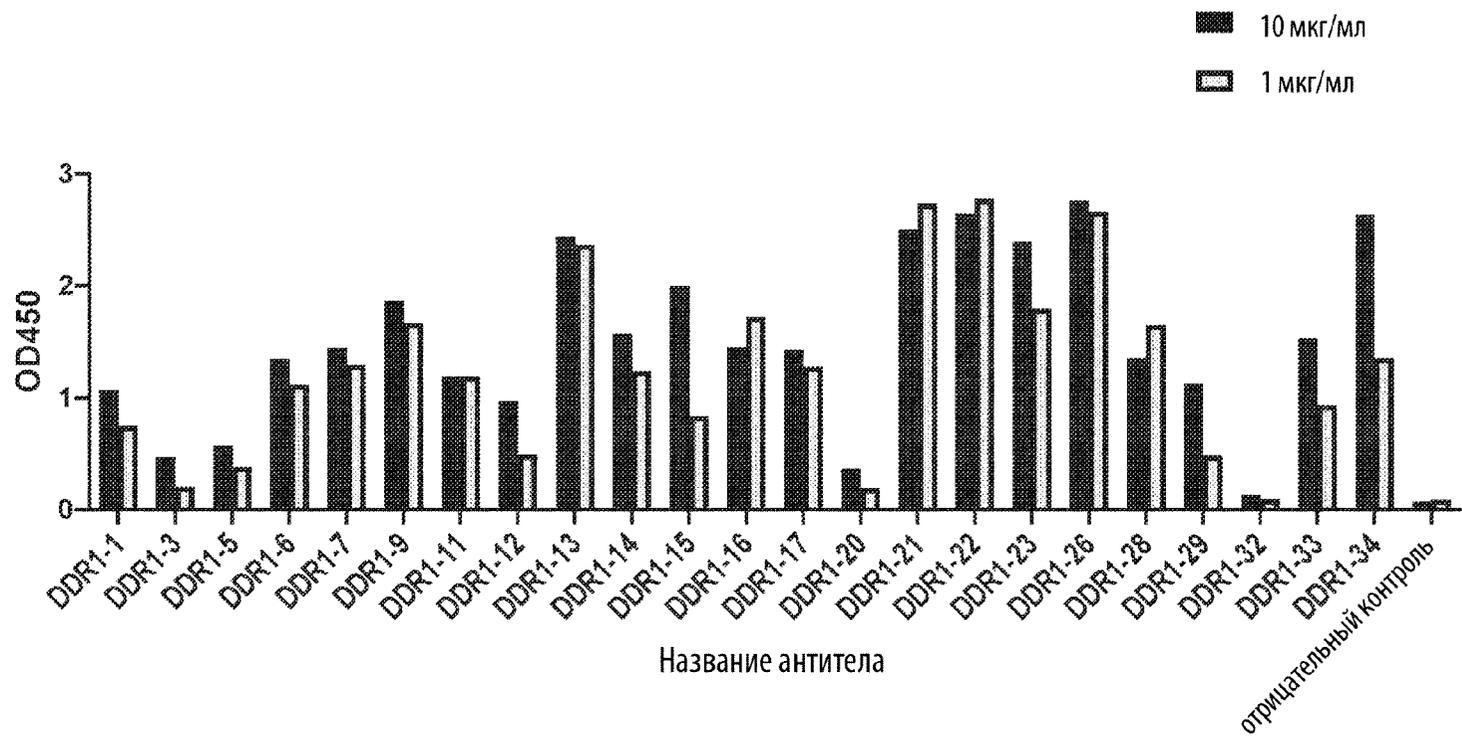
Фиг. 6А-І



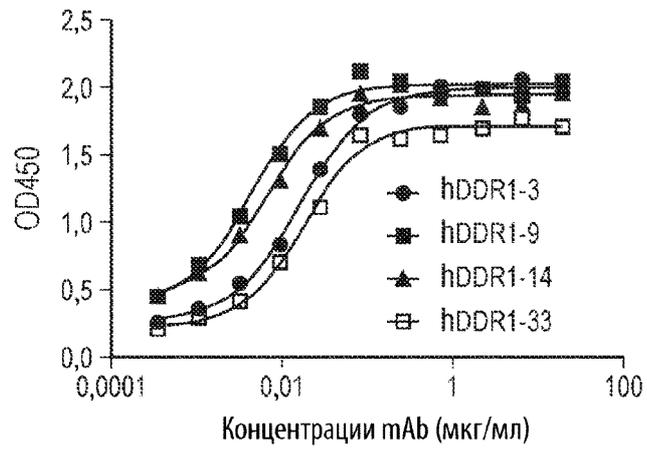
Фиг. 7А-Е



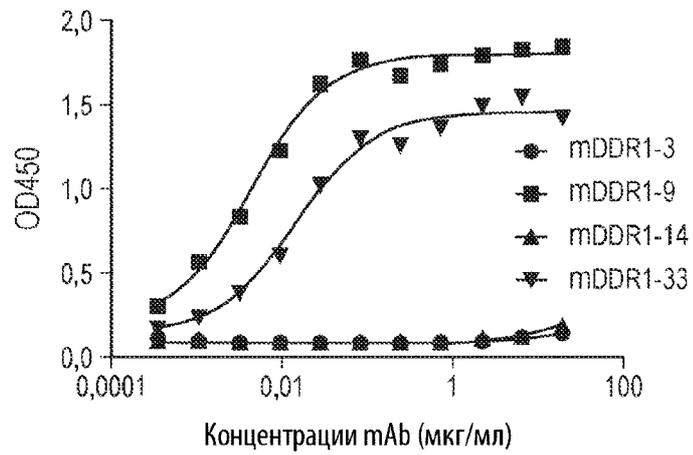
Фиг. 8A-I



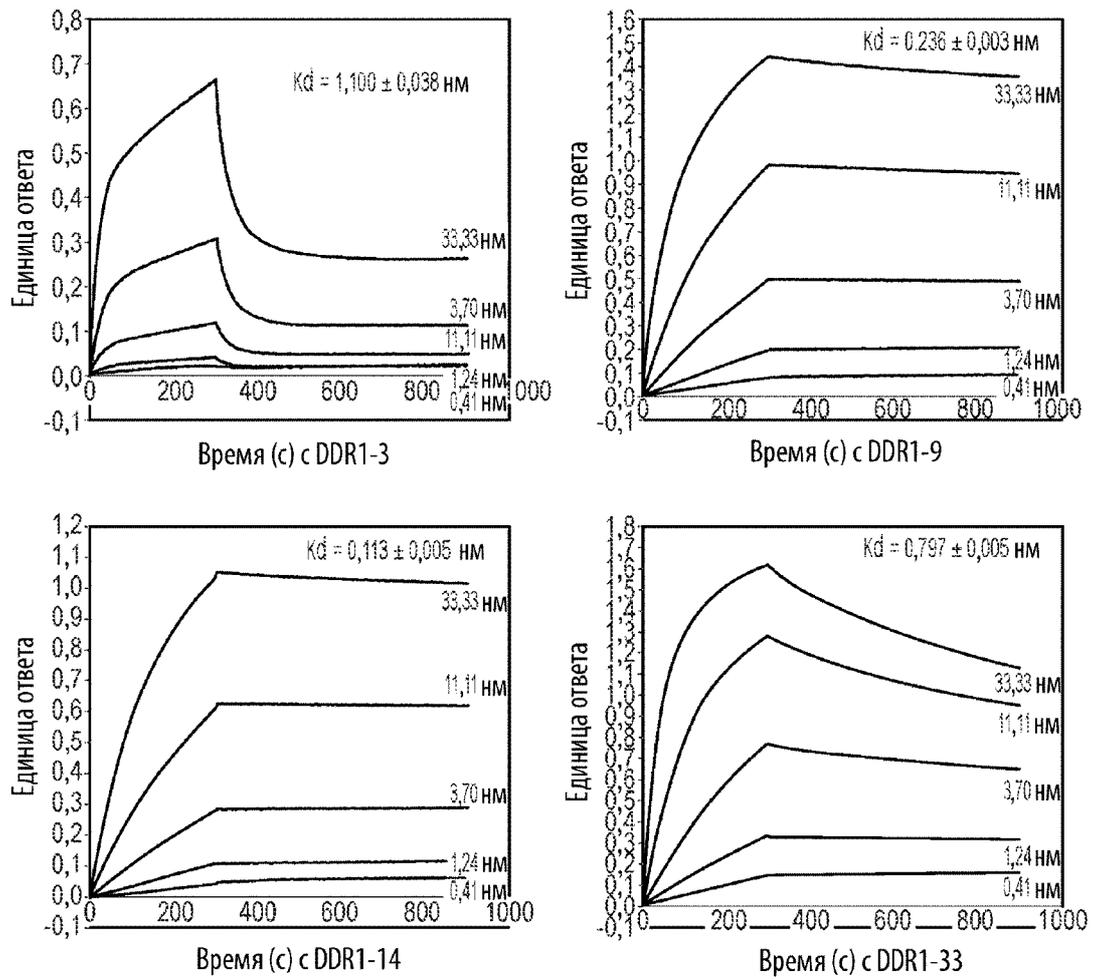
Фиг. 9



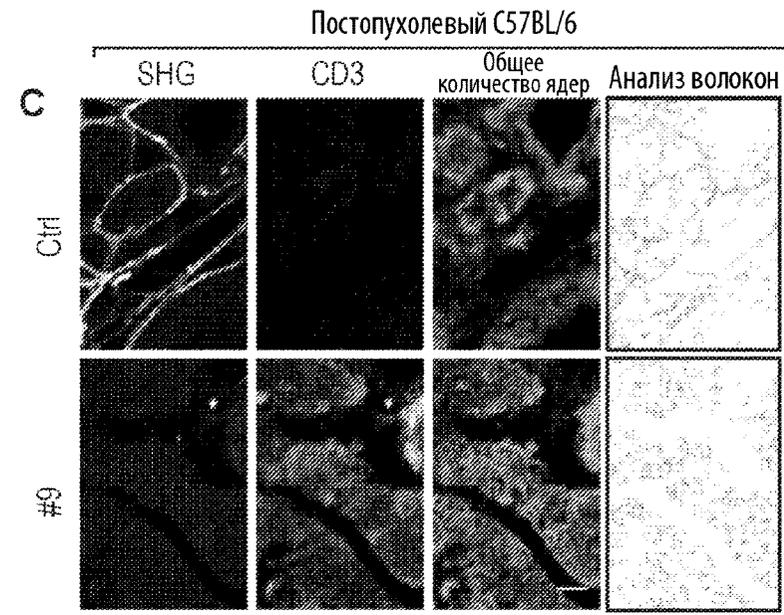
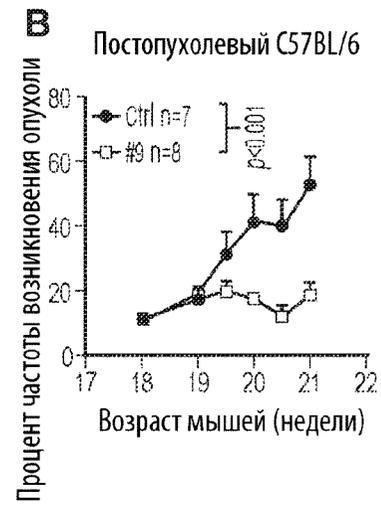
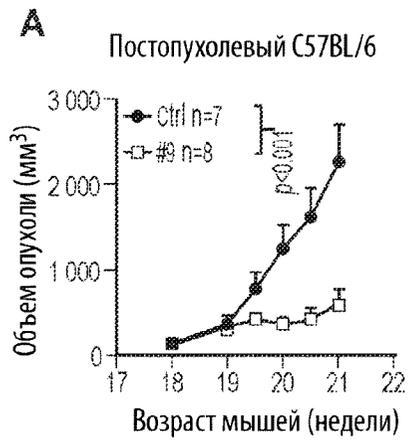
Фиг. 10А



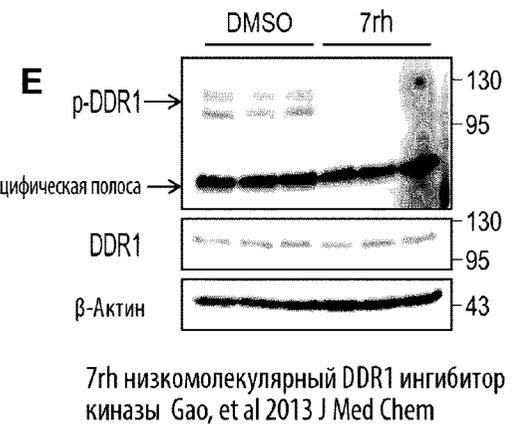
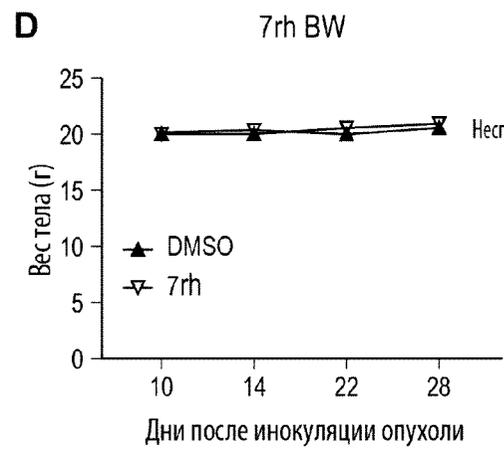
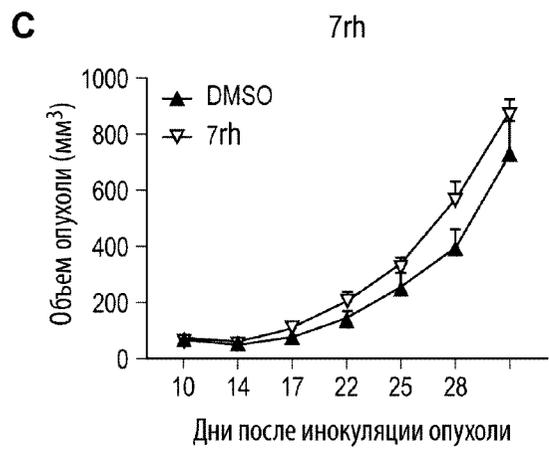
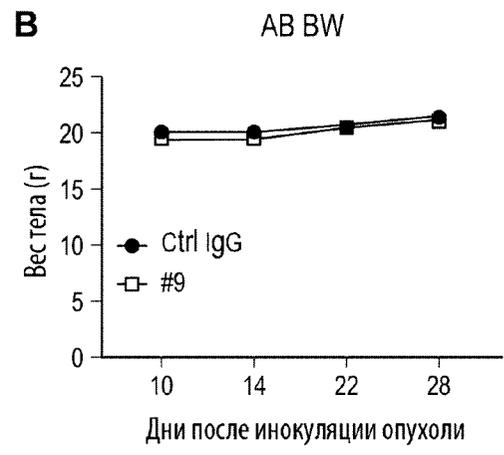
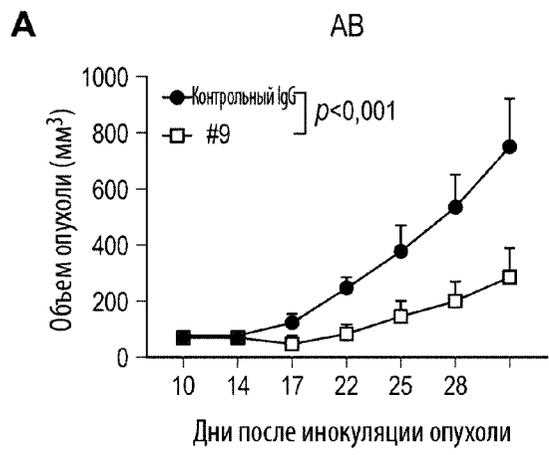
Фиг. 10В



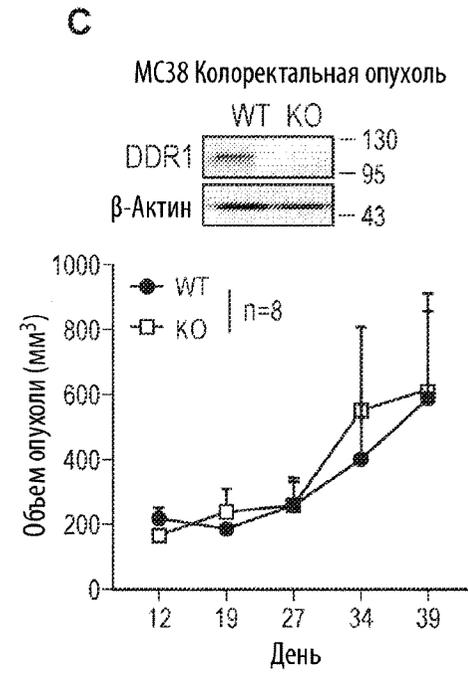
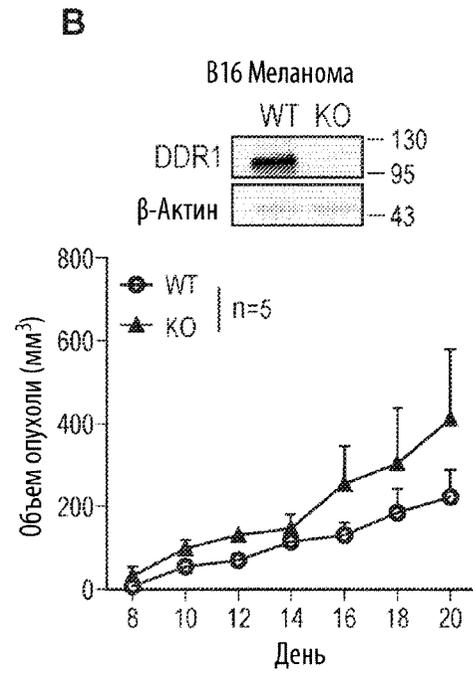
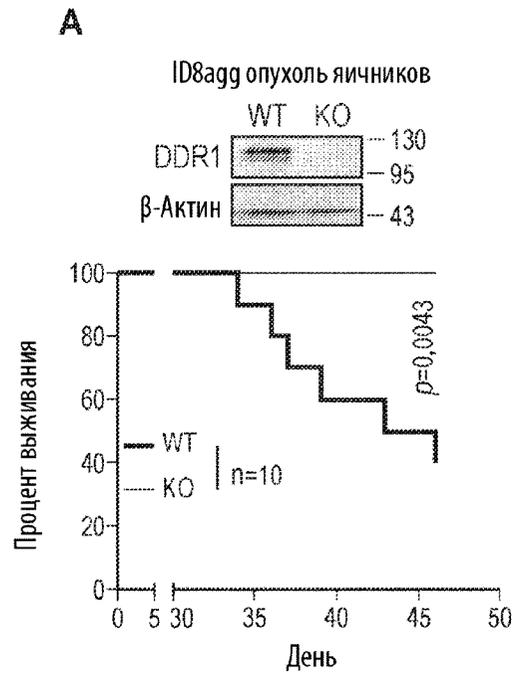
Фиг. 11



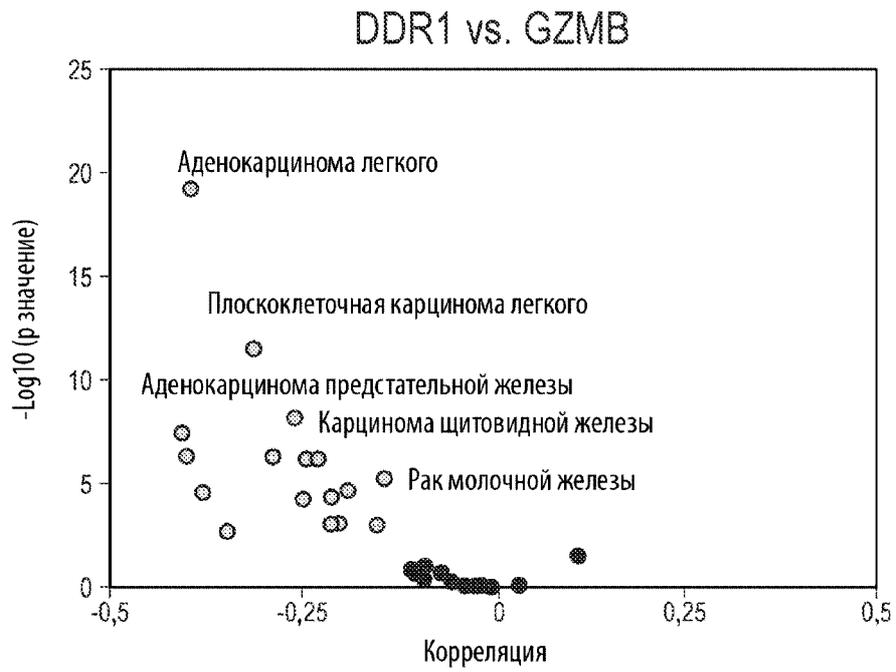
Фиг. 12A-C



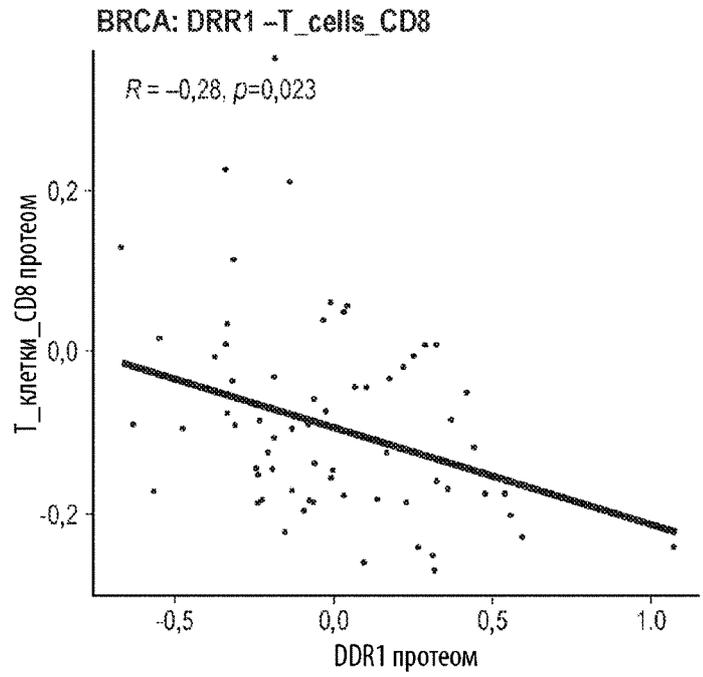
Фиг. 13А-Е



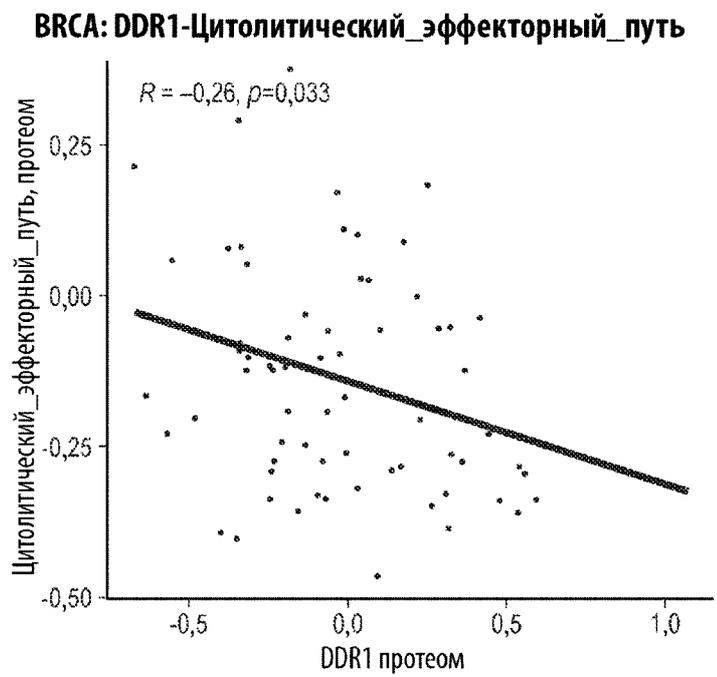
Фиг. 14А-С



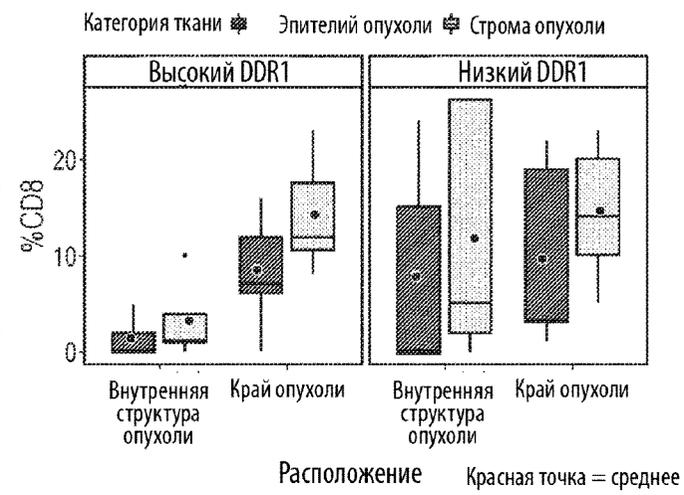
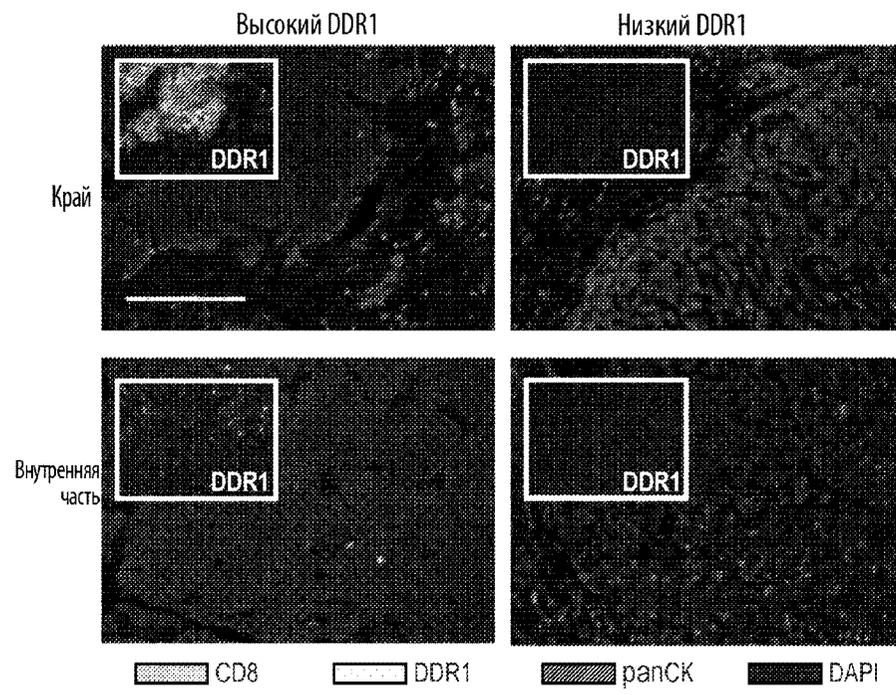
Фиг. 15А



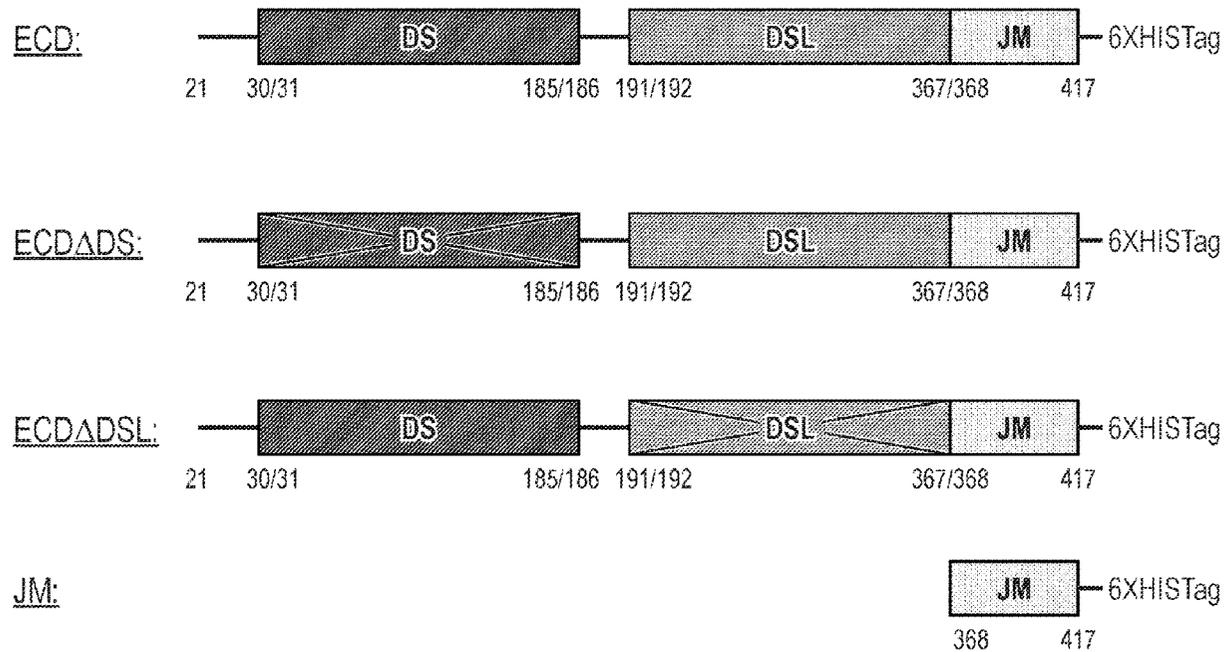
Фиг. 15В



Фиг. 15С

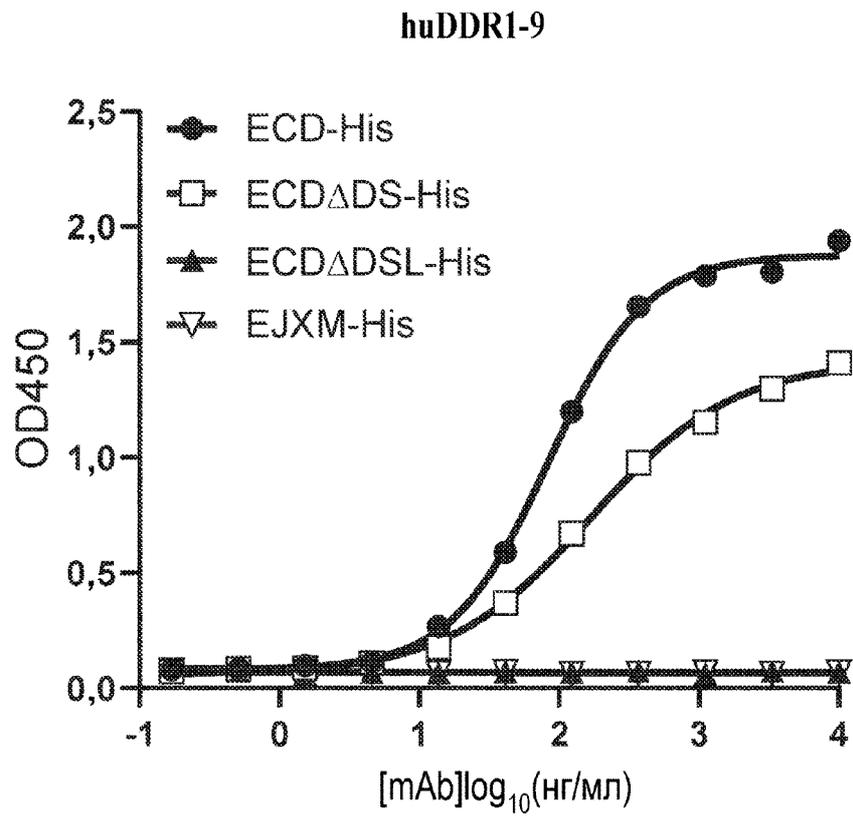


Фиг. 16

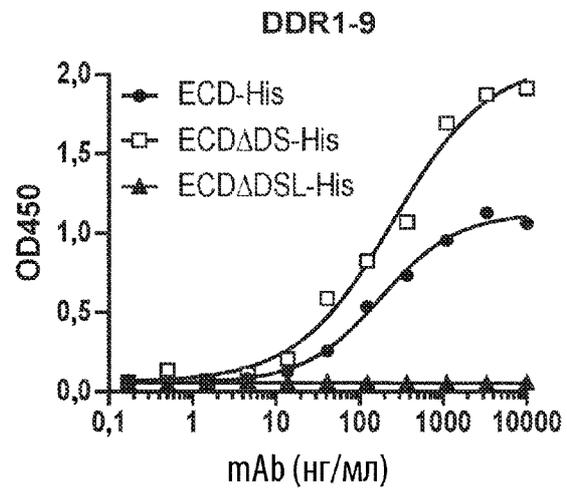


18/21

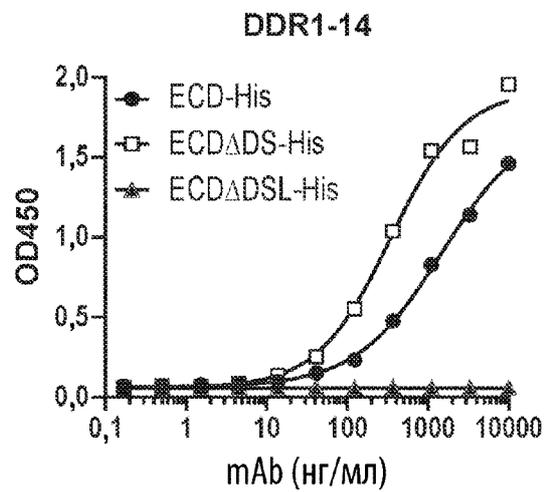
Фиг. 17



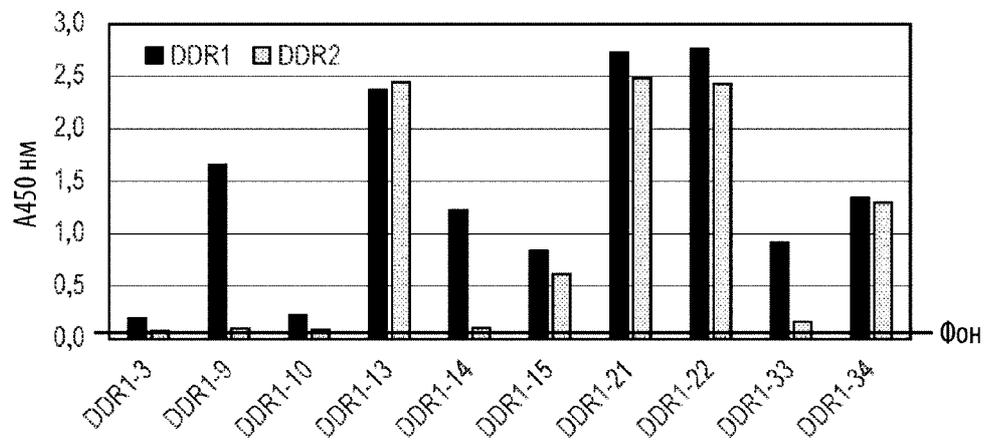
Фиг. 18А



Фиг. 18В



Фиг. 18С



Фиг. 19