(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292208 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.15

(22) Дата подачи заявки
2021.01.28

(51) Int. Cl. ***C07K 16/12*** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА К CD28 И ИХ МУЛЬТИВАЛЕНТНЫЕ И МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ

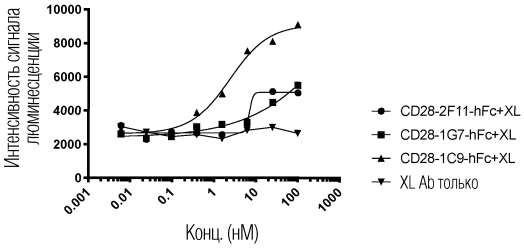
(31) **62/967,533**
(32) **2020.01.29**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/015590**
(87) **WO 2021/155071 2021.08.05**

(71) Заявитель:
ИНХИБРКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Тиммер Джон К., Джексон Рутгер Х., Виллис Кетлин М., Крейго Уилльям С., Каплан Майкл Д., Экельман Брендан П. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении представлены связывающиеся полипептиды, которые специфически связываются с CD28. Более конкретно, в изобретении представлены слитые белки, включающие мультивалентные и/или мультиспецифические конструкции, которые связываются с, по меньшей мере, CD28. Также представлены фармацевтические композиции, содержащие полипептиды, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды, и их векторы и способы применения и применения представленных CD28-связывающих полипептидов для лечения заболеваний и состояний, таких как рак.



202292208 A1

202292208 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575159EA/042

ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА К CD28 И ИХ МУЛЬТИВАЛЕНТНЫЕ И МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке США № 62/967533, поданной 29 января 2020 г., озаглавленной "ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА К CD28 И ИХ МУЛЬТИВАЛЕНТНЫЕ И МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ", содержание которой включено посредством ссылки во всей полноте для всех целей.

Включение перечня последовательностей посредством ссылки

[0001] Настоящая заявка подается вместе с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен как файл, озаглавленный 744952001540SeqList.TXT, созданный 28 января 2021 г., который имеет размер 327680 байт. Информация в электронном формате Перечня последовательностей включена посредством ссылки во всей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

[0002] В настоящем раскрытии в основном представлены связывающиеся полипептиды, которые специфически связываются с кластером дифференциации 28 (CD28). Более конкретно, изобретение относится к слитым белкам, включая мультивалентные и/или мультиспецифические конструкции, которые связываются с по меньшей мере CD28. В настоящем раскрытии также представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды, и их векторы и способы применения и применения представленных CD28-связывающих полипептидов для лечения заболеваний и состояний, таких как рак.

Предпосылки создания изобретения

[0003] Кластер дифференциации 28 (CD28) представляет собой гомодимерный трансмембранный гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов (Ig), экспрессируемый преимущественно Т-клеточными линиями. CD28 обеспечивает костимулирующий сигнал, который вовлечен в активацию и выживание Т-клеток. Роль Т-клеток против различных типов рака у человека делает CD28 желаемой терапевтической мишенью. Однако некоторые агонисты CD28 приводят к существенной токсичности in vivo. Поэтому существует потребность в улучшенных терапевтических молекулах, направленно воздействующих на CD28. В настоящей заявке представлены варианты осуществления, которые удовлетворяют такие потребности.

Сущность изобретения

[0004] В настоящей заявке представлены CD28-связывающие полипептиды, имеющие по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), имеющую аминокислотную последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197.

[0005] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит: CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2,

включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; или CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197.

[0006] Также в настоящей заявке представлены CD28-связывающие полипептиды, имеющие по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 190, 193, 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3),

включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197, 396, 397 и 398.

[0007] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит: CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2,

включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, включающую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

[0008] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах

осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, включающую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и

CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2,

включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

[0009] Также в настоящей заявке представлены CD28-связывающие полипептиды, имеющие по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197.

[0010] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит: CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ

ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2,

имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; или CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197.

[0011] Также в настоящей заявке представлены CD28-связывающие полипептиды, содержащие по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 190, 193, 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197, 396, 397 и 398.

[0012] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит: CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2,

включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и

CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

[0013] Также в настоящей заявке представлены CD28-связывающие полипептиды, содержащие по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где CD28 VHH домен содержит: CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:220; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:239; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:280.

[0014] Также в настоящей заявке представлены CD28-связывающие полипептиды, содержащие по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере один CD28 sdAb (CD28 VHH) домен включает: CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной

последовательности, представленной в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:220; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:239; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:280; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:342; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной

последовательности, представленной в SEQ ID NO:343; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:347; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:353; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:354; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:356; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:360; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:362; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:370; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной

последовательности, представленной в SEQ ID NO:373; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:377; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:384; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

[0015] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:186. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:187. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:213. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:214. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:215. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:216. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:217. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:218. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1,

CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:219. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:220. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:221. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:222. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:223. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:224. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:225. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:226. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:227. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:228. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:229. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:230. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:231. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:232. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:233. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:234. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:235. В некоторых вариантах

осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:236. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:237. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:238. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:239. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:342. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:343. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:347. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO:353. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:354. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:356. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:360. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:362. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1,

CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:370. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:373. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:377. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:384; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

[0016] Также в настоящей заявке представлены CD28-связывающие полипептиды, содержащие по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28 (CD28 VHH), где CD28 VHH домен содержит: CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся

в VHH, представленном в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:239; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:280.

[0017] Также в настоящей заявке представлены CD28-связывающие полипептиды, содержащие по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере один CD28 sdAb (CD28 VHH) домен включает: CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной

последовательности, представленной в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:239; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:280; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:342; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:343; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной

последовательности, представленной в SEQ ID NO:347; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:353; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:354; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:356; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:360; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:362; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:370; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:373; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной

последовательности, представленной в SEQ ID NO:377; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:384; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

[0018] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280.

[0019] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385.

[0020] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:186. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:187. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:213. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:214. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:215. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:216. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:217. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:218. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:219. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:221. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:222. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:223. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:224. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:225. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:226. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:227. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:228. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:229. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:230. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:231. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:232. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:233. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:234. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:235. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:236. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:237. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:238. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:239. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:342. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:343. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:344. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:345. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:346. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:347. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:348. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:349. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:350. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:351. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:352. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:353. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:354. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:355. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:356. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:357. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:358. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:359. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:360. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:361. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:362. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:363. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:364. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:365. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:366. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:367. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:368. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:369. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:370. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:371. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:372. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:373. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:374. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:375. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:376. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:377. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:378. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:379. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:380. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:381. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:382. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:383. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:384. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 385.

[0021] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280.

[0022] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215,

216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385.

[0023] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 186, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:186 или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 186. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 186. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит гуманизированный вариант SEQ ID NO:186. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 186. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189; CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190; и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191.

[0024] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 187, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:187 или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 187. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 187. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит гуманизированный вариант SEQ ID NO:187. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 187. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192; CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193; и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194.

[0025] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 188, (ii)

гуманизированный вариант SEQ ID NO:188 или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 188. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 188. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит гуманизированный вариант SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 188.

[0026] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:197, 396, 397 и 398.

[0027] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные in: SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и

197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 386 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 387 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 390 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 391 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 392 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 393 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 394 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 395 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 195, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 397, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 206 и 398, соответственно.

[0028] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385.

[0029] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей

мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:197, 396, 397 и 398.

[0030] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 386 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 387 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 390 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 391 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 392 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 393 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 394 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 395 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 195, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 389 и 197,

соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 397, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 206 и 398, соответственно.

[0031] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 213-219, 221-239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280.

[0032] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385.

[0033] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно sdAb представляет собой одно CD28 sdAb и/или CD28-связывающий полипептид является одновалентным для CD28. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно sdAb представляет собой одно CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид является одновалентным для CD28. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно sdAb представляет собой одно CD28 sdAb и CD28-связывающий полипептид является одновалентным для CD28.

[0034] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно sdAb представляет собой два, три или четыре CD28 sdAb, и/или CD28-связывающий полипептид является мультивалентным для CD28. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно sdAb представляет собой два CD28 sdAb и/или CD28-связывающий полипептид является двухвалентным для CD28. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно sdAb представляет собой два CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид является двухвалентным для CD28. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно sdAb представляет собой два CD28 sdAb и CD28-связывающий полипептид является двухвалентным для CD28. В некоторых вариантах осуществления два CD28 sdAb являются одинаковыми CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления оба из CD28 sdAbs содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления каждый из двух CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления оба из CD28 sdAbs содержат аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:220. В некоторых вариантах осуществления каждый из двух CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220. В некоторых вариантах осуществления оба из CD28 sdAbs содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280. В некоторых вариантах осуществления каждый из двух CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280. В некоторых вариантах осуществления два CD28 sdAb являются разными CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления одно из двух CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, а другое из двух CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220. В некоторых вариантах осуществления одно из двух CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, а другое из двух CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280. В некоторых вариантах осуществления одно из двух CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220, а другое из двух CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280.

[0035] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид включает фрагмент, который связывается с белком A. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную модификацию, которая уменьшает связывание с белком A. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная модификация G65D, в соответствии с Kabat, в каркасной области 3 (FR3).

[0036] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид содержит Fc-область иммуноглобулина.

[0037] Также в настоящей заявке представлены анти-CD28 sdAb-Fc слитые белки, содержащие любой из CD28-связывающих полипептидов, описанных в настоящей заявке, и Fc-область иммуноглобулина.

[0038] В некоторых вариантах осуществления Fc-область связана связывающим пептидом (LP) с по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb связано связывающим пептидом (LP) с Fc-областью на N-конце Fc-области. В некоторых вариантах осуществления LP представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления LP представляет собой пептид длиной примерно от 1 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид содержит от N-конца к C-концу: (CD28 sdAb)-LP-Fc. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид содержит от N-конца к C-концу: (CD28 sdAb)-LP-(CD28 sdAb)-LP-Fc.

[0039] В некоторых вариантах осуществления C28-связывающий полипептид представляет собой димер.

[0040] В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой

гомодимерную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13. В некоторых вариантах осуществления Fc-область состоит из последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления Fc-область состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 8.

[0041] В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой гетеродимерную Fc-область.

[0042] В некоторых вариантах осуществления Fc-область демонстрирует эффекторную функцию.

[0043] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают связывание с эффекторной молекулой. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают связывание с эффекторной молекулой, выбранной из Fc-гамма рецептора и C1q. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают связывание с Fc-гамма рецептором. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают связывание с C1q. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию Glu233. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию Leu234. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию Leu235. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит

последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления Fc-область состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 9.

[0044] В настоящей заявке представлены гомодимерные Fc слитые белки, содержащие две идентичные копии любого из анти-CD28 sdAb-Fc слитых белков, описанных в настоящей заявке.

[0045] Также в настоящей заявке представлены гетеродимерные Fc-слитые белки, содержащие любые два из анти-CD28 sdAb-Fc слитых белков, описанных в настоящей заявке.

[0046] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид содержит один или более связывающих доменов, которые связываются с целевым антигеном, отличным от CD28. В некоторых вариантах осуществления один или более связывающих доменов представляют собой одно или более однодоменных антител (sdAb), которые связываются с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA).

[0047] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид включает фрагмент, который связывается с белком A.

[0048] Также в настоящей заявке представлены мультиспецифические связывающие полипептиды, включающие любой из представленных анти-CD28 sdAb-Fc слитых белков и один или более связывающих доменов (BD), которые связываются с целевым антигеном, отличным от CD28.

[0049] В некоторых вариантах осуществления один или более BD представляют собой один BD. В некоторых вариантах осуществления один или более BD представляют собой два, три, четыре или более BD. В некоторых вариантах осуществления один или более BD представляют собой два BD. В некоторых вариантах осуществления один или более BD представляют собой три BD. В некоторых вариантах осуществления один или более BD представляют собой четыре BD.

[0050] В некоторых вариантах осуществления один или более связывающих доменов (BD) связываются с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA). В некоторых вариантах осуществления один или более связывающих доменов (BD) связываются с маркером активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления один или более связывающих доменов (BD) связываются с маркером истощения Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления один или более связывающих доменов (BD) связываются с маркером микроокружения опухоли (TME). В некоторых вариантах осуществления один или более связывающих доменов (BD) представляют собой однодоменное антитело. В некоторых вариантах осуществления один или более связывающих доменов (BD) представляют собой однодоменное антитело, которое связывается с TAA.

[0051] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий

полипептид представляет собой Fc-слитый белок, где по меньшей мере один из одного или более BD и/или по меньшей мере одно CD28 sdAb связаны с Fc-областью иммуноглобулина.

[0052] В настоящей заявке представлен мультиспецифический Fc-слитый белок, включающий любой из представленных мультиспецифических связывающих полипептидов и Fc-область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий полипептид представляет собой Fc-слитый белок, где по меньшей мере один из одного или более BD и/или по меньшей мере одно CD28 sdAb связаны с Fc-областью иммуноглобулина.

[0053] В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок содержит от N-конца к C-концу: один или более BD, которые связываются с целевым антигеном, отличным от CD28; по меньшей мере один CD28-связывающий домен, включающий sdAb, которое связывается с CD28; и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из одного или более BD соединен связывающим пептидом (LP) с по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид содержит от N-конца к C-концу: (BD)-LP-(CD28 sdAb)-LP-Fc.

[0054] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий полипептид представляет собой димер.

[0055] В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой гомодимерную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 8.

[0056] В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой гетеродимерную Fc-область.

[0057] В некоторых вариантах осуществления Fc-область демонстрирует эффекторную функцию.

[0058] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые

уменьшают связывание с эффекторной молекулой, выбранной из Fc-гамма рецептора или C1q. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают связывание с Fc-гамма рецептором. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают связывание с C1q. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию Glu233. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию Leu234. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию Leu235. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления Fc-область состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 9.

[0059] В любом из представленных вариантов осуществления связывающий домен (BD) связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из: 1-92-LFA-3, 2B4, 5T4, интегрина альфа-4, интегрина альфа-V, интегрина альфа4бета1, интегрина альфа4бета7, альфа-SMA, AGR2, анти-Lewis-Y, рецептора апелина J, APRIL, B7-H3, B7-H4, BAFF, BTLA, комплемента C5, C-242, CA9, CA19-9, (Lewis a), карбоангидразы 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD69, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD107a, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD137, CD138, CD160, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), КЛАУДИН-3, КЛАУДИН-4, cMet, коллагена, Cripto, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, рецептора эндотелина B (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, F протеина RSV, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT-3, рецептора фолата альфа (FRальфа), FSP-1, GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, рецепторов GP IIb/IIIa, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HLA-DR, HVEM, гиалуронидазы, ICOS, IFNальфа, IFNбета, IFNгамма, IgE, рецептора IgE (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12Rбета1, IL13, IL13R, IL13Ra2, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, акцессорного белка рецептора IL1 (IL1RAP), инсулинового

рецептора, Jagged лигандов, Jagged 1, Jagged 2, KISS1-R, KLRG1, LAG-3, LIF-R, Lewis X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, мезотелина, MRP4, MUC1, Муцин-16 (MUC16, CA-125), Na/K АТФазы, NGF, никастрина, рецепторов Notch, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFRальфа, PDGFRбета, PD-1, PD-L1, PD-L2, фосфатидил-серина, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, Siglec15, сфингозин 1 фосфата, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGFбета, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNFальфа, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, трансферрина, рецептора трансферрина, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2 и WISP-3.

[0060] В некоторых вариантах осуществления маркер активации Т-клеток выбран из CD25, CD44, CD69, CD71, CD107a, CD137, HLA-DR и/или KLRG1. В некоторых вариантах осуществления маркер истощения Т-клеток выбран из 2B4, CD160, LAG3, PD-1 и/или TIGIT. В некоторых вариантах осуществления маркер микроокружения опухоли выбран из альфа-SMA, EDB, FAP, FSP-1, PDGFRальфа и/или PDGFRбета.

[0061] В некоторых вариантах осуществления один или более TAA BD представляет собой один TAA BD и/или мультиспецифический связывающий полипептид является одновалентным для TAA. В некоторых вариантах осуществления один или более TAA BD представляют собой два, три или четыре TAA BD, и/или мультиспецифический связывающий полипептид является мультивалентным для одного или более TAA. В некоторых вариантах осуществления один или более TAA BD представляют собой два TAA BD, и/или мультиспецифический связывающий полипептид является двухвалентным для одного или более TAA. В некоторых вариантах осуществления два TAA BD являются однодоменными антителами (sdAb), и два sdAb являются одинаковыми TAA sdAb. В некоторых вариантах осуществления два TAA BD являются однодоменными антителами (sdAb), и два sdAb являются разными TAA sdAb, которые связываются с одним и тем же TAA. В некоторых вариантах осуществления разные TAA sdAb связываются с разными эпитопами одного и того же TAA. В некоторых вариантах осуществления два TAA BD являются однодоменными антителами (sdAb), и два sdAb являются разными TAA sdAb, которые связываются с разными TAA.

[0062] Также в настоящей заявке представлены гомодимерные мультиспецифические Fc слитые белки, содержащие две идентичные копии любого из представленных мультиспецифических полипептидов.

[0063] Также в настоящей заявке представлены гетеродимерные мультиспецифические Fc слитые белки, содержащие любые два из представленных мультиспецифических полипептидов.

[0064] В любом из представленных вариантов осуществления Fc-слитый белок содержит связывающий пептид между по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb и Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок содержит связывающий пептид (LP) между по меньшей мере одним из одного или

более BD и Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления линкер является нерасщепляемым. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептид длиной примерно от 1 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-7, 89, 90, 123-129, 244 и 249. В некоторых вариантах осуществления состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-7, 89, 90, 123-129, 244 и 249.

[0065] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb не способно, или по существу не способно, связываться или взаимодействовать с CD28, пока по меньшей мере один из одного или более BD не будет связан со своим антигеном. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb не способно, или по существу не способно, связываться или взаимодействовать с CD28, пока каждый из одного или более BD не будет связан со своим антигеном.

[0066] Также в настоящей заявке представлены CD28-связывающие полипептиды, содержащие от N-конца к C-концу: один или более антигенсвязывающих доменов, содержащих однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA); по меньшей мере один CD28-связывающий домен, содержащий sdAb, которое связывается с CD28; и Fc-область.

[0067] В любом из представленных вариантов осуществления по меньшей мере одно из одного или более TAA sdAb соединено связывающим пептидом (LP) с по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид содержит от N-конца к C-концу: (TAA sdAb)-LP-(CD28 sdAb)-LP-Fc.

[0068] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид представляет собой димер. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой гомодимерную Fc-область.

[0069] Также в настоящей заявке представлены CD28-связывающие полипептиды, содержащие, от N-конца к C-концу: один или более антигенсвязывающих доменов, имеющих однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA); по меньшей мере один CD28-связывающий домен, имеющий sdAb, которое связывается с CD28; и Fc-область, где CD28-связывающий полипептид представляет собой димер, содержащий гомодимерную Fc-область.

[0070] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13. В некоторых вариантах осуществления Fc-область состоит из последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческий IgG1. В некоторых вариантах

осуществления Fc-область представляет собой человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления Fc-область состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 8.

[0071] В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой гетеродимерную Fc-область.

[0072] В некоторых вариантах осуществления Fc-область демонстрирует эффекторную функцию.

[0073] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают связывание с эффекторной молекулой, выбранной из Fc-гамма рецептора или C1q. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают связывание с Fc-гамма рецептором. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают связывание с C1q. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию Glu233. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию Leu234. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию Leu235. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления Fc-область состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 9.

[0074] В любом из представленных вариантов осуществления TAA выбран из группы, состоящей из: 1-92-LFA-3, 5T4, интегрина альфа-4, интегрина альфа-V, интегрина альфа4бета1, альфа4бета7 интегрин, AGR2, анти-Lewis-Y, рецептора апелина J, APRIL, B7-H3, B7-H4, BAFF, BTLA, комплемента C5, C-242, CA9, CA19-9, (Lewis a), карбоангидразы 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27,

CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD137, CD138, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), КЛАУДИН-3, КЛАУДИН-4, cMet, коллагена, Cripto, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, рецептора эндотелина B (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, F белка RSV, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT-3, рецептора фолата альфа (FRальфа), GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, рецепторов GP IIb/IIIa, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HVEM, гиалуронидазы, ICOS, IFNальфа, IFNбета, IFNгамма, IgE, рецептора IgE (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12Rбета1, IL13, IL13R, IL13Ra2, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, рецептора акцессорного белка IL1 (IL1RAP), инсулинового рецептора, Jagged лигандов, Jagged 1, Jagged 2, KISS1-R, LAG-3, LIF-R, Lewis X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, мезотелина, MRP4, MUC1, муцина-16 (MUC16, CA-125), Na/K АТФазы, NGF, никастрина, рецепторов Notch, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFRальфа, PDGFRбета, PD-1, PD-L1, PD-L2, фосфатидил-серина, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, Siglec15, сфингозин 1 фосфата, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGFбета, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNFальфа, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, трансферрина, рецептора трансферрина, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2 и WISP-3.

[0075] В некоторых вариантах осуществления одно или более TAA sdAb представляют собой одно TAA sdAb. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид является одновалентным для TAA. В некоторых вариантах осуществления одно или более TAA sdAb представляют собой два, три или четыре TAA sdAb. В некоторых вариантах осуществления одно или более TAA sdAb представляют собой два TAA sdAb. В некоторых вариантах осуществления одно или более TAA sdAb представляют собой три TAA sdAb. В некоторых вариантах осуществления одно или более TAA sdAb представляют собой четыре TAA sdAb. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид является мультивалентным для одного или более TAA. В некоторых вариантах осуществления одно или более TAA sdAb представляют собой два TAA sdAb. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид является двухвалентным для TAA. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид является двухвалентным для одного или более TAA. В некоторых вариантах осуществления два TAA sdAb являются одинаковыми TAA sdAb. В некоторых вариантах осуществления два TAA sdAb являются разными TAA sdAb, которые связываются с одним и тем же TAA. В некоторых вариантах

осуществления TAA sdAb связываются с разными эпитопами одного и того же TAA. В некоторых вариантах осуществления два TAA sdAb являются разными TAA sdAb, которые связываются с разными TAA.

[0076] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид содержит связывающий пептид (LP) между по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb и Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид содержит связывающий пептид (LP) между по меньшей мере одним из одного или более TAA sdAb и Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления LP представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления LP представляет собой пептид длиной примерно от 1 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления LP представляет собой или содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:1-7, 89, 90, 123-129, 244 и 249.

[0077] В любом из представленных вариантов осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb не способно, или по существу не способно, связываться или взаимодействовать с CD28, пока по меньшей мере одно из одного или более TAA sdAb не будет связано со своим TAA. В любом из представленных вариантов осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb не способно связываться или взаимодействовать с CD28, пока по меньшей мере одно из одного или более TAA sdAb не будет связано со своим TAA. В любом из представленных вариантов осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb не способно по существу связываться или взаимодействовать с CD28, пока по меньшей мере одно из одного или более TAA sdAb не будет связано со своим TAA. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb не способно, или по существу не способно, связываться или взаимодействовать с CD28, пока каждое из одного или более TAA sdAb не будет связано со своим TAA. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb не способно связываться или взаимодействовать с CD28, пока каждое из одного или более TAA sdAb не будет связано со своим TAA. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb по существу не способно связываться или взаимодействовать с CD28, пока каждое из одного или более TAA sdAb не будет связано со своим TAA.

[0078] В любом из представленных вариантов осуществления CD-28 связывающий полипептид не содержит CD3-связывающей области. В некоторых вариантах осуществления слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc не содержит CD3-связывающей области. В некоторых вариантах осуществления гомодимерный Fc-слитый белок не содержит CD3-связывающей области. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок не содержит CD3-связывающей области. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий полипептид не содержит CD3-связывающей области. В некоторых вариантах осуществления гомодимерный мультиспецифический связывающий полипептид не содержит CD3-связывающей области. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный мультиспецифический связывающий

полипептид не содержит CD3-связывающей области. В некоторых вариантах осуществления слитый белок не содержит CD3-связывающей области.

[0079] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид включает CD3-связывающую область.

[0080] В настоящей заявке представлены CD28-связывающие полипептиды, содержащие по меньшей мере одно CD28 sdAb и CD3-связывающую область.

[0081] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 190, 193, 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194, 197, 396, 397 и 398.

[0082] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит: CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и

CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; или CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197.

[0083] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2,

содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, содержащую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197 CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

[0084] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb

содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах

осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO:396. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

[0085] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 190, 193, 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194, 197, 396, 397 и 398.

[0086] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит: CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:398; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197 CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

[0087] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит: CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; или CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197.

[0088] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb (CD28 VHH) содержит: CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID

NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:220; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:239; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:280.

[0089] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb (CD28 VHH) содержит: CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3,

содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:220; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:239; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:280; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:342; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:343; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:347; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:353; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:354; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной

последовательности, представленной в SEQ ID NO:356; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:360; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:362; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:370; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:373; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:377; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:384; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

[0090] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:186. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:187. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:213. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:214. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:215. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:216. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:217. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:218. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:219. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:220. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:221. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:222. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:223. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:224. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:225. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3,

содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:226. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:227. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:228. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:229. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:230. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:231. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:232. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:233. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:234. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:235. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:236. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:237. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:238. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:239. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:342. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:343. В некоторых вариантах осуществления по меньшей

мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:347. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:353. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:354. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:356. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в

SEQ ID NO:360. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:362. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:370. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:373. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3,

содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:377. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 sdAb домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:384; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

[0091] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb (CD28 VHH) содержит: CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3,

содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:239; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:280.

[0092] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb (CD28 VHH) содержит: CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3,

содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:239; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:280; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:342; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:343; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:347; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:353; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:354; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:356; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:360; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:362; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO:370; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:373; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:377; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:384; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

[0093] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385.

[0094] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:186. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:187. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:213. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:214. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:215. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:216. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:217. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:218. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:219. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:221. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:222. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:223. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:224. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:225. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:226. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:227. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:228. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:229. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:230. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:231. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:232. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:233. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:234. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:235. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:236. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:237. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:238. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:239. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:342. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:343. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:344. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:345. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:346. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:347. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:348. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:349. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:350. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:351. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:352. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:353. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:354. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:355. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:356. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:357. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:358. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:359. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:360. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:361. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:362. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:363. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:364. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:365. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:366. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:367. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:368. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:369. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:370. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:371. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:372. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:373. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:374. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:375. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:376. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:377. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:378. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:379. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:380. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:381. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:382. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:383. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:384. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO:и 385.

[0095] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385.

[0096] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 186, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:186, или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 186. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 186. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит гуманизированный вариант SEQ ID NO:186. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb

содержит последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 186. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189; CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190; и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191.

[0097] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 187, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:187, или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 187. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 187. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит гуманизированный вариант SEQ ID NO:187. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 187. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192; CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193; и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194.

[0098] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 188, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:188, или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 188. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 188. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит гуманизированный вариант SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 188.

[0099] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, имеющую аминокислотную

последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:197, 396, 397 и 398.

[0100] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 386 и 197, соответственно;SEQ ID NO: 201, 387 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 390 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 391 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 392 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 393 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 398,

соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 394 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 395 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 195, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 397, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 206 и 398, соответственно.

[0101] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 213-239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 213-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 213-239 и 280.

[0102] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 213-239, 280 и 342-385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 213-239, 280 и 342-385. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 213-239, 280 и 342-385.

[0103] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 197. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 197, 396, 397 и 398.

[0104] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197,

соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 386 и 197, соответственно;SEQ ID NO: 201, 387 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 390 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 391 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 392 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 393 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 394 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 395 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 195, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 397, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 206 и 398, соответственно.

[0105] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 213-219, 221-239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 213-219, 221-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 213-239, 280 и 342-385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 213-239, 280 и 342-385. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385.

[0106] В любом из представленных вариантов осуществления CD28-связывающий полипептид содержит CD3-связывающую область. В некоторых вариантах осуществления слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc включает CD3-связывающую область. В некоторых вариантах осуществления гомодимерный Fc-слитый белок включает CD3-связывающую область. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc-слитый белок включает CD3-связывающую область. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий полипептид включает CD3-связывающую область. В некоторых вариантах осуществления гомодимерный мультиспецифический связывающий полипептид включает CD3-связывающую область. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный мультиспецифический связывающий полипептид включает CD3-связывающую область. В некоторых вариантах осуществления слитый белок включает CD3-связывающую область.

[0107] В настоящей заявке представлена мультиспецифичесая конструкция, содержащая по меньшей мере одно из представленных sdAb, один или более связывающих доменов (BD), которые связываются с антигеном, отличным от CD28, и CD3-связывающую область. В некоторых вариантах осуществления BD связывается с опухоль-ассоциированным (антигеном). В некоторых вариантах осуществления BD представляет собой однодоменное антитело.

[0108] В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область связывается с CD3 (CD3ε). В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область представляет собой анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область представляет собой анти-CD3 антитело. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область представляет собой антигенсвязывающий фрагмент анти-CD3 антитела. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область является одновалентной. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область представляет собой вариабельный фрагмент (Fv), включающий вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент не является одноцепочечным антителом. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент не является одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv).

[0109] В любом из представленных вариантов осуществления CD28-связывающий полипептид содержит Fc-область иммуноглобулина. В некоторых вариантах

осуществления Fc-область представляет собой гомодимерную Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13. В некоторых вариантах осуществления Fc-область состоит из последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления Fc-область состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 8.

[0110] В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой гетеродимерную Fc-область.

[0111] В некоторых вариантах осуществления Fc-область демонстрирует эффекторную функцию.

[0112] В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают связывание с эффекторной молекулой. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают связывание с эффекторной молекулой, выбранной из Fc-гамма рецептора и C1q. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают связывание с Fc-гамма рецептором. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит полипептид, имеющий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают связывание с C1q. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию Glu233. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию Leu234. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций представляют собой

делецию Leu235. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9 или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления Fc-область состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 9.

[0113] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид представляет собой димер. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой гетеродимерный Fc, и VH и VL, которые составляют анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, связаны с противоположными полипептидами гетеродимерной Fc.

[0114] В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область не способна, или по существу не способна, связываться или взаимодействовать с CD3, пока по меньшей мере одно из по меньшей мере одного CD28 sdAb не будет связано с CD28. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область не способна связываться или взаимодействовать с CD3, пока по меньшей мере одно из по меньшей мере одного CD28 sdAb не будет связано с CD28. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область по существу не способна связываться или взаимодействовать с CD3, пока по меньшей мере одно из по меньшей мере одного CD28 sdAb не будет связано с CD28. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область не способна, или по существу не способна, связываться или взаимодействовать с CD3, пока по меньшей мере одно из одного или более TAA sdAb не будет связано со своим TAA. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область не способна связываться или взаимодействовать с CD3, пока по меньшей мере одно из одного или более TAA sdAb не будет связано со своим TAA. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область по существу не способна связываться или взаимодействовать с CD3, пока по меньшей мере одно из одного или более TAA sdAb не будет связано со своим TAA.

[0115] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид включает фрагмент, который связывается с белком A.

[0116] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную модификацию, которая уменьшает связывание с белком A. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную модификацию G65D, в соответствии с Kabat, в каркасной области 3 (FR3).

[0117] Также в настоящей заявке представлены анти-CD28 однодоменные антитела, содержащие определяющую комплементарность область 1 (CDR1), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 190, 193, 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197, 396, 397 и 398.

[0118] Также в настоящей заявке представлены анти-CD28 sdAb, содержащие определяющую комплементарность область 1 (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 190, 193, 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197, 396, 397 и 398.

[0119] В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO:211, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO:388, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO:204, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO:196, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

[0120] В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:186. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:187. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:213. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:214. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:215. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:216. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:217. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:218. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:219. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb

содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:221. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:222. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:223. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:224. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:225. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:226. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:227. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:228. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:229. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:230. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:231. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:232. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:233. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:234. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:235. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:236. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:237. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:238. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:239. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:342. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:343. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:344. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:345. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb

содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:346. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:347. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:348. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:349. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:350. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:351. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:352. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:353. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:354. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:355. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:356. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:357. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:358. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:359. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:360. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:361. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:362. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:363. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:364. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:365. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:366. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:367. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:368. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:369. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb

содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:370. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:371. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:372. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:373. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:374. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:375. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:376. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:377. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:378. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:379. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:380. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:381. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:382. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:383. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:384. В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:и 385.

[0121] В некоторых вариантах осуществления анти-CD28 sdAb является выделенным. В некоторых вариантах осуществления анти-CD28 sdAb является очищенным.

[0122] В некоторых вариантах осуществления CD28 sdAb включает аминокислотную модификацию, которая уменьшает связывание с белком A. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную модификацию, которая уменьшает связывание с белком A. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную модификацию G65D, в соответствии с Kabat, в каркасной области 3 (FR3).

[0123] В настоящей заявке представлен полинуклеотид(полинуклеотиды), кодирующий любое из анти-CD28 sdAbs, CD28-связывающих полипептидов, слитых белков и мультиспецифических связывающих полипептидов и мультиспецифических конструкций, описанных в настоящей заявке.

[0124] Также в настоящей заявке представлен полинуклеотид, содержащий первую

нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую первый полипептид любого из CD28-связывающих полипептидов, представленных в настоящей заявке, и вторую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую второй полипептид CD28-связывающего полипептида. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая нуклеиновокислотные последовательности разделены внутренним сайтом входа в рибосому (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает пропуск рибосомы. Также в настоящей заявке представлен полинуклеотид, содержащий первую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую первый полипептид любого из CD28-связывающих полипептидов, представленных в настоящей заявке, и вторую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую второй полипептид мультиспецифической конструкции, где первая и вторая нуклеиновокислотные последовательности разделены внутренним сайтом входа в рибосому (IRES), или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает пропуск рибосомы.

[0125] Также в настоящей заявке представлен полинуклеотид, содержащий первую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую первый полипептид любого из слитых белков, представленных в настоящей заявке, и вторую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую второй полипептид слитого белка. Также в настоящей заявке представлен полинуклеотид, содержащий первую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую первый полипептид любого из мультиспецифических связывающих полипептидов, представленных в настоящей заявке, и вторую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую второй полипептид мультиспецифического связывающего полипептида. Также в настоящей заявке представлен полинуклеотид, содержащий первую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую первый полипептид любой из мультиспецифических конструкций, представленных в настоящей заявке, и вторую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую второй полипептид мультиспецифической конструкции.

[0126] В некоторых вариантах осуществления первая и вторая нуклеиновокислотные последовательности разделены внутренним сайтом входа в рибосому (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает пропуск рибосомы. В некоторых вариантах осуществления первая нуклеиновокислотная последовательность и вторая нуклеиновокислотная последовательность функционально связаны с одним и тем же промотором. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает пропуск рибосомы, выбрана из T2A, P2A, E2A и F2A.

[0127] В настоящей заявке представлен вектор, включающий любой из полинуклеотидов, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления

вектор представляет собой вирусный вектор или эукариотический вектор. В некоторых вариантах осуществления эукариотический вектор представляет собой вектор млекопитающего.

[0128] В настоящей заявке представлена клетка, содержащая любой из полинуклеотидов или полинуклеотидов, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку или природную киллерную (NK) клетку.

[0129] В настоящей заявке представлены способы получения полипептида, при этом способ включает введение в клетку любого полинуклеотида или полинуклеотидов, представленных в настоящей заявке, или любого вектора или векторов, представленных в настоящей заявке, и культивирование клетки в условиях для получения анти-CD28 sdAb, CD28-связывающего полипептида, слитого белка, мультиспецифического связывающего полипептида или мультиспецифической конструкции. В некоторых вариантах осуществления способ включает выделение и очистку полипептида из клетки. Также в настоящей заявке представлен полипептид, полученный любым из способов, описанных в настоящей заявке.

[0130] В настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, включающие любые из описанных анти-CD28 sdAbs, CD28-связывающих полипептидов, слитых белков, мультиспецифических связывающихся полипептидов и мультиспецифических конструкций. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является стерильной.

[0131] В настоящей заявке представлены способы стимуляции иммунного ответа у субъекта, при этом способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, любых из CD28 sdAbs, CD28-связывающих полипептидов, слитых белков, мультиспецифических связывающихся полипептидов и мультиспецифических конструкций или фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ повышается против опухоли или рака. В некоторых вариантах осуществления способ лечит заболевание или состояние у субъекта.

[0132] Также в настоящей заявке представлены способы лечения заболевания или состояния у субъекта, при этом способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества любого из анти-CD28 sdAbs, CD28-связывающих полипептидов, слитых белков, мультиспецифических связывающихся полипептидов и мультиспецифических конструкций или фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке.

[0133] Также в настоящей заявке представлены применения любого из анти-CD28 sdAbs, CD28-связывающих полипептидов, слитых белков, мультиспецифических связывающихся полипептидов и мультиспецифических конструкций или фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке. В настоящей заявке

представлены применения любого из представленных мультиспецифических связывающих полипептидов. В настоящей заявке представлены применения любой из представленных мультиспецифических конструкций. В настоящей заявке представлены применения любой из представленных фармацевтических композиций.

[0134] Также представлены композиции, включающие любые из анти-CD28 sdAb, CD28-связывающих полипептидов, слитых белков, мультиспецифических связывающих полипептидов и мультиспецифических конструкций, или фармацевтические композиции, описанные в настоящей заявке, для применения в лечении заболевания или состояния у субъекта. В настоящей заявке представлены композиции, включающие мультиспецифические связывающие полипептиды для применения в лечении заболевания или состояния у субъекта. В настоящей заявке представлены композиции, включающие мультиспецифические конъюгаты для применения в лечении заболевания или состояния у субъекта.

[0135] Также представлены любые из анти-CD28 sdAb, CD28-связывающих полипептидов, слитых белков, мультиспецифических связывающихся полипептидов и мультиспецифических конструкций или фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке, для применения для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния у субъекта. В настоящей заявке представлены композиции, включающие мультиспецифические связывающие полипептиды для применения для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния у субъекта. В настоящей заявке представлены композиции, включающие мультиспецифические конъюгаты для применения для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния у субъекта.

[0136] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой опухоль. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

Краткое описание чертежей

[0137] Фиг. **1** показывает способность CD28-нацеленных однодоменных антител формата sdAb-IgG1 связываться с CD28 клеточной поверхности. Связывание оценивали методом проточной цитометрии с использованием HEK293FS (293FS) клеток, транзиентно трансфицированных полноразмерным антигеном человека (hCD28) или обезьяны cynomolgus (cyCD28) (Фиг. **1A и 1B**, соответственно). В качестве отрицательного контроля также испытывали связывание с CD28-нетрансфицированными 293FS клетками (Фиг. **1C**). Однодоменное антитело 1C9 было сформатировано с Fc доменом, имеющим пониженную эффекторную функцию, в виде sdAb-xELL и испытано на связывание с Jurkat клетками или первичными Т-клетками, которые получали из PBMC, выделенных из цельной крови здорового донора (Фиг. **1D** и **1E**, соответственно), при этом оба типа клеток эндогенно экспрессируют CD28.

[0138] Фиг. **2A-I** показывают способность 1C9 и его гуманизированных вариантов связываться с CD28 клеточной поверхности. Связывание оценивали методом проточной цитометрии с использованием HEK293FS (293FS) клеток, транзиентно трансфицированных полноразмерным антигеном человека (hCD28) или обезьяны cynomolgus (cyCD28) (Фиг. **2A, B, D, E**), нетрансфицированных HEK293FS клеток (Фиг. **2C и 2F**), клеток Jurkat, которые эндогенно экспрессируют CD28 (Фиг. **2G-H**), или первичных Т-клеток, которые получали из PBMC, выделенных из цельной крови здорового донора (Фиг. **2I**).

[0139] Фиг. **3A** и **3B** представляют иллюстративные CD28-связывающие полипептиды с Fc доменами и без них, соответственно.

[0140] Фиг. **3C-3H** показывают способность иллюстративных образованных конструкций связываться с присутствующим на клеточной поверхности CD28, PDL1 и/или 5T4. Связывание оценивали методом проточной цитометрии с использованием HEK293FS (293FS) клеток, транзиентно PDL1- трансфицированных (Фиг. **3C**), T47D клеток, которые эндогенно экспрессируют 5T4 (Фиг. **3F**), Jurkat клеток, которые эндогенно экспрессируют CD28 (Фиг. **3D и 3G**), или Raji клеток, которые не экспрессируют PDL1, 5T4 или CD28 (Фиг. **3E и 3H**).

[0141] Фиг. **4A** показывает способность CD28-нацеленных однодоменных антител 1C12 и 1F10, но не 2F11, 1G7 и 1C9, формата бивалентных sdAb-IgG1 усиливать активацию репортерной клеточной линии на основе Jurkat, в которой продукция люциферазы управляется IL-2 промотором, посредством активирующего анти-CD3 антитела. Фиг. **4B** показывает способность поперечно-связанного (XL) 1C9-IgG1, представляющего собой мультимер 1C9 с валентностью больше чем 2, стимулировать репортерные клетки.

[0142] Фиг. **4C и 4D** показывают способность биспецифических белков TAAxCD28 проявлять агонизм в отношении CD28 на репортерных клетках CD3 (IL-2) Jurkat TAA-зависимым образом. Фиг. **4C** показывает способность cx694, биспецифической конструкции нацеленной на PDL1 и CD28, проявлять агонизм в отношении CD28 на репортерных клетках CD3 (IL-2) Jurkat PDL1-зависимым образом, что подтверждается повышенной активацией репортера в присутствии, но не в отсутствие, PDL1-положительных CHO-K1 клеток (Promega™). Моноспецифические конструкции, индивидуально нацеленные на PDL1 (cx1204) или CD28 (cx698), не приводили к существенному усилению активации репортерной клеточной линии по сравнению с необработанным контролем в присутствии или в отсутствие PDL1-экспрессирующей целевой клеточной линии. Фиг. **4D** показывает способность cx8390, биспецифической конструкции, нацеленной на 5T4 и CD28, проявлять агонизм в отношении CD28 на репортерных клетках CD3 (IL-2) Jurkat 5T4-зависимым образом, что подтверждается повышенной активацией репортера в присутствии, но не в отсутствие, 5T4-положительных T47D клеток. Обработка репортерных клеток отдельно или совместной культуры T47D клеток и репортерных клеток моноспецифическим белком,

нацеливающимся на CD28 (cx8394), не усиливало активацию репортерной клеточной линии по сравнению с необработанным контролем.

[0143] Фиг. **5** показывает способность cx694, биспецифической конструкции, нацеленной на PDL1 и CD28, индуцировать Т-клеточно-опосредованную цитотоксичность PDL1+ клеточной линии, A549 (Фиг. **5A** и **5C**), но не HEK293FS (293FS), PDL1- клеточной линии (Фиг. **5B** и **5D**), как было оценено по активации каспазы-3/7 с использованием системы визуализации клеток (Фиг. **5A и 5B**) и выживанию клеток с использованием анализа CellTiter-Glo (Фиг. **5C** и **5D**). Моноспецифические конструкции, индивидуально нацеленные на PDL1 (cx1204) или CD28 (cx698), не обладали цитотоксической активностью против A549 и 239FS клеток (Фиг. **5A-5D**).

[0144] Фиг. **6A-D** показывают способность cx694, биспецифического белка, нацеленного на PDL1 и CD28, индуцировать антиген-специфическую активацию CD4+ (Фиг. **6A-6C**) и CD8+ (Фиг. **6D**) Т-клеток, как было оценено методом проточной цитометрии в анализе маркеров активации CD25 (Фиг. **6A**), CD69 (Фиг. **6B** и **6D**) и CD71 (Фиг. **6C**). Моноспецифические конструкции, индивидуально нацеленные на PDL1 (cx1204) или CD28 (cx698), не активировали никакую субпопуляцию Т-клеток в присутствии любой клеточной линии-мишени. A549 и 293FS клетки использовали в качестве PDL1+ и PDL1- клеток, соответственно. Фиг. **6E** показывает отсутствие IFNγ продукции совместными культурами A549/Т-клеток, обработанными cx694. cx5185 представляет собой CD3-стимулирующий белок, который служил в качестве положительного контроля для эксперимента.

[0145] Фиг. **7A-7C** показывают способность биспецифических конструкций, нацеленных на PDL1 и CD28, к костимуляции первичных Т-клеток. Фиг. **7A** показывает способность cx8370, биспецифической конструкции, нацеленной на PDL1 и CD28, усиливать продукцию IFNγ, продуцируемого PBMC, обработанными CEF (цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр и вирус гриппа) пептидным пулом, как было оценено методом FluoroSpot. Моноспецифические конструкции, индивидуально нацеленные на PDL1 (cx1204) или CD28 (cx984), не влияли на уровень цитокинов, продуцируемых стимулированными PBMC. Фиг. **7B** и **7C** показывают способность cx694, биспецифической конструкции, нацеленной на PDL1 и CD28, индуцировать продукцию TNFα совместной культурой обогащенных Т-клеток и аутологичных незрелых дендритных клеток (iDC). Фиг. **7B** и Фиг. **7C** показывают ответы при использовании двух разных доноров эффекторных клеток Leuko Packs. Моноспецифические конструкции, индивидуально нацеленные на PDL1 (cx1204) или CD28 (cx698), не индуцировали устойчивый ответ цитокинов от какого-либо донора.

[0146] Фиг. **8A и 8B** показывают способность иммобилизованных положительных контрольных анти-CD3 (OKT3) и анти-CD28 (TGN1412) антител индуцировать продукцию TNFα CD4+ Т-клетками в PBMC, предварительно культивированных при высокой плотности, тогда как иммобилизованные белки, содержащие иллюстративные sdAb 1C9 (cx694, cx8370 и cx984), не индуцировали продукцию TNFα в этой клеточной

популяции на уровнях выше, чем в необработанном контрольном образце. Фиг. **8A** и Фиг. **8B** показывают ответы при использовании двух разных PBMC доноров Leuko Packs.

Подробное описание

[0147] В настоящей заявке представлены полипептиды, которые специфически связываются с CD28, далее также называемые CD28-связывающими полипептидами. В некоторых вариантах осуществления представленные связывающиеся полипептиды содержат по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb; например, VHH домен), которое связывается с CD28. CD28-связывающие полипептиды, представленные в настоящей заявке, включают одновалентные и мультивалентные (например, бивалентные) конструкции. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид, представленный в настоящей заявке, содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь VHH доменов, каждый из которых индивидуально связывается с CD28. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид, представленный в настоящей заявке, содержит один, два, три или четыре VHH домена, которые связываются с CD28. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид, представленный в настоящей заявке, содержит два VHH домена, которые связываются с CD28. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид, представленный в настоящей заявке, содержит один VHH домен, который связывается с CD28. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид, представленный в настоящей заявке, содержит единственный VHH домен, который связывается с CD28.

[0148] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающие полипептиды являются моноспецифическими. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающие полипептиды являются мультиспецифическими. Например, представленные CD28-связывающие полипептиды включают полипептиды, которые могут содержать по меньшей мере один VHH домен, который связывается с CD28, и один или более дополнительных связывающих доменов, таких как один или более дополнительных VHH доменов, которые связываются с одним или более антигенами-мишенями, отличными от CD28. В конкретных вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой опухоль-ассоциированный антиген (TAA).

[0149] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающие полипептиды представлены в виде Fc-слитых белков. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид содержит по меньшей мере один VHH домен, который связывается с CD28, и Fc домен. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид содержит по меньшей мере один VHH домен, который связывается с CD28, по меньшей мере один другой связывающий домен (например, VHH), который связывается с другим антигеном-мишенью (например, TAA), и Fc домен. В некоторых вариантах осуществления Fc домен опосредует димеризацию CD28-связывающего полипептида в физиологических условиях таким образом, что образуется димер, который удваивает количество CD28-связывающих сайтов и, если присутствует,

также может удваивать количество других антигенсвязывающих доменов. Например, CD28-связывающий полипептид, включающий один VHH домен, который связывается с CD28, и Fc-область, является одновалентным в виде мономера, но в физиологических условиях Fc-область может опосредовать димеризацию, таким образом, что CD28-связывающий полипептид существует в виде бивалентного димера в таких условиях.

[0150] CD28 представляет собой гомодимерный трансмембранный гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов (Ig), конститутивно экспрессируемый Т-клетками. Основными партнерами по связыванию CD28 являются CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2), которые, в свою очередь, могут связываться с множеством рецепторов, таких как CTLA4. Esensten et al., Immunity (2019) 44(5):973-88. CD28 обеспечивает костимулирующий активирующий сигнал для Т-клеток, который имеет важное значение для их пролиферации и эффекторной функции. Id. Костимулирующий сигнал CD28 обеспечивает вторичный сигнал для усиления первичного сигнала комплексом антиген-рецептор (TCR/CD3) для активации CD8+ цитотоксических Т-клеток (CTL), которые обеспечивают адаптивные иммунные ответы против рака и осуществляют опухоль-специфические иммунные ответы. Huff et al., International Journal of Molecular Sciences (2019) 20(11):2810. Кроме того, CD8+ Т-клетки с низкой экспрессией CD28 были идентифицированы в контексте неэффективного CTL-опосредованного уничтожения опухоли. Id.

[0151] Иллюстративная последовательность канонического человеческого CD28 представлена ниже (SEQ ID NO:86, например, Uniprot No. P10747):

MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASL
HKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQNLYVNQTDIYFC
KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTV
AFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0152] Было показано, что агонизм CD28 промотирует активность Т-клеток, что может привести к эффективной иммунотерапии для активации эффективного иммунного ответа против опухолей для лечения рака. Однако проблема с некоторыми агонистами CD28 заключается в том, что они могут обладать суперагонистической активностью, что приводит к агонизму CD28 независимо от передачи сигналов TCR. В некоторых случаях это может вызвать экспансию Т-клеток в отсутствие дополнительных стимулов со стороны Т-клеточного рецептора и измеримый провоспалительный ответ. Например, суперагонистическое моноклональное антитело TGN1412 вызывало сильный цитокиновый шторм у здоровых пациентов, которым его вводили (Suntharalingam et al. N Engl J Med 2006; 355:1018-1028). Таким образом, существует потребность в улучшенных агонистах CD28, которые являются более безопасными.

[0153] В настоящей заявке представлены домены VHH, которые связываются с CD28, но не проявляют активности агониста CD28 в моноспецифическом/двухвалентном формате. Такие CD28-связывающие домены VHH могут быть включены в ряд форматов связывания для проявления желаемой иммунной активности. Представлены различные форматы связывания полипептида CD28, см., например, Фиг. 3A и 3B.

[0154] Среди представленных CD28-связывающих полипептидов есть полипептиды, которые способны связываться и опосредовать CD28-зависимую передачу сигналов. В некоторых случаях представленные CD28-связывающие полипептиды непосредственно взаимодействуют и/или оказывают агонистическое действие на активность CD28, что, в некоторых аспектах, может быть использовано в качестве терапевтического средства для повышения противоопухолевой активности Т-клеток.

[0155] В конкретных вариантах осуществления в настоящей заявке представлены мультиспецифические обусловленно CD28-связывающие полипептиды, содержащие по меньшей мере один VHH домен, который связывается с CD28, и по меньшей мере один связывающий домен, который связывается с другим антигеном, таким как опухоль-ассоциированный антиген (TAA;, например, PD-L1 или 5T4) или другой антиген, присутствующий в микроокружении опухоли (TME). В некоторых случаях связывающие полипептиды включают полипептиды, которые проявляют двойную аффинность к CD28 и опухоль-ассоциированному антигену (TAA), такому как PDL1 или 5T4. В некоторых случаях связывающие полипептиды включают полипептиды, которые проявляют двойную аффинность к CD28 и другому антигену, присутствующему в микроокружении, такому как маркер истощения Т-клеток, маркер активации Т-клеток или маркер TME. Представленные мультиспецифические обусловленно CD28-связывающие полипептиды проявляют агонистическую активность в отношении CD28 только будучи связанными с другим антигеном, присутствующим на поверхности клетки (например, опухолевой клетки), и эта Т-клеточная активность независима от связывания CD3. В некоторых аспектах такие молекулы с двойной аффинностью способны к взаимодействию с Т-клетками или их активации на участке опухоли при связывании с опухоль-экспрессируемым TAA (например, PDL1 или 5T4). В некоторых аспектах такие молекулы с двойной аффинностью способны к взаимодействию с Т-клетками или их активации на участке опухоли при связывании с экспрессируемым Т-клетками маркером активации или истощения. В некоторых аспектах такие молекулы с двойной аффинностью способны к взаимодействию с Т-клетками или их активации на участке опухоли при связывании с антигеном, экспрессируемым клеткой в TME. В частности, из таких молекул в настоящей заявке представлены молекулы, которые демонстрируют обусловленное связывание и/или взаимодействие с CD28. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид является мультиспецифическим, и его способность к костимуляции Т-клетки блокируется или снижается в отсутствие TAA связывания с мультиспецифическим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид способен к костимуляции Т-клетки, только когда мультиспецифический полипептид связан с TAA. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид способен к костимуляции Т-клетки, только когда мультиспецифический полипептид связан с антигеном в TME.

[0156] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические обусловленно CD28-связывающие молекулы включают форматы, которые являются одновалентными

для CD28 и либо одновалентными, либо мультивалентными (например, бивалентными) для другого антигена (например, TAA). В других вариантах осуществления мультиспецифические обусловленно CD28-связывающие молекулы включают форматы, которые являются мультивалентными (например, бивалентными) для CD28 и либо одновалентными, либо мультивалентными (например, бивалентными) для другого антигена (например, TAA). В конкретных вариантах осуществления представленные мультиспецифические обусловленно CD28-связывающие полипептиды представлены в виде слитого белка с Fc с образованием димера из двух полипептидных цепей.

[0157] Также в настоящей заявке представлены взаимодействующие с Т-клетками слитые белки в форме мультиспецифических полипептидных конструкций, содержащих по меньшей мере один (и типично только один) VHH, который связывает CD28, область, связывающую CD3 и по меньшей мере один другой антиген (например, TAA). В конкретных вариантах осуществления взаимодействующие с Т-клетками слитые белки представлены в формате с Fc-областью, расположенной на N-конце относительно CD3-связывающей области. Представленные мультиспецифические полипептидные конструкции проявляют ограниченную активность по взаимодействию с Т-клетками, поскольку такие конструкции по существу связываются с CD3 только после связывания антигена посредством антигенсвязывающего домена. Это уникальное свойство делает возможным растпространение ограниченно взаимодействующих с CD3 белков к участкам, где присутствует другой антиген (например, TAA). Этот формат отличается от других связывающихся с CD3 мультиспецифических конструкций тем, что конститутивное связывание CD3 не допускается или исключается, что обеспечивает значительное преимущество за счет предотвращения связывания с периферическими Т-клетками и обеспечения превосходного распределения на участке(участках), где антиген присутствует как распознанный антигенсвязывающим доменом. Ограниченная активность представленных мультиспецифических полипептидных конструкций по взаимодействию с Т-клетками обусловлена, в некоторых аспектах, расположением Fc-области на N-конце по отношению к CD3-связывающей области. В некоторых вариантах осуществления такое расположение сдерживает, уменьшает, ослабляет и/или предотвращает связывание CD3 CD3-связывающей областью. В отсутствие связывания антигена антигенсвязывающим доменом мультиспецифические полипептидные конструкции, представленные в настоящей заявке, демонстрируют сниженную или устраненную способность к связыванию CD3 и активации Т-клеток. Присутствие VHH, связывающего CD28, в представленных мультиспецифических полипептидных конструкциях увеличивает или усиливает активность Т-клеток при совместном взаимодействии CD3 с областью связывания CD3 и связывании с другим антигеном (например, TAA).

[0158] В любом из представленных вариантов осуществления Fc представляет собой Fc, который демонстрирует пониженную иммунную эффекторную активность, например в результате одной или более мутаций, которые уменьшают одну или более эффекторных функций, таких как антитело-зависимая клеточная цитотоксичность

(ADCC), антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и/или комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Иллюстративные инертные или неэффекторные Fc описаны в настоящей заявке.

[0159] В некоторых вариантах осуществления представленные CD28-связывающие полипептиды можно использовать для стимуляции иммунного ответа у субъекта, который, в некоторых аспектах лечит заболевание или расстройство, такое как рак, у субъекта. В некоторых аспектах CD28-связывающий полипептид, представленный в настоящей заявке, такой как мультиспецифический обусловленно CD28-связывающий полипептид, может связываться с CD28-экспрессирующими Т-клетками и стимулировать Т-клетки к индукции противоопухолевой активности. В некоторых случаях стимуляция агониста CD28 и являющаяся результатом этого противоопухолевая активность могут вызывать гибель раковых клеток (например, костимулированная Т-клетка убивает раковую клетку).

[0160] Также в настоящей заявке представлены сконструированные клетки, такие как сконструированные Т-клетки, которые экспрессируют любой из представленных CD28-связывающих полипептидов. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки продуцируют и секретируют CD28-связывающий полипептид.

[0161] Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, указанные в настоящей заявке, полностью включены в качестве ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была включена по отдельности в качестве ссылки. Если определение, приведенное в настоящей заявке, противоречит или иным образом несовместимо с определением, приведенным в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в настоящую заявку в качестве ссылки, определение, приведенное в настоящей заявке, имеет преимущественную силу над определением, которое включено в настоящую заявку посредством ссылки.

[0162] Методы и процедуры, описанные или на которые ссылаются в настоящей заявке, в целом хорошо понятны и обычно используются специалистами в данной области техники с использованием традиционной методологии, такой как, например, широко используемые методологии, описанные в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); серия METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, и ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and

Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); и Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993); и в новых редакциях этих документов.

[0163] Заголовки разделов в настоящей заявке представлены только для организационных целей и не должны рассматриваться как огранивающие описанное изобретение.

I. Определения

[0164] Если не определено иначе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области. Кроме того, если из контекста не следует или явно не указано иное, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число. В случае расхождения в определениях между различными источниками или ссылками преимущество имеет определение, представленное в настоящей заявке.

[0165] Должно быть понятно, что варианты осуществления изобретения, описанные в настоящей заявке, включают «состоящие» и/или «по существу состоящие из» вариантов осуществления. В контексте настоящей заявки форма единственного числа «a», «an» и «the» включает ссылки во множественном числе, если не указано иное. Использование термина «или» не означает, что альтернативы являются взаимоисключающими.

[0166] В настоящей заявке использование «или» означает «и/или», если прямо не указано или не понятно специалисту в данной области. В контексте пункта формулы изобретения с множественной зависимостью использование «или» относится к более чем одному предшествующему независимому или зависимому пункту.

[0167] Термин «около» в контексте настоящей заявки относится к обычному интервалу погрешности для соответствующего значения, хорошо известному специалистам в данной области техники. Ссылка на «около» значения или параметра в настоящей заявке включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр per se. Например, описание, указывающее «около X», включает описание «X».

[0168] Термины “молекула нуклеиновой кислоты”, “нуклеиновая кислота” и “полинуклеотид” можно использовать взаимозаменяемо, и они относятся к полимеру,

состоящему из нуклеотидов. Такие полимеры, состоящие из нуклеотидов, могут содержать природные и/или не встречающиеся в природе нуклеотиды и включают, но не ограничиваются этим, ДНК, РНК и ПНК. “Нуклеиновокислотная последовательность” относится к линейной последовательности нуклеотидов, содержащихся в молекуле нуклеиновой кислоты или полинуклеотиде.

[0169] Термин “выделенный полинуклеотид” в контексте настоящей заявки должен означать полинуклеотид геномного, кДНК, или синтетического происхождения, или их некоторую комбинацию, который в силу своего происхождения (1) не является связанным со всем или частью полинуклеотида, присутствующего в природе, (2) функционально связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (3) не присутствует в природе как часть более крупной последовательности.

[0170] Термины “полипептид” и “белок” используются взаимозаменяемо и относятся к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, и не ограничиваются минимальной длиной. Такие полимеры, состоящие из аминокислотных остатков, могут содержать природные и/или не встречающиеся в природе аминокислотные остатки и включают, но не ограничиваются этим, пептиды, олигопептиды, димеры, тримеры и мультимеры, состоящие из аминокислотных остатков. Этим определением охватываются как полноразмерные белки, так и их фрагменты. Термины также включают постэкспрессионные модификации полипептида, например гликозилирование, сиалилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Кроме того, для целей настоящего раскрытия, “полипептид” относится к белку, который включает модификации, такие как делеции, добавления и замены (как правило, консервативные по природе), в нативной последовательности при условии, что белок сохраняет желаемую активность. Эти модификации могут быть преднамеренными, например посредством сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например в результате мутаций хозяев, которые продуцируют белки, или ошибок в результате ПЦР амплификации.

[0171] Термин "выделенный белок", используемый в настоящей заявке, означает, что рассматриваемый белок (1) не содержит по меньшей мере некоторых других белков, с которыми он обычно встречается в природе, (2) по существу не содержит других белков из того же источника, например того же вида, (3) экспрессируется клеткой из другого вида, (4) был отделен по меньшей мере от 50 процентов полинуклеотидов, липидов, углеводов или других веществ, с которыми он связан в природе, (5) не связан (путем ковалентного или нековалентного взаимодействия) с частями белка, с которыми «выделенный белок» связан в природе, (6) функционально связан (путем ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не связан в природе, или (7) не встречается в природе. Такой выделенный белок может кодироваться геномной ДНК, кДНК, мРНК или другой РНК, которая может иметь синтетическое происхождение, или любой их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок является по существу чистым или по существу свободным от белков или полипептидов или других примесей, присутствующих в его природной среде, которые могут помешать

его применению (терапевтическому, диагностическому, профилактическому, исследовательскому или иному).

[0172] Используемый в настоящей заявке термин «по существу чистый» означает, что целевой вид является преобладающим присутствующим видом (т.е. в молярном отношении он более распространен, чем любой другой отдельный вид в композиции), а по существу очищенная фракция представляет собой композицию, в которой целевой вид составляет по меньшей мере около 50 процентов (в молярном отношении) от всех присутствующих макромолекулярных видов. Как правило, по существу чистая композиция будет включать более примерно 80 процентов от всех макромолекулярных видов, присутствующих в композиции, например, в некоторых вариантах осуществления более примерно 85%, 90%, 95% и 99%. В некоторых вариантах осуществления целевой вид очищают по существу до гомогенности (примеси не могут быть обнаружены в композиции обычными методами детекции), при этом композиция состоит по существу из одного макромолекулярного вида.

[0173] Термин «функционально связанный» в контексте настоящей заявки относится к положениям компонентов, описанных таким образом, что они находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предполагаемым образом. Контрольную последовательность, «функционально связанную» с кодирующей последовательностью, лигируют таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

[0174] Термин «специфически связывается» с антигеном или эпитопом является термином, который хорошо известен в данной области, и способы определения такого специфического связывания также хорошо известны в данной области. Считается, что молекула проявляет «специфическое связывание» или «предпочтительное связывание», если она взаимодействует или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретной клеткой или веществом, чем с другими клетками или веществами. Однодоменное антитело (sdAb) или VHH-содержащий полипептид «специфически связывается» или «предпочтительно связывается» с мишенью, если связывание происходит с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем связывание с другими веществами. Например, sdAb или VHH-содержащий полипептид, который специфически или предпочтительно связывается с эпитопом CD28, представляет собой sdAb или VHH-содержащий полипептид, который связывается с этим эпитопом с большей аффинностью, авидностью, с более легко и/или с большей продолжительностью, чем он связывается с другими CD28 эпитопами или не-CD28 эпитопами. Читая это определение, должно быть понятно, что, например, sdAb или VHH-содержащий полипептид, который специфически или предпочтительно связывается с первой мишенью, может или не может специфически или предпочтительно связываться со второй мишенью. Таким образом, «специфическое связывание» или «предпочтительное связывание» не обязательно требует (хотя может включать) исключительное связывание. Как правило, но не обязательно, ссылка на

связывание означает предпочтительное связывание. «Специфичность» относится к способности связывающего белка селективно связывать антиген.

[0175] В контексте настоящей заявки термин «эпитоп» относится к участку молекулы-мишени (например, антигена, такого как белок, нуклеиновая кислота, углевод или липид), с которым связывается антигенсвязывающая молекула (например, sdAb или VHH-содержащий полипептид). Эпитопы часто включают химически активную поверхностную группу молекул, таких как аминокислоты, полипептиды или боковые цепи сахаров, и имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Эпитопы могут быть образованы как из смежных, так и/или расположенных рядом несмежных остатков (например, аминокислот, нуклеотидов, сахаров, липидного фрагмента) молекулы-мишени. Эпитопы, образованные из смежных остатков (например, аминокислот, нуклеотидов, сахаров, липидного фрагмента), обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные в результате третичной укладки, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп может включать по меньшей мере 3, по меньшей мере 5 или 8-10 остатков (например, аминокислот или нуклеотидов), но не ограничивается этим. В некоторых вариантах осуществления длина эпитопа составляет менее 20 остатков (например, аминокислот или нуклеотидов), менее 15 остатков или менее 12 остатков. Два антитела могут связывать один и тот же эпитоп в антигене, если они проявляют конкурентное связывание в отношении антигена. В некоторых вариантах осуществления эпитоп можно идентифицировать по определенному минимальному расстоянию до CDR остатка на антигенсвязывающей молекуле. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может быть идентифицирован по указанному выше расстоянию и дополнительно ограничен остатками, вовлеченными в связь (например, водородную связь) между остатком антигенсвязывающей молекулы и остатком антигена. Эпитоп также может быть идентифицирован различными методами сканирования, например, аланиновое или аргининовое сканирование может указывать на один или более остатков, с которыми может взаимодействовать антигенсвязывающая молекула. Если не указано иное, ряд остатков в качестве эпитопа не исключает, что другие остатки являются частью эпитопа для конкретной антигенсвязывающей молекулы. Скорее наличие такого ряда означает минимальную серию (или ряд видов) эпитопов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления ряд остатков, идентифицированный как эпитоп, обозначает минимальный эпитоп, релевантный для антигена, а не исключительный перечень остатков для эпитопа на антигене.

[0176] «Нелинейный эпитоп» или «конформационный эпитоп» включает несмежные полипептиды, аминокислоты и/или сахара в антигенном белке, с которыми связывается антигенсвязывающая молекула, специфическая для эпитопа. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из остатков будет несмежным с другими отмеченными остатками эпитопа; однако один или более остатков также могут быть смежными с другими остатками.

[0177] «Линейный эпитоп» включает смежные полипептиды, аминокислоты и/или сахара в антигенном белке, с которыми связывается антигенсвязывающая молекула, специфическая для эпитопа. Отмечается, что в некоторых вариантах осуществления не каждый из остатков в линейном эпитопе обязательно должен быть непосредственно связан (или вовлечен в связь) антигенсвязывающей молекулой. В некоторых вариантах осуществления линейные эпитопы могут быть образованы в результате иммунизаций пептидом, который эффективно состоял из последовательности линейного эпитопа, или из структурных участков белка, которые относительно изолированы от остальной части белка (таким образом, чтобы антигенсвязывающая молекула могла взаимодействовать, по меньшей мере первоначально), только с этой частью последовательности.

[0178] Термины “антитело” и “антигенсвязывающая молекула” используются взаимозаменяемо в широком смысле и охватывают различные полипептиды, которые включают антитело-подобные антигенсвязывающие домены, включая, но не ограничиваясь этим, традиционные антитела (типично включающие по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь), однодоменные антитела (sdAb, включающие только одну цепь, которая типично подобна тяжелой цепи), VHH-содержащие полипептиды (полипептиды, включающие по меньшей мере один вариабельный домен антитела только с тяжелыми цепями, или VHH) и фрагменты любого из вышеуказанных при условии, что они демонстрируют желаемую антигенсвязывающую активность. В некоторых вариантах осуществления антитело включает домен димеризации. Такие домены димеризации включают, но не ограничиваются этим, константные домены тяжелой цепи (включающие CH1, шарнир, CH2 и CH3, где CH1 типично спаривается с константным доменом легкой цепи, CL, тогда как шарнир опосредует димеризацию) и Fc домены (включающие шарнир, CH2 и CH3, где шарнир опосредует димеризацию).

[0179] Термин антитело также включает, но не ограничивается этим, химерные антитела, гуманизированные антитела и антитела от различных видов, таких как верблюдовые (включая ламу), акула, мышь, человек, обезьяна cynomolgus *и т.д.*

[0180] Термин “вариабельная область” или “вариабельный домен” относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который вовлечен в связывание антитела с антигеном. Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L, соответственно) нативного антитела, как правило, имеют схожие структуры, где каждый домен включает четыре консервативные каркасные области (FR) и три CDR. (См., *например*, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007). Только один V_H или V_L домен может быть достаточным для придания антигенсвязывающей специфичности, например однодоменное антитело, такое как VHH. Кроме того, антитела, которые связываются с определенным антигеном, могут быть выделены с использованием V_H или V_L домена из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных V_L или V_H доменов, соответственно. См., *например*, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

[0181] “Фрагмент антитела” или “антигенсвязывающий фрагмент” относится к молекуле, отличной от традиционного или интактного антитела, которое включает часть традиционного или интактного антитела, содержащую по меньшей мере вариабельную область, которая связывается с антигеном. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются этим, Fv, одноцепочечные Fv (sdFv), Fab, Fab’, Fab’-SH, $F(ab')_2$; диатела; линейные антитела; однодоменные антитела, включающие только V_H область (VHH).

[0182] В контексте настоящей заявки “одновалентная”, при указании связывающей молекулы, относится к связывающим молекулам, которые имеют один сайт распознавания антигена, который является специфическим в отношении антигена-мишени. Примеры одновалентных связывающих молекул включают, например, фрагмент одновалентного антитела, белковую связывающую молекулу с антитело-подобными связывающими свойствами или молекулу MHC. Примеры фрагментов одновалентных антител включают, но не ограничиваются этим, Fab-фрагмент, Fv-фрагмент и одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv).

[0183] В контексте настоящей заявки “одновалентная”, при указании связывающей молекулы, относится к связывающей молекуле, которая имеет несколько (более одного) сайтов распознавания антигена, которые являются специфическими в отношении антигена-мишени.

[0184] Термины “однодоменное антитело”, “sdAb,” “VHH” используются взаимозаменяемо в настоящей заявке как относящиеся к антителу, имеющему один мономерный домен связывания/распознавания антигена. Такие антитела включают верблюжье антитело или акулье антитело. В некоторых вариантах осуществления VHH включает три CDR и четыре каркасные области, обозначенные FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В некоторых вариантах осуществления VHH может быть усечен на N-конце или C-конце таким образом, чтобы он включал только частичную FR1 и/или FR4, или отсутствует одна или обе из этих каркасных областей, при условии, что VHH по существу сохраняет антиген-связывающую способность и специфичность.

[0185] Термин “VHH-содержащий полипептид” относится к полипептиду, который включает по меньшей мере один VHH домен. В некоторых вариантах осуществления VHH полипептид включает два, три или четыре или более VHH доменов, где каждый VHH домен может быть одинаковым или разным. В некоторых вариантах осуществления VHH-содержащий полипептид включает Fc домен. В некоторых таких вариантах осуществления VHH полипептид может образовывать димер. Неограничивающие структуры VHH-содержащих полипептидов включают VHH_1-Fc, VHH_1-VHH_2-Fc и VHH_1-VHH_2-VHH_3-Fc, где VHH_1, VHH_2 и VHH_3 могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления таких структур один VHH может быть соединен с другим VHH линкером, или один VHH может быть соединен с Fc линкером. В некоторых таких вариантах осуществления линкер включает 1-20 аминокислот, предпочтительно 1-20 аминокислот преимущественно состоящих из глицина и, необязательно, серина. В некоторых вариантах осуществления, когда VHH-содержащий полипептид включает Fc,

он образует димер. Таким образом, структура VHH_1-VHH_2-Fc, если она образует димер, считается четырехвалентной (т.е. димер имеет четыре VHH домена). Подобным образом, структура VHH_1-VHH_2-VHH_3-Fc, если она образует димер, считается шестивалентной (т.е. димер имеет шесть VHH доменов).

[0186] В контексте настоящей заявки CD28-связывающий полипептид представляет собой полипептид или белок, который специфически связывается с CD28. Типично CD28-связывающий полипептид в настоящей заявке представляет собой VHH-содержащий полипептид, содержащий по меньшей мере один VHH домен, который связывается с CD28. CD28-связывающий полипептид включает конъюгаты, включая слитые белки. CD28-связывающий полипептид включает слитые белки, включая те, которые содержат Fc домен. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид содержит два, три или четыре или более VHH доменов, каждый из которых специфически связывается с CD28, где каждый VHH домен может быть одинаковым или разным. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид является мультивалентным. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид является мультиспецифическим. В некоторых случаях CD28-связывающий полипептид может содержать один или более дополнительных доменов, которые связываются с одним или более другими или дополнительными антигенами, отличными от CD28.

[0187] Термин “моноклональное антитело” относится к антителу (включая sdAb или VHH-содержащий полипептид) из по существу гомогенной популяции антител, то есть отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью и направлены против одного антигенного сайта. Более того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, образец моноклональных антител может связываться с одним и тем же эпитопом на антигене. Определение «моноклональный» указывает на то, что антитело получено из по существу однородной популяции антител, и его не следует толковать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела могут быть получены гибридомным методом, впервые описанным Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495, или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК, такими как описанные в патенте США № 4816567. Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек, созданных с использованием методик, описанных, например, в McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554.

[0188] Термин “CDR” означает определяющую комплементарность область, определенную по меньшей мере одним из способов идентификации, известных специалистам в данной области техники. Точные границы аминокислотной

последовательности данной CDR или FR легко можно определить с использованием любого количества хорошо известных схем, включая те, которые описаны Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации "Kabat"); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации "Chothia"); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745." (схема нумерации "Contact"); Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering для immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации "IMGT"); Honegger A and Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (схема нумерации "Aho"); и Martin et al., "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm," PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (схема нумерации "AbM").

[0189] Границы данной CDR или FR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Kabat основана на структурных выравниваниях, тогда как схема Chothia основана на структурной информации. Нумерация для обеих схем Kabat и Chothia основана на наиболее распространенных длинах последовательностей областей антител, при этом вставки обозначаются буквами вставки, например, «30a», а в некоторых антителах появляются делеции. В этих двух схемах определенные вставки и делеции («вставки») размещаются в разных положениях, что приводит к дифференциальной нумерации. Схема Contact основана на анализе сложных кристаллических структур и во многом похожа на схему нумерации Chothia. Схема AbM представляет собой компромисс между определениями Kabat и Chothia, основанный на том, что используется в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular AbM.

[0190] В некоторых вариантах осуществления CDR могут быть определены в соответствии с любой из схемы нумерации Chothia, схемы нумерации Kabat, комбинации Kabat и Chothia, определения AbM и/или определения Contact. VHH содержит три CDR, обозначенные как CDR1, CDR2 и CDR3. В приведенной ниже Таблице 1 перечислены типичные границы положений CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, идентифицированные в соответствии со схемами Kabat, Chothia, AbM и Contact, соответственно. Для CDR-H1 нумерация остатков приведена с использованием обеих схем нумерации Kabat и Chothia. FR расположены между CDR, например, с FR-H1, расположенным перед CDR-H1, FR-H2, расположенным между CDR-H1 и CDR-H2, FR-H3, расположенным между CDR-H2 и CDR-H3, и так далее. Следует отметить, что, поскольку показанная схема нумерации Kabat размещает вставки в H35A и H35B, конец петли Chothia CDR-H1 при нумерации с использованием показанного соглашения о нумерации Kabat варьируется между H32 и H34, в зависимости от длины петли.

Таблица 1

Границы CDRs в соответствии с различными схемами нумерации

CDR	**Kabat**	**Chothia**	**AbM**	**Contact**
CDR-H1 (нумерация Kabat[1])	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (нумерация Chothia[2])	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

1 - Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD
2 - Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948

[0191] Таким образом, если не указано иное, "CDR" или "определяющая комплементарность область", или индивидуальные определенные CDR (*например,* CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), данного антитела или его области, такой как его вариабельная область, следует понимать как охватывающие какую-либо (или конкретную) определяющую комплементарность область, определенную в соответствии с любой из вышеуказанных схем. Например, когда указано, что конкретная CDR (*например,* CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в данной VHH аминокислотной последовательности, должно быть понятно, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (*например,* CDR-H3) в VHH, определенную в соответствии с любой из вышеуказанных схем. В некоторых вариантах осуществления определены специфические последовательности CDR. Иллюстративные последовательности CDR представленных антител описаны с использованием различных схем нумерации (см., *например,* Таблицу 1), хотя должно быть понятно, что представленное антитело может включать CDR, описанные в соответствии с любой из других вышеуказанных схем нумерации или других схем нумерации, известных специалистам в данной области.

[0192] В контексте настоящей заявки термин "конъюгат", "конъюгация" или их грамматические вариации относятся к объединению или связыванию вместе двух или более соединений, приводящему к образованию другого соединения, любым способом соединения или связывания, известным в данной области. Он также может относиться к соединению, которое образуется путем объединения или связывания вместе двух или более соединений. Например, домен VHH, связанный непосредственно или опосредованно с одним или более химическими фрагментами или полипептидом, является иллюстративным конъюгатом. Такие конъюгаты включают слитые белки, белки, полученные химической конъюгацией, и белки, полученные любыми другими способами.

[0193] Слияние Fc иммуноглобулина («Fc-слияние»), такое как VHH-Fc, представляет собой молекулу, содержащую один или более VHH доменов, функционально связанных с Fc-областью иммуноглобулина. Fc-область иммуноглобулина может быть связана непосредственно или опосредованно с одним или более VHH

доменами. В данной области техники известны различные линкеры, и их необязательно можно использовать для связывания Fc с партнером по слиянию для получения Fc-слияния. В некоторых таких вариантах осуществления линкер содержит 1-20 аминокислот, предпочтительно 1-20 аминокислот, преимущественно состоящих из глицина и, необязательно, серина. Fc-слияния идентичных видов могут быть димеризованы с образованием Fc-слитых гомодимеров, или используя неидентичные виды с образованием Fc-слитых гетеродимеров. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой Fc млекопитающего, например Fc человека.

[0194] Термин “константная область тяжелой цепи” в контексте настоящей заявки относится к области, включающей по меньшей мере три константных домена тяжелой цепи, C_H1, шарнир, C_H2 и C_H3. Конечно, не изменяющие функцию делеции и изменения в доменах охватываются объемом термина “константная область тяжелой цепи”, если не указано иное. Неограничивающие иллюстративные константные области тяжелой цепи включают γ, δ и α. Неограничивающие иллюстративные константные области тяжелой цепи также включают ε и μ. Каждая константная область тяжелой цепи соответствует изотипу антитела. Например, антитело, включающее константную область γ, представляет собой IgG антитело, антитело, включающее константную область δ, представляет собой IgD антитело, и антитело, включающее константную область α, представляет собой IgA антитело. Кроме того, антитело, включающее константную область μ, представляет собой IgM антитело, и антитело, включающее константную область ε, представляет собой IgE антитело. Некоторые изотипы могут далее подразделяться на подклассы. Например, IgG антитела включают, но не ограничиваются этим, IgG1 (включающие константную область γ_1), IgG2 (включающие константную область γ_2), IgG3 (включающие константную область γ_3) и IgG4 (включающие константную область γ_4) антитела; IgA антитела включают, но не ограничиваются этим, IgA1 (включающие константную область α_1) и IgA2 (включающие константную область α_2) антитела; и IgM антитела включают, но не ограничиваются этим, IgM1 и IgM2.

[0195] “Fc-область” в контексте настоящей заявки относится к части константной области тяжелой цепи, включающей CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления Fc-область включает шарнир, CH2 и CH3. В различных вариантах осуществления, когда Fc-область включает шарнир, шарнир опосредует димеризацию между двумя Fc-содержащими полипептидами. Fc-область может быть любого изотипа константной области тяжелой цепи антитела, обсуждаемого в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

[0196] “Функциональная Fc-область” обладает “эффекторной функцией” Fc-области нативной последовательности. Иллюстративные “эффекторные функции” включают связывание с Fc-рецептором; связывание Clq и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC); связывание с Fc-рецептором; антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора); и активацию B-

клеток и т.д. Такие эффекторные функции, как правило, требуют объединения Fc-области со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела), и их можно оценить, используя различные анализы.

[0197] “Fc-область с нативной последовательностью” включает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, присутствующей в природе. Человеческие Fc-области с нативной последовательностью включают Fc-область человеческого IgG1 с нативной последовательностью (не-A и A аллотипы); Fc-область человеческого IgG2 с нативной последовательностью; Fc-область человеческого IgG3 с нативной последовательностью; и Fc-область человеческого IgG4 с нативной последовательностью, а также их природные варианты.

[0198] “Вариантная Fc-область” включает аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности Fc-области по меньшей мере одной аминокислотной модификацией. В некоторых вариантах осуществления “вариантная Fc-область” включает аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности Fc-области по меньшей мере одной аминокислотной модификацией, при этом сохраняет по меньшей мере одну эффекторную функцию Fc-области с нативной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-областью с нативной последовательностью или с Fc-областью исходного полипептида, например, примерно от одной до примерно десяти аминокислотных замен и предпочтительно примерно от одной до примерно пяти аминокислотных замен в Fc-области с нативной последовательностью или в Fc-области исходного полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область будет иметь идентичность последовательности по меньшей мере около 80% с имеющей нативную последовательность Fc-областью с и/или с Fc-областью исходного полипептида, идентичность последовательности по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% с вышеуказанными.

[0199] Как правило, нумерация остатков в тяжелой цепи иммуноглобулина или ее части, такой как Fc-область, соответствует EU-индексу согласно Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). “EU index согласно Kabat” относится к нумерации остатков человеческого IgG1 EU антитела.

[0200] “Fc рецептор” или “FcR” описывает рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. В некоторых вариантах осуществления FcγR представляет собой нативный человеческий FcR. В некоторых вариантах осуществления FcR представляет собой рецептор, который связывается с IgG антителом (гамма-рецептор) и включает рецепторы FcγRI, FcγRII и FcγRIII подклассов, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. FcγRII рецепторы включают FcγRIIA (“активирующий рецептор”) и FcγRIIB (“ингибирующий рецептор”), которые

имеют схожие аминокислотные последовательности, которые отличаются преимущественно их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит активирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) в его цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит ингибирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM) в его цитоплазматическом домене. (*См.,* например, Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). FcR рассматриваются, например, в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); и de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, охватываются термином "FcR" в настоящей заявке. Например, термин "Fc рецептор" или "FcR" также включает неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за передачу материнских IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) и регуляцию гомеостаза иммуноглобулинов. Известны способы измерения связывания с FcRn (см., например, Ghetie and Ward, Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al.).

[0201] "Акцепторный каркас человека" в контексте настоящей заявки представляет собой каркас, включающий аминокислотную последовательность каркаса вариабельного домена тяжелой цепи (V_H), полученного из каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека, как обсуждается в настоящей заявке. Акцепторный каркас человека, полученный из каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека, может включать ту же аминокислотную последовательность, что и у них, или он может содержать изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления количество аминокислотных замен составляет менее 10, или менее 9, или менее 8, или менее 7, или менее 6, или менее 5, или менее 4, или менее 3 по всем человеческим каркасам в одном антигенсвязывающем домене, таком как VHH.

[0202] В контексте настоящей заявки "химерный антигенный рецептор", или "CAR", относится к сконструированному рецептору, который привносит антиген-специфичность посредством антигенсвязывающего домена в клетки, для которых он был сконструирован (например, Т-клетки, такие как наивные Т-клетки, Т-клетки центральной памяти, эффекторные Т-клетки памяти или их комбинация), таким образом объединяя антигенсвязывающие свойства антигенсвязывающего домена с Т-клеточной активностью (например, литической способностью и самообновлением) Т-клеток. CAR обычно включает внеклеточный антигенсвязывающий домен (эктодомен), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Внутриклеточный сигнальный домен обычно содержит по меньшей мере один ITAM сигнальный домен, например, полученный из CD3-зета, и необязательно по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен, например, полученный из CD28 или 4-1BB. В CAR, представленном в настоящей заявке, VHH домен образует антигенсвязывающий домен и располагается на

внеклеточной стороне при экспрессии в клетке.

[0203] “Аффинность” относится к силе совокупности нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела или VHH-содержащего полипептида) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Аффинность или кажущаяся аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_D) или как $K_{D\text{-кажущаяся}}$, соответственно. Аффинность можно измерить обычными способами, известными в данной области (такими как, например, ELISA K_D, KinExA, проточная цитометрия и/или устройства для метода поверхностного плазмонного резонанса), включая описанные в настоящей заявке. Такие способы включают, но не ограничиваются этим, способы, включающие BIAcore®, Octet® или проточную цитометрию.

[0204] Термин «K_D», используемый в настоящей заявке, относится к равновесной константе диссоциации взаимодействия антигенсвязывающая молекула/антиген. Когда термин «K_D» используется в настоящей заявке, он включает K_D и $K_{D\text{-кажущуюся}}$.

[0205] В некоторых вариантах осуществления K_D антигенсвязывающей молекулы измеряют методом проточной цитометрии с использованием антиген-экспрессирующей клеточной линии и с подгонкой средней флуоресценции, измеренной при каждой концентрации антитела, к нелинейному уравнению связывания с одним сайтом (Prism Software graphpad). В некоторых таких вариантах осуществления K_D представляет собой $K_{D\text{-кажущуюся}}$.

[0206] Термин «биологическая активность» относится к любому одному или более биологическим свойствам молекулы (независимо от того, присутствуют ли они естественным образом, как обнаружено in vivo, или обеспечены или созданы рекомбинантными средствами). Биологические свойства включают, но не ограничиваются этим, связывание лиганда, индукцию или усиление клеточной пролиферации (такой как пролиферация Т-клеток) и индукцию или усиление экспрессии цитокинов.

[0207] VHH-содержащий полипептид с «созревшей аффинностью» относится к VHH-содержащему полипептиду с одним или более изменениями в одной или более CDR по сравнению с исходным VHH-содержащим полипептидом, не имеющим таких изменений, при этом такие изменения приводят к улучшению аффинности VHH-содержащего полипептида к антигену.

[0208] Термин «гуманизированный VHH», используемый в настоящей заявке, относится к VHH, в котором одна или более каркасных областей по существу заменены человеческими каркасными областями. В некоторых случаях некоторые остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированный VHH может включать остатки, которые не присутствуют ни в исходном VHH, ни в человеческих каркасных последовательностях, но включены для дальнейшего уточнения и оптимизации характеристик VHH или полипептида, содержащего VHH. В некоторых вариантах осуществления гуманизированный полипептид, содержащий VHH, включает Fc-область

человека. Должно быть понятно, что гуманизированная последовательность может быть идентифицирована по ее первичной последовательности и не обязательно указывает на способ, которым было создано антитело.

[0209] Термин «по существу аналогичный» или «по существу такой же», используемый в настоящей заявке, означает достаточно высокую степень сходства между двумя или более числовыми значениями, чтобы специалист в данной области, таким образом, мог считать разницу между двумя или более числовыми значениями незначительной или не являющейся биологически и/или статистически значимой в контексте биологической характеристики, измеряемой указанным значением. В некоторых вариантах осуществления два или более по существу схожих значения отличаются не более чем примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 50%.

[0210] «Вариант» полипептида означает биологически активный полипептид, имеющий идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере около 80% с полипептидом с нативной последовательностью после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей, без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательностей. Такие варианты включают, например, полипептиды, в которых один или более аминокислотных остатков добавлены, или делетированы, на N- или C-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариант будет иметь идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере около 80%. В некоторых вариантах осуществления вариант будет иметь идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере около 90%. В некоторых вариантах осуществления вариант будет иметь идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере около 95% с полипептидом с нативной последовательностью.

[0211] Используемый в настоящей заявке термин «процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» и «гомология» по отношению к последовательности пептида, полипептида или антитела определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, известными специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGNTM (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине

сравниваемых последовательностей.

[0212] Аминокислотная замена может включать, но не ограничивается этим, замену одной аминокислоты в полипептиде на другую аминокислоту. Примеры замен показаны в Таблице 2. Аминокислотные замены могут быть введены в представляющее интерес антитело, и продукты могут быть подвергнуты скринингу на желаемую активность, например, сохранение/улучшение связывания антигена, снижение иммуногенности или улучшение ADCC или CDC.

Таблица 2

Исходный остаток	Иллюстративные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин

[0213] Аминокислоты могут быть классифицированы в соответствии с обычными свойствами боковых цепей:

(1) гидрофобные: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) кислотные: Asp, Glu;

(4) основные: His, Lys, Arg;

(5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;

(6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0214] Неконсервативные замены повлекут за собой замену члена одного из этих классов на другой класс.

[0215] Термин «вектор» используется для описания полинуклеотида, который можно сконструировать таким образом, чтобы он содержал клонированный полинуклеотид или полинуклеотиды, которые можно размножать в клетке-хозяине. Вектор может включать один или более из следующих элементов: ориджин репликации, одну или более регуляторных последовательностей (таких как, например, промоторы и/или энхансеры), которые регулируют экспрессию интересующего полипептида, и/или один или более селективных маркерных генов (таких как, например, гены устойчивости к антибиотикам и гены, которые можно использовать в колориметрических анализах, например, β-галактозидаза). Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, который используется для экспрессии представляющего интерес полипептида в клетке-хозяине.

[0216] «Клетка-хозяин» относится к клетке, которая может быть или является реципиентом вектора или выделенного полинуклеотида. Клетки-хозяева могут представлять собой прокариотические клетки или эукариотические клетки. Примеры эукариотических клеток включают клетки млекопитающих, такие как клетки приматов или животных, не являющихся приматами; грибковые клетки, такие как дрожжи; растительные клетки; и клетки насекомых. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих включают, но не ограничиваются этим, клетки NSO, клетки PER.C6® (Crucell) и клетки 293 и CHO, а также их производные, такие как 293-6E, CHO-DG44, CHO-K1, CHO-S и CHO-DS клетки. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и это потомство не обязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или комплементарности геномной ДНК) исходной родительской клетке из-за естественной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные in vivo полинуклеотидом(полинуклеотидами), представленным в настоящей заявке.

[0217] Используемый в настоящей заявке термин «выделенный» относится к молекуле, которая была отделена по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми она обычно встречается в природе или продуцируется. Например, полипептид называется «выделенным», когда он отделен по меньшей мере от некоторых компонентов клетки, которая его продуцировала. Когда полипептид секретируется клеткой после экспрессии, физическое отделение супернатанта, содержащего полипептид, от клетки, которая его продуцировала, считается «выделением» полипептида. Точно так же полинуклеотид называется «выделенным», если он не является частью более крупного полинуклеотида (например, геномной ДНК или митохондриальной ДНК, в случае ДНК полинуклеотида), в котором он обычно встречается в природе, или отделен по меньшей мере от некоторых компонентов клетки, в которой он был получен, например, в случае РНК полинуклеотида. Таким образом, ДНК полинуклеотид, который содержится в векторе внутри клетки-хозяина, может называться «выделенным».

[0218] Термины «индивидуум» и «субъект» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо как относящиеся к животному; например млекопитающему. Термин «пациент» включает человека и ветеринарных субъектов. В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения млекопитающих, включая, но не ограничиваясь этим, людей, грызунов, обезьян, кошачьих, псовых, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, овец, коз, млекопитающих лабораторных животных, млекопитающих сельскохозяйственных животных, млекопитающих спортивных животных и млекопитающих домашних животных. Субъект может быть мужского или женского пола и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, подростков, молодых людей, взрослых и пожилых людей. В некоторых примерах «индивидуум» или «субъект» относится к индивидууму или субъекту, нуждающемуся в лечении заболевания или расстройства. В некоторых вариантах осуществления субъект, получающий лечение, может быть пациентом, что указывает на тот факт, что субъект был идентифицирован как имеющий расстройство, имеющее отношение к лечению, или как имеющий соответствующий риск развития такого расстройства. В конкретных вариантах осуществления субъектом является человек, такой как человек-пациент.

[0219] Термин «заболевание» или «расстройство», используемый в настоящей заявке, относится к состоянию, при котором лечение необходимо и/или желательно.

[0220] Термины «опухолевая клетка», «раковая клетка», «рак», «опухоль» и/или «новообразование», если не указано иное, используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и относятся к клетке (или клеткам), демонстрирующей неконтролируемый рост и/или аномально увеличенную клеточную выживаемость и/или ингибирование апоптоза, что препятствует нормальному функционированию органов и систем организма. В это определение входят доброкачественные и злокачественные опухоли, полипы, гиперплазия, а также спящие опухоли или микрометастазы.

[0221] Термины «рак» и «опухоль» охватывают солидные и гематологические/лимфатические раковые заболевания, а также включают злокачественный, предраковый и доброкачественный рост, такой как дисплазия. Кроме того, в это определение включены клетки с аномальной пролиферацией, которой не препятствует (например, механизмы уклонения от иммунного ответа и ускользания от иммунного ответа) иммунная система (например, инфицированные вирусом клетки). Примеры рака включают, но не ограничиваются этим: рак надпочечников, астроцитому, базально-клеточную карциному, рак желчных путей; рак мочевого пузыря; рак кости; рак головного мозга и центральной нервной системы; рак молочной железы; рак брюшины; рак шейки матки; хориокарциному; рак толстой и прямой кишки; рак соединительной ткани; рак пищеварительной системы; рак эндометрия; рак пищевода; рак глаз; рак головы и шеи; гастральный рак (включая рак желудочно-кишечного тракта); глиобластому; карциному печени; гепатому; интраэпителиальное новообразование; рак почки или почечноклеточный рак; рак гортани; лейкоз; рак печени; рак легкого (например, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и

плоскоклеточный рак легкого); меланому; миелому; нейробластому; рак полости рта (губы, языка, рта и глотки); рак яичников; панкреатический рак; рак гипофиза, рак предстательной железы; ретинобластому; рабдомиосаркому; рак прямой кишки; рак дыхательной системы; карциному слюнной железы; саркому; рак кожи; плоскоклеточный рак; рак желудка; тестикулярный рак; рак щитовидной железы; рак матки или эндометрия; рак мочевыделительной системы; рак вульвы; лимфому, включая лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, а также В-клеточную лимфому (включая низкозлокачественную/фолликулярную неходжкинскую лимфому (NHL); малую лимфоцитарную (SL) NHL; промежуточной степени злокачественности/фолликулярную NHL; промежуточной степени злокачественности диффузную NHL; иммунобластную NHL высокой степени злокачественности; лимфобластную NHL высокой степени злокачественности; высокой степени злокачественности мелкоклеточную NHL с нерассеченными ядрами; генерализованную NHL; лимфому из мантийных клеток; лимфому, связанную со СПИДом; макроглобулинемию Вальденстрема; хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); острый лимфобластный лейкоз (ALL); волосистоклеточный лейкоз, хронический миелобластный лейкоз, а также другие карциномы и саркомы, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание (PTLD), а также аномальную пролиферацию сосудов, связанную с факоматозами, отеком (например, связанным с опухолями головного мозга) и синдромом Мейгса.

[0222] Термин «неопухолевая клетка», используемый в настоящей заявке, относится к нормальным клеткам или ткани. Примеры неопухолевых клеток включают, но не ограничиваются этим: Т-клетки, В-клетки, природные киллерные клетки (NK), природные киллерные Т-клетки (NKT), дендритные клетки, моноциты, макрофаги, эпителиальные клетки, фибробласты, гепатоциты, интерстициальные клетки почек, фибробластоподобные синовиоциты, остеобласты и клетки, расположенные в молочной железе, скелетных мышцах, поджелудочной железе, желудке, яичниках, тонком кишечнике, плаценте, матке, яичках, почках, легких, сердце, головном мозге, печени, предстательной железе, толстой кишке, лимфоидных органах, кости, и мезенхимальные стволовые клетки костного происхождения. Термин «клетка или ткань, расположенная на периферии», используемый в настоящей заявке, относится к неопухолевым клеткам, не расположенным рядом с опухолевыми клетками и/или в микроокружении опухоли.

[0223] Термин «клетки или ткань в микроокружении опухоли», используемый в настоящей заявке, относится к клеткам, молекулам, внеклеточному матриксу и/или кровеносным сосудам, которые окружают и/или питают опухолевые клетки. Примеры клеток или тканей в микроокружении опухоли включают, но не ограничиваются этим: сосудистую сеть опухоли; опухоль-инфильтрирующие лимфоциты; фибробластные ретикулярные клетки; эндотелиальные клетки-предшественники (EPC); ассоциированные с раком фибробласты; перициты; другие стромальные клетки; компоненты внеклеточного матрикса (ECM); дендритные клетки; антигенпрезентирующие клетки; Т-клетки; регуляторные Т-клетки (Treg клетки); макрофаги; нейтрофилы; супрессорные клетки

миелоидного происхождения (MDSC) и другие иммунные клетки, расположенные близко к опухоли. Способы идентификации опухолевых клеток и/или клеток/тканей, расположенных в микроокружении опухоли, хорошо известны в данной области, как описано в настоящей заявке ниже.

[0224] В некоторых вариантах осуществления «увеличение» или «уменьшение» относится к статистически значимому увеличению или уменьшению, соответственно. Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, «модуляция» может также включать изменение (которое может быть либо увеличением, либо уменьшением) аффинности, авидности, специфичности и/или селективности мишени или антигена в отношении одного или более из его лигандов, партнеров по связыванию, партнеров для ассоциации в гомомультимерную или гетеромультимерную форму или субстратов; изменение (которое может быть либо увеличением, либо уменьшением) чувствительности мишени или антигена к одному или более условиям в среде или окружении, в котором присутствует мишень или антиген (например, pH, ионная сила, присутствие кофакторов и др.); и/или клеточной пролиферации или продукции цитокинов по сравнению с теми же условиями, но без присутствия испытываемого вещества. Это можно определить любым подходящим способом и/или с использованием любого подходящего анализа, известного per se или описанного в настоящей заявке, в зависимости от рассматриваемой мишени.

[0225] Используемый в настоящей заявке термин «иммунный ответ» означает клеточные и/или гуморальные иммунные ответы, достаточные для ингибирования или предотвращения возникновения или ослабления симптомов заболевания (например, рака или метастазирования рака). «Иммунный ответ» может охватывать аспекты как врожденной, так и адаптивной иммунной системы.

[0226] Используемые в настоящей заявке термины «осуществление лечения», «лечение» или «терапия» заболевания, расстройства или состояния представляют собой подход для получения полезных или желаемых клинических результатов. «Лечение», как используется в настоящей заявке, охватывает любое введение или применение терапевтического средства для лечения заболевания у млекопитающего, включая человека. Для целей настоящего раскрытия полезные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, любое одно или более из следующего: облегчение одного или более симптомов, уменьшение степени заболевания, предотвращение или задержку распространения (например, метастазирования, например метастазирования в легкое или лимфатический узел) заболевания, предотвращение или замедление рецидива заболевания, отсрочку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение болезненного состояния, ингибирование заболевания или прогрессирования заболевания, ингибирование или замедление заболевания или его прогрессирования, остановка его развития и ремиссия (частичная или полная). Под «лечением» также понимается уменьшение патологических последствий пролиферативного заболевания. Предложенные в настоящей заявке способы предусматривают любой один или более из этих аспектов лечения. В соответствии с

вышеизложенным термин «лечение» не требует стопроцентного устранения всех аспектов расстройства.

[0227] Используемые в настоящей заявке в контексте рака термины «лечение» или «ингибировать», «ингибирование» или «подавление» рака относятся по меньшей мере к одному из следующего: статистически значимое снижение скорости роста опухоли, прекращение роста опухоли или уменьшение размера, массы, метаболической активности или объема опухоли, измеренное с использованием стандартных критериев, таких как, но не ограничиваясь этим, критерии оценки ответа для солидных опухолей (RECIST) или статистически значимое увеличение выживаемости без прогрессирования (PFS) или общей выживаемости (OS).

[0228] «Улучшение» означает уменьшение или улучшение одного или более симптомов по сравнению с отсутствием введения терапевтического средства. «Улучшение» также включает сокращение или уменьшение продолжительности симптома.

[0229] «Предупреждение», «профилактика» или «предотвращение» заболевания или расстройства относится к введению фармацевтической композиции либо отдельно, либо в комбинации с другим соединением для предотвращения возникновения или начала заболевания или расстройства, или некоторых или всех симптомов заболевания или расстройства, или для уменьшения вероятности возникновения заболевания или расстройства.

[0230] Термины «ингибирование» или «ингибировать» относятся к уменьшению или устранению любой фенотипической характеристики, или к уменьшению или устранению частоты, степени или вероятности этой характеристики. «Уменьшать» или «ингибировать» означает уменьшать, снижать или останавливать активность, функцию и/или количество по сравнению с эталоном. В некоторых вариантах осуществления под «снижением» или «ингибированием» подразумевается способность вызывать общее снижение на 10% или более. В некоторых вариантах осуществления под «снижением» или «ингибированием» подразумевается способность вызывать общее снижение на 50% или более. В некоторых вариантах осуществления под «снижением» или «ингибированием» подразумевается способность вызывать общее снижение на 75%, 85%, 90%, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления ингибирование или уменьшение на величину, указанную выше, происходит в течение определенного периода времени по сравнению с контролем в течение того же периода времени.

[0231] Используемый в настоящей заявке термин «задержка развития заболевания» означает препятствование, замедление, задержку, стабилизацию, подавление и/или отсрочку развития заболевания (такого как рак). Эта задержка может быть разной продолжительности, в зависимости от истории болезни и/или индивидуума, проходящего лечение. Как очевидно для специалиста в данной области, достаточная или значительная задержка может, по сути, включать профилактику, поскольку у индивидуума не развивается заболевание. Например, поздняя стадия рака, такая как развитие метастазов,

может быть отсрочена.

[0232] «Предотвращение», как используется в настоящей заявке, включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого заболевание еще не диагностировано. Если не указано иное, термины «снижать», «ингибировать» или «предотвращать» не означают и не требуют полного предотвращения в течение всего времени, а только в течение измеряемого периода времени.

[0233] Термин «противораковое средство» используется в настоящей заявке в самом широком смысле для обозначения средств, которые используются для лечения одного или более видов рака. Типичные классы таких средств включают, но не ограничиваются этим, химиотерапевтические средства, противораковые биологические препараты (такие как цитокины, слияния рецепторного внеклеточного домена и Fc и антитела), лучевую терапию, CAR-T терапию, терапевтические олигонуклеотиды (такие как антисмысловые олигонуклеотиды и миРНК) и онколитические вирусы.

[0234] Термин «биологический образец» означает количество вещества из живого или ранее живого организма. Такие вещества включают, но не ограничиваются этим, кровь (например, цельную кровь), плазму, сыворотку, мочу, амниотическую жидкость, синовиальную жидкость, эндотелиальные клетки, лейкоциты, моноциты, другие клетки, органы, ткани, костный мозг, лимфоузлы и селезенку.

[0235] Термин «контроль» или «эталон» относится к композиции, о которой известно, что она не содержит аналита («отрицательный контроль») или содержит аналит («положительный контроль»). Положительный контроль может включать известную концентрацию аналита.

[0236] Термины «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относятся к количеству и/или концентрации композиции, содержащей активный ингредиент (например, sdAb или VHH-содержащий полипептид), которая при введении пациенту отдельно (т.е. в качестве монотерапии) или в комбинации с дополнительными терапевтическими средствами приводит к статистически значимому замедлению прогрессирования заболевания, например, за счет облегчения или устранения симптомов и/или причины заболевания. Эффективным количеством может быть количество, которое облегчает, ослабляет или уменьшает тяжесть по меньшей мере одного симптома или биологического ответа или эффекта, связанного с заболеванием или расстройством, предотвращает прогрессирование заболевания или расстройства или улучшает физическое функционирование пациента. Терапевтически эффективное количество композиции, содержащей активное вещество, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса тела индивидуума, а также способность активного вещества вызывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты активного вещества перевешиваются терапевтически полезными эффектами. Терапевтически эффективное

количество может быть доставлено за одно или более введений. Терапевтически эффективное количество относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического и/или профилактического результата.

[0237] Используемый в настоящей заявке термин «композиция» относится к любой смеси двух или более продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водная, неводная композиция или любая их комбинация.

[0238] Термины «фармацевтический состав» и «фармацевтическая композиция» относятся к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента (ингредиентов) и которая не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будут вводить препарат. Следовательно, это композиция, подходящая для фармацевтического применения для млекопитающих, часто для человека. Фармацевтическая композиция обычно содержит эффективное количество активного вещества (например, sdAb или VHH-содержащего полипептида) и носитель, эксципиент или разбавитель. Носитель, эксципиент или разбавитель обычно представляют собой фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель, соответственно. Такие композиции могут быть стерильными.

[0239] «Фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему веществу, вспомогательному веществу или носителю, общепринятому в данной области техники для применения с терапевтическим средством, которые вместе составляют «фармацевтическую композицию» для введения субъекту. Фармацевтически приемлемый носитель нетоксичен для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и совместим с другими ингредиентами композиции. Фармацевтически приемлемый носитель подходит для используемой композиции.

[0240] Введение «в комбинации с» одним или более дополнительными терапевтическими средствами включает одновременное и последовательное введение в любом порядке.

[0241] Термин «одновременно» используется в настоящей заявке для обозначения введения двух или более терапевтических средств, когда по меньшей мере часть введения перекрывается во времени, или когда введение одного терапевтического средства приходится на короткий период времени по сравнению с введением другого терапевтического средства, или при котором терапевтический эффект обоих средств перекрывается в течение по меньшей мере некоторого периода времени.

[0242] Термин «последовательно» используется в настоящей заявке для обозначения введения двух или более терапевтических средств, которое не перекрывается во времени или при котором терапевтические эффекты средств не перекрываются.

[0243] Используемый в настоящей заявке термин «в сочетании с» относится к

применению одного метода лечения в дополнение к другому методу лечения. Таким образом, «в сочетании с» относится к введению индивидууму одного лечения до, во время или после введения другого лечения.

[0244] Термин «вкладыш в упаковку» используется для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, назначении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждения относительно использования таких терапевтических продуктов.

[0245] «Изделие» означает любое изделие (например, упаковку или контейнер) или набор, содержащий по меньшей мере один реагент, например, лекарственное средство для лечения заболевания или расстройства (например, рака), или зонд для специфической детекции биомаркера, описанного в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изделие или набор рекламируются, распространяются или продаются как единое целое для осуществления способов, описанных в настоящей заявке.

[0246] Термины «метка» и «детектируемая метка» означают фрагмент, присоединенный, например, к антителу или антигену для возможности детекции реакции (например, связывания) между членами специфической связывающейся пары. Меченый член специфической связывающейся пары называется «детектируемо меченым». Таким образом, термин «меченый связывающий белок» относится к белку с введенной меткой, которая обеспечивает идентификацию связывающего белка. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой детектируемый маркер, который может производить сигнал, поддающийся обнаружению визуальными или инструментальными средствами, например, включение радиоактивно-меченной аминокислоты или присоединение к полипептиду биотинильных фрагментов, которые могут быть обнаружены при помощи меченого авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которую можно обнаружить оптическими или колориметрическими методами). Примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваются этим, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho или ^{153}Sm); хромогены, флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантанидные люминофоры), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, люцифераза, щелочная фосфатаза); хемилюминесцентные маркеры; биотинильные группы; предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, металл-связывающие домены, эпитопные метки); и обладающие магнитными свойствами вещества, такие как хелаты гадолиния. Репрезентативные примеры меток, обычно используемых для иммуноанализов, включают фрагменты, которые продуцируют свет, например, соединения акридиния, и фрагменты, которые продуцируют флуоресценцию, например, флуоресцеин. В этом отношении сам фрагмент может не быть детектируемо меченым, но может стать детектируемым при взаимодействии с еще одним фрагментом.

II. Однодоменные антитела (например, VHH домены), связывающие CD28

[0247] В настоящей заявке представлены CD28-связывающие полипептиды, которые представляют собой содержащие однодоменное антитело (sdAb; например VHH) полипептиды, содержащие по меньшей мере одно sdAb (например, VHH домен), которое специфически связывается с CD28. В некоторых вариантах осуществления sdAb представляет собой VHH. В некоторых вариантах осуществления VHH домен связывается с человеческим CD28. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления VHH домен связывается с CD28, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO:86, или ее зрелую форму.

[0248] В некоторых вариантах осуществления VHH-содержащие полипептиды, включают несколько копий VHH домена, представленного в настоящей заявке. В таких вариантах осуществления VHH-содержащий полипептид может включать несколько копий одного и того же VHH домена. В некоторых вариантах осуществления VHH-содержащие полипептиды могут включать несколько копий VHH домена, которые различаются, но распознают один и тот же эпитоп на CD28. VHH-содержащие полипептиды могут быть представлены в различных форматах, включая любой, описанный в Разделе III ниже.

[0249] VHH домен представляет собой фрагмент антитела, представляющий собой единственный мономерный вариабельный домен антитела, способный селективно связываться со специфическим антигеном. Имея молекулярную массу всего 12-15 кДа, VHH домены (также называемые однодоменными антителами) намного меньше, чем обычные антитела (150-160 кДа), которые состоят из двух тяжелых белковых цепей и двух легких цепей, и даже меньше, чем Fab фрагменты (~50 кДа, одна легкая цепь и половина тяжелой цепи) и одноцепочечные вариабельные фрагменты (~25 кДа, два вариабельных домена, один из легкой и один из тяжелой цепи).

[0250] Однодоменные антитела представляют собой антитела, определяющие комплементарность области которых являются частью однодоменного полипептида. Примеры включают, но не ограничиваются этим, антитела, содержащие только тяжелую цепь, антитела, в природе лишенные легких цепей, однодоменные антитела, полученные из обычных 4-цепочечных антител, сконструированные антитела и однодоменные каркасы, отличные от тех, которые получены из антител. Однодоменные антитела могут быть получены из любых видов, включая, но не ограничиваясь этим, мышь, человека, верблюда, ламу, альпаку, викунью, гуанако, акулу, козу, кролика и/или крупный рогатый скот. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело, используемое в настоящем изобретении, представляет собой встречающееся в природе однодоменное антитело, известное как антитело с тяжелой цепью, лишенное легких цепей. Для ясности этот вариабельный домен, полученный из антитела с тяжелой цепью, естественно лишенного легкой цепи, известен как VHH, чтобы отличить его от обычного VH четырехцепочечных иммуноглобулинов. Такая молекула VHH может быть получена из антител, вырабатываемых у вида верблюдовых, например у верблюда, ламы, одногорбого

верблюда, альпаки, викуньи и гуанако. Другие виды, помимо верблюдовых, могут продуцировать антитела с тяжелой цепью, в природе лишенные легкой цепи; такие VHH входят в объем настоящего изобретения.

[0251] Методы скрининга VHH доменов, включая VHH-связывающие полипептиды, которые обладают желаемой специфичностью в отношении CD28, включают, но не ограничиваются этим, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), ферментативные анализы, проточную цитометрию и другие иммунологически опосредованные методы, известные в данной области техники.

[0252] Среди VHH доменов, представленных в настоящей заявке, представлен CD28 VHH (происходящий от ламы) и гуманизированные последовательности, такие как любые описанные ниже.

[0253] В некоторых вариантах осуществления VHH домен, который связывает CD28, может быть гуманизированным. Гуманизированные антитела (такие как VHH-содержащие полипептиды) применимы в качестве терапевтических молекул, поскольку гуманизированные антитела снижают или устраняют иммунный ответ человека на нечеловеческие антитела, что может привести к иммунному ответу на терапевтическое средство на основе антител и снижению эффективности терапевтического средства. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или более вариабельных доменов, в которых CDR (или их части) происходят из нечеловеческого антитела, а FR (или их части) происходят из последовательностей человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно также будет включать по меньшей мере часть человеческой константной области. В некоторых вариантах осуществления некоторые FR остатки в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого получены CDR остатки), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

[0254] Гуманизированные антитела и способы их получения рассматриваются, например, в Almagro and Fransson, (2008) Front. Biosci. 13: 1619-1633, а также описаны, например, в Riechmann et al., (1988) Nature 332:323-329; Queen et al., (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86: 10029-10033; патентах США №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri et al., (2005) Methods 36:25-34; Padlan, (1991) Mol. Immunol. 28:489-498 (описывающий “изменение поверхности”); Dall'Acqua et al., (2005) Methods 36:43-60 (описывающий “перестановку FR”); и Osbourn et al., (2005) Methods 36:61-68 и Klimka et al., (2000) Br. J. Cancer, 83:252-260 (описывающий подход “направленного выбора” к перестановке FR).

[0255] Человеческие каркасные области, которые можно использовать для гуманизации, включают, но не ограничиваются этим: каркасные области, выбранные с использованием метода “наилучшего соответствия” (см., например, Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296); каркасные области, полученные из консенсусной последовательности человеческих антител определенной подгруппы вариабельных областей тяжелой цепи (см., например, Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; и Presta et al. (1993)

J. Immunol, 151:2623); человеческие зрелые (соматически мутированные) каркасные области или каркасные области зародышевой линии человека (см., например, Almagro and Fransson, (2008) Front. Biosci. 13:1619-1633); и каркасные области, полученные в результате скрининга FR библиотек (см., например, Baca et al., (1997) J. Biol. Chem. 272: 10678-10684 и Rosok et al., (1996) J. Biol. Chem. 271:22611-22618). Типично FR области VHH заменяют человеческими FR областями для получения гуманизированного VHH. В некоторых вариантах осуществления некоторые FR остатки человеческой FR заменяют для улучшения одного или более свойств гуманизированного VHH. VHH домены с такими замененными остатками все равно называются в настоящей заявке “гуманизированными”.

[0256] В настоящей заявке представлен VHH домен, который связывается с CD28, при этом VHH домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности VHH, выбранной из любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239 и 280, или аминокислотной последовательности, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, выбранной из любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, представленную в любой из SEQ ID NO:189, 192, 195 и 198-201, CDR2, представленную в любой из SEQ ID NO:190, 193, 196 и 202-212, и CDR3, представленную в любой из SEQ ID NO:191, 194 и 197.

[0257] Также в настоящей заявке представлен VHH домен, который связывается с CD28, при этом VHH домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности VHH, выбранной из любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239, 280 и 342-385, или аминокислотной последовательности, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, выбранной из любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239, 280 и 342-385. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, представленную в любой из SEQ ID NO:189, 192, 195 и 198-201; CDR2, представленную в любой из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202-212 и 386-395; и CDR3, представленную в любой из SEQ ID NO:191, 194, 197 и 396-398.

[0258] Также в настоящей заявке представлен VHH домен, который связывается с CD28, при этом VHH домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности VHH, выбранной из любой из SEQ ID NO:186-188, 213-219, 221-239 и 280, или аминокислотной последовательности, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, выбранной из любой из SEQ ID NO:186-188, 213-219, 221-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1 представленную в любой из SEQ ID NO:189, 192, 195 и 198-201, CDR2, представленную в любой из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202 и 204-212 и CDR3, представленную в любой из

SEQ ID NO:191, 194 и 197.

[0259] Также в настоящей заявке представлен VHH домен, который связывается с CD28, при этом VHH домен включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности VHH, выбранной из любой из SEQ ID NO:186-188, 213-219, 221-239, 280 и 342-385, или или аминокислотной последовательности, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, выбранной из любой из SEQ ID NO:186-188, 213-219, 221-239, 280 и 342-385. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, представленную в любой из SEQ ID NO:189, 192, 195 и 198-201; CDR2, представленную в любой из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 204-212 и 386-395; и CDR3, представленную в любой из SEQ ID NO:191, 194, 197, 396, 397 и 398.

[0260] В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239 и 280, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, выбранной из любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен имеет последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления а CD28 VHH домен имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239, 280 и 342-385, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, выбранной из любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239, 280 и 342-385. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен имеет последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239, 280 и 342-385.

[0261] В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-219, 221-239 и 280, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, выбранной из любой из SEQ ID NO:186-188, 213-219, 221-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен имеет последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-219, 221-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-219, 221-239, 280 и 342-385, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, выбранной из любой из SEQ ID

NO:186-188, 213-219, 221-239, 280 и 342-385. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен имеет последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-219, 221-239, 280 и 342-385.

[0262] В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2, CDR3, содержащиеся в VHH домене, представленном в SEQ ID NO:186, или аминокислотной последовательности, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH област, представленной в SEQ ID NO:186. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:186, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:186. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен представляет собой гуманизированный вариант аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:186.

[0263] В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, представленную в SEQ ID NO: 189, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 190, и CDR3, представленную в SEQ ID NO:191.

[0264] В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2, CDR3, содержащиеся в VHH домене, представленном в SEQ ID NO:187, или аминокислотной последовательности, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, представленной в SEQ ID NO:187. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:187, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:187. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен представляет собой гуманизированный вариант аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:187.

[0265] В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, представленную в SEQ ID NO: 192, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 193 и CDR3, представленную в SEQ ID NO:194.

[0266] В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2, CDR3, содержащиеся в VHH домене, представленном в SEQ ID NO:188, или аминокислотной последовательности, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области,

представленной в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен представляет собой гуманизированный вариант аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:188.

[0267] В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, представленную в любой из SEQ ID NO: 195 и 198-201, CDR2, представленную в любой из SEQ ID NO: 196 и 202-212, и CDR3, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, представленную в любой из SEQ ID NO: 195 и 198-201; CDR2, представленную в любой из SEQ ID NO: 196, 202-212 и 386-395; и CDR3, представленную в любой из SEQ ID NO:197 и 396-398. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, представленную в любой из SEQ ID NO: 195 и 198-201, CDR2, представленную в любой из SEQ ID NO: 196, 202 и 204-212, и CDR3, представленную в SEQ ID NO:197. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, представленную в любой из SEQ ID NO: 195 и 198-201; CDR2, представленную в любой из SEQ ID NO: 196, 202, 204-212 и 386-395; и CDR3, представленную в любой из SEQ ID NO:197 и 396-398.

[0268] В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 203 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно. В

некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 202 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 202 и 396, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 386 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 387 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 202 и 397, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 202 и 398, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 206 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 206 и 396, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 388 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в

SEQ ID NO: 201, 389 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 206 и 397, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 203 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 203 и 396, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 390 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 391 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 203 и 397, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 203 и 398, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 204 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 204 и 396, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 392 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 393 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 204 и 397, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 204 и 398, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 196 и 396, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 394 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 395 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1,

CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 196 и 397, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 201, 196 и 398, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 206 и 396, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 388 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 389 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 206 и 397, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 206 и 398, соответственно.

[0269] В некоторых аспектах VHH домен, который связывается с CD28, включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности VHH, представленной в любой из SEQ ID NO:213-239 и 280, или аминокислотной последовательности, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, представленной в любой из SEQ ID NO:213-239 и 280. В некоторых аспектах VHH домен, который связывается с CD28, включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности VHH, представленной в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385, или аминокислотной последовательности, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, представленной в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385.

[0270] В некоторых случаях представленный CD28 VHH домен представляет собой гуманизированный вариант, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239 и 280, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, представленной в любой из SEQ ID NO:213-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления CD28 гуманизированный VHH домен имеет последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239 и 280. В некоторых случаях представленный CD28 VHH домен представляет собой гуманизированный вариант, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, представленной в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385. В некоторых вариантах осуществления CD28 гуманизированный VHH домен имеет последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385.

[0271] В некоторых аспектах VHH домен, который связывается с CD28, включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности VHH, представленной в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280, или аминокислотной последовательности, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, представленной в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280. В некоторых аспектах VHH домен, который связывается с CD28, включает CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности VHH, представленной в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385, или аминокислотной последовательности, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, представленной в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385.

[0272] В некоторых случаях представленный CD28 VHH домен представляет собой гуманизированный вариант, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, представленной в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления CD28 гуманизированный VHH домен имеет последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280. В некоторых случаях представленный CD28 VHH домен представляет собой гуманизированный вариант, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VHH области, представленной в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-485. В некоторых вариантах осуществления CD28 гуманизированный VHH домен имеет последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385.

[0273] В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен имеет мутацию для предотвращения или уменьшения связывания VHH с белком A. В некоторых вариантах осуществления мутация представдяет собой G73D. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH представляет собой SEQ ID NO:280.

[0274] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно CD28 sdAb

включает аминокислотную модификацию, которая уменьшает связывание с белком A. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная модификация представдяет собой G65D, в соответствии с Kabat, в каркасной области 3 (FR3).

[0275] В некоторых вариантах осуществления CD28 связывающий домен, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, который связывается с CD28, обеспечивает одновалентное, двухвалентное, трехвалентное, четырехвалентное, пятивалентое или шестивалентное связывание с CD28. В некоторых вариантах осуществления двухвалентное связывание с CD28 включает два CD28 связывающих домена, которые связываются с одним и тем же эпитопом CD28 (например, моноэпитопный). В некоторых вариантах осуществления двухвалентное связывание с CD28 включает два CD28 связывающих домена, которые связываются с разными эпитопами CD28 (например, биэпитопный). В некоторых вариантах осуществления одновалентное связывание с CD28 включает один CD28 связывающий домен, который связывается с одним эпитопом CD28 (например, моноэпитопный).

[0276] В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен связан, непосредственно или опосредованно, с фрагментом, который связывается с белком A. В некоторых вариантах осуществления белок A-связывающий фрагмент способствует очистке CD28 VHH доменов.

[0277] В некоторых вариантах осуществления способность CD28 VHH домена связываться или взаимодействовать с CD28 предотвращается или снижается в отсутствие дополнительного связывающего домена, являющегося связанным с антигеном. В некоторых вариантах осуществления дополнительный связывающий домен связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA). В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен связан, непосредственно или опосредованно, с TAA антиген-связывающим доменом. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способность CD28 VHH домена связываться или взаимодействовать с CD28 предотвращается или снижается в отсутствие непосредственно или опосредованно связанного TAA-связывающего домена, являющегося связанным со своим антигеном.

III. Слитые белки и конъюгаты, содержащие CD28-связывающие полипептиды

[0278] В настоящей заявке представлены слитые белки и конъюгаты, содержащие CD28-связывающие полипептиды, содержащие по меньшей мере один VHH домен, который специфически связывается с CD28, непосредственно или опосредованно связанным с одним или более дополнительными доменами или фрагментами. В некоторых вариантах осуществления слитый белок или конъюгат по настоящему изобретению состоит из одного полипептида. В других вариантах осуществления слитый белок или конъюгат по настоящему изобретению состоит из более чем одного полипептида. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид по настоящему изобретению включает по меньшей мере один VHH домен, который специфически связывается с CD28. В некоторых аспектах CD28-связывающий

полипептид является мультивалентным для CD28. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающие полипептиды включают два или более CD28 VHH доменов, которые специфически связываются с CD28, например, три или более, четыре или более, пять или более, или шесть или более VHH доменов, которые специфически связываются с CD28.

[0279] В любом из представленных вариантов осуществления CD28-связывающий полипептид включает Fc домен. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид включает по меньшей мере одно CD28 sdAb и Fc домен.

[0280] В некоторых аспектах CD28-связывающий полипептид содержит один или более дополнительных связывающих доменов и является мультиспецифическим для CD28 и другого антигена, который не является CD28. Например, в некоторых случаях, один или более дополнительных доменов могут представлять собой один или более дополнительных связывающих доменов, которые связываются с одним или более другими антигенами, так ими как опухоль-ассоциированный антиген (TAA). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид является мультивалентным для дополнительного антигена. Например, В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает два или более VHH доменов, которые связываются с дополнительным антигеном. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид дополнительно включает Fc домен, таким образом, мультиспецифический CD28-связывающий полипептид дополнительно включает по меньшей мере одно TAA sdAb, по меньшей мере одно CD28 sdAb и Fc домен.

[0281] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид дополнительно включает CD3-связывающую область, таким образом, мультиспецифический CD28-связывающий полипептид дополнительно включает по меньшей мере одно TAA sdAb, по меньшей мере одно CD28 sdAb, Fc домен и CD3-связывающую область.

[0282] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающие полипептиды по настоящему изобретению включают две или более полипептидные последовательности, которые функционально связаны через аминокислотные линкеры. В некоторых вариантах осуществления эти линкеры состоят преимущественно из аминокислот Глицина(G) и Серина(S), обозначенные в настоящей заявке как GS-линкеры. GS-линкеры слитых белков по настоящему изобретению могут быть различной длины, например 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления GS-линкер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GGSGGS, т.е. (GGS)2 (SEQ ID NO: 1); GGSGGSGGS, т.е. (GGS)3 (SEQ ID NO: 2); GGSGGSGGSGGS, т.е. (GGS)4 (SEQ ID NO: 3); GGSGGGGS (SEQ ID NO:89); и GGSGGSGGSGGSGGS, т.е. (GGS)5 (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гибкий линкер, включающий глициновые остатки, такие как, в качестве неограничивающего примера, GG (SEQ ID NO:249), GGG (SEQ ID NO:87), GGGG (SEQ ID NO: 5), GGGGG (SEQ ID NO: 6) и GGGGGG (SEQ ID

NO: 7). В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид включает комбинацию GS-линкера и глицинового линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (GGGGS)n, где n имеет значение от 1 до 5 (SEQ ID NO:123); (GGGGGS)n, где n имеет значение от 1 до 4 (SEQ ID NO:124); GGGGS (SEQ ID NO:125); GGGGGS (SEQ ID NO:126); GGGGGSGGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:127); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:128); GGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:129); или PGGGG (SEQ ID NO:250). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GG линкер. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид включает комбинацию GS-линкера и глицинового линкера.

A. Fc слияния

[0283] В настоящей заявке представлен CD28-связывающий полипептид, который представляет собой слитый белок, содержащий по меньшей мере один VHH домен, который связывается с CD28. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид, представленный в настоящей заявке, содержит один, два, три или четыре VHH домена, которые связываются с CD28. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит Fc домен. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит по меньшей мере один VHH домен, который связывается с CD28, представленным в настоящей заявке, и Fc домен. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит один, два, три или четыре VHH домена, которые связываются с CD28, и Fc домен.

[0284] В некоторых вариантах осуществления включение Fc-области иммуноглобулина в слитый белок может, в некоторых аспектах, состоять из двух полипептидов, которые вместе образуют димер. В некоторых вариантах осуществления Fc домен опосредует димеризацию CD28-связывающего полипептида в физиологических условиях, например при экспрессии из клетки, таким образом образуется димер, который удваивает количество CD28-связывающих сайтов. Например, CD28-связывающий полипептид, включающий один VHH домен, который связывает CD28, и Fc-область, является одновалентным в виде мономера, но Fc-область может опосредовать димеризацию, таким образом, CD28-связывающий полипептид существует в виде двухвалентного димера в таких условиях. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен слит с IgG Fc-областью, и в этих вариантах осуществления слитый белок является двухвалентным, имеющим два CD28 VHH домена на молекулу. В некоторых вариантах осуществления два CD28 связывающих домена (2x) слиты с Fc-областью IgG, и в этих вариантах осуществления слитый белок является четырехвалентным, имеющим четыре CD28 VHH домена на молекулу. В некоторых вариантах осуществления три CD28 VHH домена (3x) слиты с Fc-областью IgG, и в этих вариантах осуществления слитый белок является шестивалентным, имеющим шесть CD28 VHH доменов на молекулу. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид включает Fc-область IgG, и в этих вариантах осуществления слитый белок является двухвалентным, имеющим два CD28 VHH домена на молекулу. В некоторых вариантах осуществления

CD28-связывающий полипептид, имеющий два CD28 связывающих домена (2x), включает Fc-область IgG, и в этих вариантах осуществления слитый белок является четырехвалентным, имеющим четыре CD28 VHH домена на молекулу. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид, имеющий три CD28 VHH домена (3x), включает Fc-область IgG, и в этих вариантах осуществления слитый белок является шестивалентным, имеющим шесть CD28 VHH доменов на молекулу.

[0285] В некоторых вариантах осуществления мультивалентный CD28-связывающий полипептид является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления двухвалентный CD28-связывающий полипептид по изобретению включает две копии CD28-связывающего полипептида, имеющего следующую структуру: (CD28 VHH)-Fc. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, 220 или 280. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8 или 9. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления Fc представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, и Fc домен представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9.

[0286] В некоторых вариантах осуществления мультивалентный CD28-связывающий полипептид является четырехвалентным. В некоторых вариантах осуществления четырехвалентный CD28-связывающий полипептид по изобретению включает две копии CD28-полипептида, имеющего следующую структуру: (CD28 VHH)-Линкер-(CD28 VHH)-Fc. В некоторых вариантах осуществления мультивалентный CD28-связывающий полипептид является шестивалентным. В некоторых вариантах осуществления шестивалентный CD28-связывающий полипептид по изобретению включает две копии CD28-связывающего полипептида, имеющего следующую структуру: (CD28 VHH)-Линкер-(CD28 VHH)-Линкер-(CD28 VHH)-Fc.

[0287] В некоторых случаях CH3 домен Fc-области можно использовать в качестве домена гомодимеризации, таким образом, получаемый слитый белок образуется из двух идентичных полипептидов. В других случаях граничная область димера CH3 области Fc может быть мутирована таким образом, чтобы обеспечить возможность гетеродимеризации. Например, домен гетеродимеризации может быть включен в белок

слияния таким образом, что конструкция представляет собой асимметричный белок слияния.

[0288] В любом из представленных вариантов осуществления CD28 VHH домен может представлять собой любой из описанных выше. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен представляет собой гуманизированный VHH домен, который связывается с CD28.

[0289] В различных вариантах осуществления Fc домен, включенный в CD28-связывающий полипептид, представляет собой человеческий Fc домен или получен из человеческого Fc домена. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит Fc-область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина представляет собой изотип IgG, выбранный из группы, состоящей из IgG1 изотипа, IgG2 изотипа, IgG3 изотипа и IgG4 подкласса.

[0290] В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина или ее иммунологически активный фрагмент представляет собой изотип IgG. Например, Fc-область иммуноглобулина слитого белка является изотипом IgG1 человека, имеющей аминокислотную последовательность:

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 8)

[0291] В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина или ее иммунологически активный фрагмент включает полипептидную последовательность IgG1 человека, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

[0292] В некоторых вариантах осуществления, где слитый белок по изобретению включает Fc полипептид, Fc полипептид является мутированным или модифицированным. В некоторых случаях мутации включают одну или более аминокислотных замен для уменьшения эффекторной функции Fc полипептида. Известны различные примеры мутаций Fc полипептидов для изменения, например уменьшения, эффекторной функции, включая любую из описанных ниже. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены в Fc-области указаны в соответствии с EU-нумерацией согласно Kabat (также называемой нумерацией Kabat), если не описано со ссылкой на конкретную SEQ ID NO. EU-нумерация известна и находится в соответствии с последней версией IMGT Scientific Chart (IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html (создано: 17 мая 2001 г., последние изменения: 10 января 2013 г.) и EU-индексом, как описано в Kabat, E.A. et al. Sequences of Proteins of Immunological interest. 5th ed. US Department of Health and

Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991).

[0293] В некоторых вариантах осуществления Fc-область, которая демонстрирует пониженные эффекторные функции, может быть желательным кандидатом для применений, в которых желательно связывание CD28, при этом некоторые эффекторные функции (такие как CDC и ADCC) являются ненужными или вредными. Можно осуществить анализы цитотоксичности in vitro и/или in vivo для подтверждения снижения/истощения CDC и/или ADCC активностей. Например, можно осуществить анализы связывания Fc рецептора (FcR), чтобы убедиться, что мультиспецифические полипептидные конструкции и/или их расщепленные компоненты не обладают способностью связывания FcγR (следовательно, вероятно не обладают ADCC активностью), но сохраняют способность связывать FcRn. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Неограничивающие примеры анализов in vitro для оценки ADCC активности представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5500362 (см., *например,* Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); патенте США № 5821337 (см. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Альтернативно, можно использовать нерадиоактивные анализы (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности ACTI™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.; и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96™ (Promega™, Madison, Wis.). Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные киллерные (NK) клетки. Альтернативно или дополнительно, ADCC активность представляющей интерес молекулы можно оценить in vivo, *например,* на животной модели, такой, которая раскрыта в Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Также можно осуществить анализы связывания C1q для подтверждения, что мультиспецифическая полипептидная конструкция или ее расщепленные компоненты не могут связывать C1q и, следовательно, не обладают CDC активностью. См., *например,* ELISA связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента можно осуществить CDC анализ (см., например, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); и Cragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). Определения связывания FcRn и клиренса/периода полувыведения in vivo также можно осуществить с использованием способов, известных в данной области (см., *например,* Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

[0294] В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG человека модифицирована для изменения антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например, аминокислотные модификации описаны в Natsume et al., 2008 Cancer Res, 68(10): 3863-72; Idusogie et al., 2001 J Immunol, 166(4): 2571-5; Moore et al., 2010 mAbs, 2(2): 181-189; Lazar et al., 2006 PNAS, 103(11): 4005-4010, Shields et al., 2001 JBC, 276(9): 6591-6604; Stavenhagen et al.,

2007 Cancer Res, 67(18): 8882-8890; Stavenhagen et al., 2008 Advan. Enzyme Regul., 48: 152-164; Alegre et al, 1992 J Immunol, 148: 3461-3468; обзор в Kaneko and Niwa, 2011 Biodrugs, 25(1):1-11.

[0295] Примеры мутаций, которые усиливают ADCC, включают модификацию по Ser239 и Ile332, например Ser239Asp и Ile332Glu (S239D, I332E). Примеры мутаций, которые усиливают CDC, включают модификации по Lys326 и Glu333. В некоторых вариантах осуществления Fc-область модифицирована в одном или обоих этих положениях, например Lys326Ala и/или Glu333Ala (K326A и E333A) в соответствии с системой нумерации Kabat.

[0296] В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка изменена в одном или более из следующих положений для уменьшения связывания с Fc-рецептором: Leu 234 (L234), Leu235 (L235), Asp265 (D265), Asp270 (D270), Ser298 (S298), Asn297 (N297), Asn325 (N325), Ala327 (A327) или Pro329 (P329). Например, Leu 234Ala (L234A), Leu235Ala (L235A), Leu235Glu (L235E), Asp265Asn (D265N), Asp265Ala (D265A), Asp270Asn (D270N), Ser298Asn (S298N), Asn297Ala (N297A), Pro329Ala (P329A) или Pro239Gly (P329G), Asn325Glu (N325E) или Ala327Ser (A327S). В предпочтительных вариантах осуществления модификации в Fc-области уменьшают связывание с Fc-рецептор-гамма рецепторами, при этом имеют минимальное влияние на связывание с неонатальным Fc рецептором (FcRn).

[0297] В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG1 человека модифицирована по аминокислоте Asn297 (нумерация Kabat) для предотвращения гликозилирования слитого белка, например, Asn297Ala (N297A) или Asn297Asp (N297D). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка модифицирована по аминокислоте Leu235 (нумерация Kabat) для изменения взаимодействий с Fc рецептором, например Leu235Glu (L235E) или Leu235Ala (L235A). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка модифицирована по аминокислоте Leu234 (нумерация Kabat) для изменения взаимодействий с Fc рецептором, например Leu234Ala (L234A). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка модифицирована по аминокислоте Leu234 (нумерация Kabat) для изменения взаимодействий с Fc рецептором, например Leu235Glu (L235E). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка изменена по обеим аминокислотам 234 и 235, например Leu234Ala и Leu235Ala (L234A/L235A) или Leu234Val и Leu235Ala (L234V/L235A). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка изменена по аминокислотам 234, 235 и 297, например Leu234Ala, Leu235Ala, Asn297Ala (L234A/L235A/N297A). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка изменена по аминокислотам в положении 234, 235 и 329, например Leu234Ala, Leu235Ala, Pro239Ala (L234A/L235A/P329A). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка модифицирована по аминокислоте Asp265 (нумерация Kabat) для изменения взаимодействий с Fc рецептором, например Asp265Ala (D265A). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка модифицирована по аминокислоте

Pro329 (нумерация Kabat) для изменения взаимодействий с Fc рецептором, например Pro329Ala (P329A) или Pro329Gly (P329G). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка изменена по обеим аминокислотам 265 и 329, например Asp265Ala и Pro329Ala (D265A/P329A) или Asp265Ala и Pro329Gly (D265A/P329G). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка изменена по аминокислотам в положении 234, 235 и 265, например Leu234Ala, Leu235Ala, Asp265Ala (L234A/L235A/D265A). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка изменена по аминокислотам в положении 234, 235 и 329, например Leu234Ala, Leu235Ala, Pro329Gly (L234A/L235A/P329G). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка изменена по аминокислотам в положении 234, 235, 265 и 329, например Leu234Ala, Leu235Ala, Asp265Ala, Pro329Gly (L234A/L235A/D265A/P329G). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка изменена по Gly235 для уменьшения связывания с Fc-рецептором. Например, где Gly235 удален из слитого белка. В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG1 человека модифицирована по аминокислоте Gly236 для усиления взаимодействия с CD32A, например Gly236Ala (G236A). В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG1 человека не содержит Lys447 (EU index of Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest).

[0298] В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка не содержит аминокислоту в одном или более из следующих положений для уменьшения связывания с Fc-рецептором: Glu233 (E233), Leu234 (L234) или Leu235 (L235). В некоторых вариантах осуществления Fc-область слитого белка не содержит аминокислоту в одном или более из следующих положений Glu233 (E233), Leu234 (L234) или Leu235 (L235) и модифицирована в одном или более из следующих положений Asp265 (D265), Asn297 (N297) или Pro329 (P329) для уменьшения связывания с Fc-рецептором. Например, Fc-область, включенная в CD28-связывающий полипептид, получена из человеческого Fc домена и включает делецию трех аминокислот в нижнем шарнире, соответствующих IgG1 E233, L234 и L235. В некоторых аспектах такие Fc полипептиды не связываются с FcγRs и, таким образом, называются “эффектор-молчащими” или “эффектор-нулевыми”. Например, делеция в Fc этих трех аминокислот уменьшает связывание белка комплемента C1q. В некоторых вариантах осуществления полипептид с Fc-областью с делецией этих трех аминокислот сохраняет связывание с FcRn и, следовательно, имеет увеличенный период полужизни и трансцитоз, связанный с FcRn-опосредованным рециклингом. Такая модифицированная Fc-область называется "Fc xELL" или "Fc делеция" и имеет следующую аминокислотную последовательность:

PAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)

[0299] В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина или ее иммунологически активный фрагмент включает полипептидную последовательность IgG1

человека, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

[0300] В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG человека модифицирована для усиления связывания FcRn. Примерами мутаций Fc, которые усиливают связывание с FcRn, являются Met252Tyr, Ser254Thr, Thr256Glu (M252Y, S254T, T256E, соответственно) (нумерация Kabat, Dall'Acqua et al 2006, J. Biol Chem Vol. 281(33) 23514-23524), Met428Leu и Asn434Ser (M428L, N434S) (Zalevsky et al 2010 Nature Biotech, Vol. 28(2) 157-159) или Met252Ile, Thr256Asp, Met428Leu (M252I, T256D, M428L, соответственно), (EU index of Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest).

[0301] В некоторых вариантах осуществления Fc домен, включенный в CD28-связывающий полипептид, получен из человеческого Fc домена и включает мутации M252Y и M428V, в настоящей заявке указанные как "Fc-YV". В некоторых вариантах осуществления мутантный или модифицированный Fc полипептид включает следующие мутации: M252Y и M428L в соответствии с системой нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления такие мутации усиливают связывание с FcRn при кислотном pH эндосомы (около 6,5), теряя при этом определяемое связывание при нейтральном pH (около 7,2), обеспечивая возможность повышенного FcRn-опосредованного рециклинга и увеличенного периода полужизни.

[0302] В конкретных вариантах осуществления мультиспецифических полипептидных конструкций, представленных в настоящей заявке, Fc домен, включенный в CD28-связывающий полипептид, получен из человеческого Fc домена и включает мутации для индукции гетеродимеризации. В некоторых вариантах осуществления такие мутации включают те, которые называются мутациями "выступ" и "впадина". Например, аминокислотная модификация присутствует в CH3 домене по Thr366, который при замене более объемной аминокислотой, например Try (T366W), может предпочтительно спариваться со вторым CH3 доменом, имеющим аминокислотные модификации до менее объемных аминокислот в положениях Thr366, Leu368 и Tyr407, например Ser, Ala и Val, соответственно (T366S/L368A/Y407V). В некоторых вариантах осуществления Fc домен "выступ" включает мутацию T366W. В некоторых вариантах осуществления Fc домен "впадина" включает мутации T366S, L368A и Y407V. Гетеродимеризацию посредством модификаций CH3 можно дополнительно стабилизировать введением дисульфидной связи, например путем замены Ser354 на Cys (S354C) и Y349 на Cys (Y349C) на противоположных CH3 доменах (см. обзор в Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7-15). В некоторых вариантах осуществления Fc домены, используемые для гетеродимеризации, включают дополнительные мутации, такие как мутация S354C в первом члене гетеродимерной Fc пары, которая образует асимметричный дисульфид с соответствующей мутацией Y349C во втором члене гетеродимерной Fc пары. В некоторых вариантах осуществления один член гетеродимерной Fc пары включает

модификацию H435R или H435K для предотвращения связывания белка A, сохраняя при этом связывание FcRn. В некоторых вариантах осуществления один член гетеродимерной Fc пары включает модификацию H435R или H435K, в то время как второй член гетеродимерной пары Fc не модифицирован по H435. В различных вариантах осуществления Fc домен в виде впадины содержит модификацию H435R или H435K (называемую “впадина-R” в некоторых случаях, когда модификация представляет собой H435R), тогда как Fc домен в виде выступа не содержит. В некоторых случаях мутация впадина-R улучшает очистку гетеродимера по сравнению с гомодимерными доменами Fc в виде впадины, которые могут присутствовать.

[0303] В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG человека модифицирована для предотвращения димеризации. В этих вариантах осуществления слитые белки по настоящему изобретению являются мономерными. Например, модификация остатка Thr366 в заряженный остаток, например Thr366Lys, Thr366Arg, Thr366Asp, или Thr366Glu (T366K, T366R, T366D или T366E, соответственно), предотвращает CH3-CH3 димеризацию.

[0304] В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина или иммунологически активный фрагмент слитого белка представляет собой изотип IgG2 человека, имеющий аминокислотную последовательность:

PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10)

[0305] В некоторых вариантах осуществления слияние или его иммунологически активный фрагмент включает полипептидную последовательность IgG2 человека, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

[0306] В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG2 человека модифицирована по аминокислоте Asn297 (например, для предотвращения гликозилирования антитела, например Asn297Ala (N297A) или Asn297Asp (N297D). В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG2 человека не содержит Lys447 (EU index of Kabat et al Sequences of Proteins of Immunological Interest).

[0307] В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина или иммунологически активный фрагмент слитого белка представляет собой изотип IgG3 человека, имеющий аминокислотную последовательность:

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST FRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNRFTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

[0308] В некоторых вариантах осуществления антитело или его иммунологически

активный фрагмент включает полипептидную последовательность IgG3 человека, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

[0309] В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG3 человека модифицирована по аминокислоте Asn297 (нумерация Kabat) для предотвращения гликозилирования антитела, например Asn297Ala (N297A) или Asn297Asp (N297D). В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG3 человека модифицирована по аминокислоте 435 для продления периода полужизни, например Arg435His (R435H). В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG3 человека не содержит Lys447 (EU index of Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest).

[0310] В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина или иммунологически активный фрагмент слитого белка представляет собой изотип IgG4 человека, имеющий аминокислотную последовательность:

PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 12)

[0311] В некоторых вариантах осуществления антитело или его иммунологически активный фрагмент включает полипептидную последовательность IgG4 человека, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

[0312] В некоторых вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина или иммунологически активный фрагмент слитого белка представляет собой изотип IgG4 человека, имеющий аминокислотную последовательность:

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 13)

[0313] В некоторых вариантах осуществления антитело или его иммунологически активный фрагмент включает полипептидную последовательность IgG4 человека, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

[0314] В некоторых вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG4 модифицирована по аминокислоте 235 для изменения взаимодействий с Fc рецептором, например Leu235Glu (L235E). В некоторых вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG4 модифицирована по аминокислоте Asn297 (нумерацияя Kabat) для предотвращения гликозилирования антитела, например Asn297Ala (N297A) или Asn297Asp (N297D). В некоторых вариантах осуществления Fc-область человеческого

IgG4 не содержит Lys447 (EU index of Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest).

[0315] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит полипептид, полученный из шарнирной области иммуноглобулина. Шарнирная область может быть выбрана из любого из подклассов человеческого IgG. Например, слитый белок может содержать модифицированный шарнир IgG1, имеющий последовательность EPKSSDKTHTCPPC (SEQ ID NO: 14), где Cys220, который образует дисульфид с C-концевым цистеином легкой цепи, мутирован в серин, например Cys220Ser (C220S). В других вариантах осуществления слитый белок содержит усеченный шарнир, имеющий последовательность DKTHTCPPC (SEQ ID NO: 15).

[0316] В некоторых вариантах осуществления слитый белок имеет модифицированный шарнир из IgG4, который модифицирован для предотвращения или уменьшения обмена цепями, например Ser228Pro (S228P), имеющий последовательность ESKYGPPCPPC (SEQ ID NO: 16). В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит линкерные полипептиды. В других вариантах осуществления слитый белок содержит линкерные и шарнирные полипептиды.

[0317] В некоторых вариантах осуществления в Fc-области отсутствует фукоза или содержится уменьшенное количество фукозы, присоединенной к N-связанной гликановой цепи в положении N297. Существует множество способов предотвращения фукозилирования, включая, но не ограничиваясь этим, продуцирование в FUT8-дефицитной клеточной линии; добавление ингибиторов к средам для культивирования клеток млекопитающих, например кастаноспермина; и метаболическая инженерия продуцирующей клеточной линии.

[0318] В некоторых вариантах осуществления Fc-область сконструирована для исключения распознавания предсуществующими антителами, обнаруженными у людей. В некоторых вариантах осуществления VHH-содержащие полипептиды по настоящему изобретению модифицированы посредством мутации положения 11 и посредством изменений в карбокси-концевой области. В некоторых вариантах осуществления VHH-содержащие полипептиды по настоящему изобретению модифицированы посредством мутации положения Leu11, например Leu11Glu (L11E) или Leu11Lys (L11K). В некоторых вариантах осуществления VHH-содержащие полипептиды по настоящему изобретению содержат карбокси-концевые модификации Ser112Lys (S112K) и Ser113Pro (S113P). Например, гуманизированные варианты однодоменных антител по настоящему изобретению могут содержать модификацию Leu11Glu (L11E) и карбокси-концевые модификации Ser112Lys (S112K) и Ser113Pro (S113P), поскольку известно, что они предотвращают или уменьшают распознавание предсуществующих ADA, направленных на sdAbs (как описано в US20160207981). В других вариантах осуществления однодоменные антитела по настоящему изобретению модифицированы посредством изменений в карбокси-концевой области, например концевая последовательность имеет последовательность GQGTLVTVKPGG (SEQ ID NO: 17 или GQGTLVTVEPGG (SEQ ID

NO: 18) или ее модификацию.

[0319] В некоторых вариантах осуществления один или более полипептидов из слитых белков по настоящему изобретению функционально связаны через аминокислотные линкеры. В некоторых вариантах осуществления эти линкеры состоят преимущественно из аминокислот Глицина и Серина, обозначенные в настоящей заявке как GS-линкеры. GS-линкеры слитых белков по настоящему изобретению могут быть различной длины, например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 аминокислот в длину.

[0320] В некоторых вариантах осуществления GS-линкер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GGSGGS, т.е. $(GGS)_2$ (SEQ ID NO: 1); GGSGGSGGS, т.е. $(GGS)_3$ (SEQ ID NO: 2); GGSGGSGGSGGS, т.е. $(GGS)_4$ (SEQ ID NO: 3); и GGSGGSGGSGGSGGS, т.е. $(GGS)_5$ (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гибкий линкер, включающий глициновые остатки, такие как, в качестве неограничивающего примера, GG (SEQ ID NO:249), GGG (SEQ ID NO:87), GGGG (SEQ ID NO: 5), GGGGG (SEQ ID NO: 6) и GGGGGG (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (GGGGS)n, где n имеет значение от 1 до 5 (SEQ ID NO:123); (GGGGGS)n, где n имеет значение от 1 до 4 (SEQ ID NO:124); GGGGS (SEQ ID NO:125); GGGGGS (SEQ ID NO:126); GGGGGSGGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:127); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:128); GGSGGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:129); или PGGGG (SEQ ID NO:250). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GGSGGGGS (SEQ ID NO:89). В некоторых вариантах осуществления слитые белки могут включать комбинацию GS-линкера и глицинового линкера.

B. Конъюгаты

[0321] В настоящей заявке представлены конъюгаты, содержащие по меньшей мере один VHH домен, который специфически связывается с CD28, представленным в настоящей заявке, и один или более дополнительных фрагментов. Дополнительный фрагмент может быть терапевтическим средством, таким как цитотоксическое средство, или может быть детектирующим средством. В некоторых вариантах осуществления фрагмент может представлять собой нацеливающий фрагмент, низкомолекулярное лекарственное средство (не-полипептидное лекарственное средство с молекулярной массой менее 500 дальтон), токсин, цитостатическое средство, цитотоксическое средство, иммунодепрессант, радиоактивное вещество, подходящее для диагностических целей, радиоактивный металлический ион для терапевтических целей, активирующий пролекарство фермент, средство, увеличивающее биологический период полужизни, или диагностическое или рентгеноконтрастное средство.

[0322] В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC, также называемый иммуноконъюгатом), содержащий один или более CD28 VHH доменов, представленных в настоящей заявке, конъюгированных с терапевтическим средством, которое является

цитотоксическим, цитостатическим или иным образом обеспечивает некоторую терапевтическую пользу. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство, лекарственное средство, ингибирующее рост средство, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат). В некоторых вариантах осуществления представленные конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению обеспечивают направленную доставку лекарственного фрагмента к опухолям. В некоторых случаях это может привести к целенаправленному уничтожению опухолевой клетки.

[0323] В некоторых вариантах осуществления представлен CD28-связывающий конъюгат, включающий по меньшей мере один CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, конъюгированный с терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство включает, например, дауномицин, доксорубицин, метотрексат и виндезин (Rowland et al., Cancer Immunol. Immunother. 21:183-187, 1986). В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство обладает внутриклеточной активностью. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий конъюгат интернализуется, а терапевтическое средство представляет собой цитотоксин, который блокирует синтез белка в клетке, что приводит к гибели клетки. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой цитотоксин, включающий полипептид, обладающий инактивирующей рибосомы активностью, включая, например, гелонин, буганин, сапорин, рицин, А-цепь рицина, бриодин, дифтерийный токсин, рестриктоцин, экзотоксин А Pseudomonas и его варианты. В некоторых вариантах осуществления, где терапевтический средство представляет собой цитотоксин, включающий полипептид, обладающий активностью инактивации рибосом, CD28-связывающий конъюгат должен интернализоваться при связывании с клеткой-мишенью, чтобы белок был цитотоксичным для клеток.

[0324] В некоторых вариантах осуществления представлен CD28-связывающий конъюгат, включающий по меньшей мере один CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, конъюгированный с токсином. В некоторых вариантах осуществления токсин включает, например, бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, растительные токсины, такие как рицин, низкомолекулярные токсины, такие как гелданамицин (Mandler et al., J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573- 1581 (2000); Mandler et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028 (2000); Mandler et al., Bioconjugate Chem. 13:786-791 (2002)), майтансиноиды (EP 1391213; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)) и калихеамицин (Lode et al., Cancer Res. 58:2928 (1998); Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)). Токсины могут проявлять цитотоксические и цитостатические эффекты посредством механизмов, включающих связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы.

[0325] В некоторых вариантах осуществления представлен CD28-связывающий

конъюгат, включающий по меньшей мере один CD28 VHH домен, представленный в настоящей заявке, конъюгированный с меткой, которая может опосредованно или непосредственно генерировать детектируемый сигнал. Эти IgSF конъюгаты можно использовать для исследований или диагностических применений, таких как обнаружение рака in vivo. Метка предпочтительно способна производить, непосредственно или опосредованно, детектируемый сигнал. Например, метка может представлять собой рентгеноконтрастное вещество или радиоизотоп, такой как 3H, 14C, 32P, 35S, 123I, 125I, 131I; флуоресцентное (флуорофор) или хемилюминесцентное (хромофор) соединение, такое как изотиоцианат флуоресцеина, родамин или люциферин; фермент, такой как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза или пероксидаза хрена; средство визуализации; или ион металла. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например, 99Tc или 123I, или спиновую метку для визуализации методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известную как магнитно-резонансная томография, МРТ), такую как цирконий-89, йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо. Цирконий-89 может образовывать комплексы с различными металл-хелатирующими агентами и быть конъюгированным с антителами, например, для ПЭТ-визуализации (WO 2011/056983).

[0326] CD28-связывающие конъюгаты могут быть получены с использованием любых способов, известных в данной области. См., например, WO 2009/067800, WO 2011/133886 и публикацию патентной заявки США № 2014322129, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

[0327] В некоторых вариантах осуществления присоединение может быть ковалентным или нековалентным, например, посредством нековалентного взаимодействия биотин-стрептавидин. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5 или более фрагментов, которые могут быть одинаковыми или разными, конъюгированы, связаны или слиты с CD28 VHH доменом с образованием CD28-связывающего конъюгата. В некоторых вариантах осуществления такие фрагменты могут быть присоединены к VHH домену с использованием различных методов молекулярно-биологической или химической конъюгации и связывания, известных в данной области и описанных ниже. В некоторых вариантах осуществления линкеры, такие как пептидные линкеры, расщепляемые линкеры, нерасщепляемые линкеры или линкеры, которые помогают в реакции конъюгации, можно использовать для связывания или конъюгирования эффекторных фрагментов с вариантным полипептидом или иммуномодулирующим белком.

[0328] В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен конъюгирован с одним или более фрагментами, например от около 1 до около 20 групп лекарственного средства на VHH, через линкер (L). В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий конъюгат включает следующие компоненты: (VHH-домен), $(L)_q$ и $(\text{фрагмент})_m$, где VHH-домен представляет собой любой из описанных VHH доменов,

способных специфически связывать CD28, как описано; L представляет собой линкер для связывания белка или полипептида с фрагментом; m имеет значение по меньшей мере 1; q имеет значение 0 или более; и полученный CD28-связывающий конъюгат связывается с CD28. В конкретных вариантах осуществления m имеет значение от 1 до 4, а q имеет значение от 0 до 8.

[0329] Линкер может состоять из одного или более линкерных компонентов. Для ковалентного связывания антитела и лекарственного компонента линкер обычно имеет две реакционноспособные функциональные группы, т.е. бивалентность в смысле реактивности. Известны двухвалентные линкерные реагенты, которые можно использовать для присоединения двух или более функциональных или биологически активных компонентов, таких как пептиды, нуклеиновые кислоты, лекарственные средства, токсины, антитела, гаптены и репортерные группы, и описаны методы получения их конъюгатов (Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: New York, p 234-242)..

[0330] Примеры линкерных компонентов включают 6-малеимидокапроил («MC»), малеимидопропаноил («MP»), валин-цитруллин («val-cit»), аланин-фенилаланин («ala-phe»), п-аминобензилоксикарбонил («PAB»), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат («SPP»), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-I карбоксилат («SMCC») и N-сукцинимидил-(4-йод-ацетил)аминобензоат ("SIAB").

[0331] В некоторых вариантах осуществления линкер может включать аминокислотные остатки. Примеры аминокислотных линкерных компонентов включают дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Примеры дипептидов включают: валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe). Примеры трипептидов включают: глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly). Аминокислотные остатки, которые содержат аминокислотный линкерный компонент, включают остатки, встречающиеся в природе, а также минорные аминокислоты и не встречающиеся в природе аналоги аминокислот, такие как цитруллин. Аминокислотные линкерные компоненты могут быть сконструированы и оптимизированы по их селективности в отношении ферментативного расщепления конкретными ферментами, например опухоль-ассоциированной протеазой, катепсином B, C и D и протеазой плазмином.

[0332] Конъюгаты VHH домена и цитотоксического средства могут быть получены с использованием различных бифункциональных белок-связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидильный субстрат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и биактивные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол).

[0333] Конъюгат антитело-лекарственное средство можно получить различными способами, такими как реакции, условия и реагенты, используемые в органической химии, известные специалистам в данной области. В одном варианте осуществления способы включают: (1) взаимодействие нуклеофильной группы VHH домена с двухвалентным линкерным реагентом с образованием VHH-L посредством ковалентной связи с последующим взаимодействием с лекарственным компонентом D; и (2) взаимодействие нуклеофильной группы лекарственного компонента с двухвалентным линкерным реагентом с образованием DL посредством ковалентной связи с последующим взаимодействием с нуклеофильной группой VHH домена.

[0334] Нуклеофильные группы на антителах, включая VHH домены, включают, но не ограничиваются этим: (i) N-концевые аминогруппы, (ii) аминогруппы боковой цепи, например лизин, (iii) тиоловые группы боковой цепи, например цистеин, и (iv) гидроксильные или аминогруппы сахаров, где антитело гликозилировано. Аминовые, тиоловые и гидроксильные группы являются нуклеофильными и способны взаимодействовать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных фрагментах и линкерных реагентах, включая: (i) активные сложные эфиры, такие как сложные эфиры NHS, сложные эфиры HOBt, галогенформиаты и галогенангидриды; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галогенгенацетамиды; (iii) альдегиды, кетоны, карбоксильные и малеимидные группы. Дополнительные нуклеофильные группы могут быть введены в антитела посредством реакции лизинов с 2-иминотиоланом (реагент Траута), приводящей к преобразованию амина в тиол. Реакционноспособные тиоловые группы могут быть введены в антитело (или его фрагмент) путем введения одного, двух, трех, четырех или более цистеиновых остатков (например, путем получения мутантных антител, содержащих один или более ненативных аминокислотных цистеиновых остатков).

[0335] Конъюгаты, такие как конъюгаты антитело-лекарственное средство, также могут быть получены путем модификации антитела, такого как VHH домен, для введения электрофильных групп, которые могут взаимодействовать с нуклеофильными заместителями в линкерном реагенте или лекарственном средстве. Сахара гликозилированных антител могут быть окислены, например периодатными окисляющими реагентами, с образованием альдегидных или кетоновых групп, которые могут связываться с аминогруппой линкерных реагентов или лекарственных компонентов. Образующиеся группы иминовых оснований Шиффа могут образовывать стабильную связь или могут быть восстановлены, например, боргидридными реагентами с образованием стабильных аминовых связей. В одном варианте осуществления взаимодействие углеводной части гликозилированного антитела либо с глюкозооксидазой, либо с метапериодатом натрия может давать карбонильные (альдегидные и кетоновые) группы в белке, которые могут взаимодействовать с соответствующими группами лекарственного средства (Hermanson, Bioconjugate Techniques). В другом варианте осуществления белки, содержащие N-концевые сериновые

или треониновые остатки, могут взаимодействовать с метапериодатом натрия, что приводит к образованию альдегида вместо первой аминокислоты. Такой альдегид может взаимодействовать с лекарственным компонентом или линкерным нуклеофилом.

[0336] Аналогично, нуклеофильные группы в молекуле лекарственного средства включают, но не ограничиваются этим: аминовые, тиоловые, гидроксильные, гидразидные, оксимные, гидразиновые, тиосемикарбазоновые, гидразинкарбоксилатные и арилгидразидные группы, способные к взаимодействию с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных фрагментах и линкерных реагентах, включая: (i) активные сложные эфиры, такие как сложные эфиры NHS, сложные эфиры HOBi, галогенформиаты и галогенангидриды; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегиды, кетоны, карбоксильные и малеимидные группы.

[0337] Альтернативно, слитый белок, содержащий VHH домен и цитотоксический средство, может быть получен, например, рекомбинантными методами или пептидным синтезом. Длина ДНК может включать соответствующие области, кодирующие две части конъюгата, либо смежные друг с другом, либо разделенные областью, кодирующей линкерный пептид, что не нарушает желаемых свойств конъюгата.

C. Мультиспецифические форматы

[0338] В настоящей заявке представлены CD28-связывающие полипептиды, которые являются мультиспецифическими, содержащими по меньшей мере один VHH домен, который связывается с CD28, и один или более дополнительных связывающих доменов (BD). В некоторых вариантах осуществления способность мультиспецифического CD28-связывающего полипептида связывать CD28 обусловлена связыванием одного или более дополнительных связывающих доменов с их партнером по связыванию. Типично один или более дополнительных связывающих доменов связываются с антигеном, отличным от CD28. В некоторых вариантах осуществления эти один или более дополнительных связывающих доменов представляют собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфический в отношении другого антигена, такого как антиген, экспрессируемый активированной Т-клеткой, истощенной Т-клеткой или другим типом клетки в микроокружении опухоли (TME). В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных связывающих доменов представляют собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфический в отношении другого антигена, такого как опухоль-ассоциированный антиген (TAA). В некоторых вариантах осуществления дополнительный домен представляет собой VHH домен, такой как TAA VHH (sdAb).

[0339] В некоторых примерах мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды дополнительно включают Fc домен. В некоторых вариантах осуществления включение Fc домена обеспечивает возможность димеризации двух CD28-связывающих полипептидов, удваивая таким образом количество CD28 VHH и/или BD. В некоторых вариантах осуществления включение Fc домена обеспечивает возможность димеризации двух CD28-связывающих полипептидов, удваивая таким образом количество CD28 VHH

и/или TAA VHH.

[0340] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды дополнительно включают CD3-связывающую область. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область не может связываться или не может по существу связываться с CD3, пока один или более дополнительных связывающих доменов (например, TAA sdAb) не будут связаны с их партнерами по связыванию (например, TAA или другим антигеном).

[0341] Неограничивающие иллюстративные мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды описаны ниже.

a. Обусловленные CD28 мультиспецифические конструкции

[0342] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид представляет собой мультиспецифический CD28-связывающий полипептид, имеющий по меньшей мере один CD28 VHH и один или более дополнительных связывающих доменов (BD), которые связываются с антигеном, отличным от CD28 (например, однодоменное антитело, которое связывается с опухоль-ассоциированным антигеном или другим антигеном, присутствующим в TME). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид представляет собой обусловленный мультиспецифический CD28-связывающий полипептид. Например, обусловленные мультиспецифические CD28-связывающие пептиды не могут, или не могут по существу связываться с CD28, пока один или более дополнительных связывающих доменов не будут связаны со своими партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления, когда партнер по связыванию (например, TAA или другой антиген, присутствующий в TME) связывается с одним или более дополнительными связывающими доменами (например, BD sdAb, таким как TAA sdAb), CD28-мультиспецифический полипептид способен к связыванию с CD28.

[0343] В некоторых вариантах осуществления обусловленные мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды, представленные в настоящей заявке, существуют в двух состояниях с точки зрения способности к связыванию с CD28 и последующей стимуляции Т-клеток: (1) «неактивное» состояние возникает, когда отсутствует связывание какого-либо или всех антигенсвязывающих доменов со своим антигеном (например, TAA), так что связывание CD28 является обусловленным, а стимуляция Т-клеток не происходит или уменьшается, и (2) «активное» состояние возникает при связывании своего антигена (например, TAA) каким-либо или всеми антигенсвязывающими доменами, так что CD28-связывающая область способна связываться с CD28, и может происходить стимуляция Т-клеток.

[0344] В некоторых вариантах осуществления обусловленные мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды, представленные в настоящей заявке, существуют в двух состояниях с точки зрения способности проявлять агонизм в отношении CD28 с последующей стимуляцией Т-клеток: (1) «неактивное» состояние возникает, еогда присутствует связывание с CD28, но не вызывается передача сигналов, и

стимуляция Т-клеток не происходит или уменьшается, и (2) «активное» состояние возникает при взаимодействии конструкции через один или более дополнительных антигенсвязывающих доменов, которые связывают антиген, отличный от CD28, таким образом, чтобы область связывания CD28 была способна проявлять агонизм в отношении CD28 и чтобы была возможна стимуляция Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления агонизм в отношении CD28 является обусловленным, то есть он зависит от совместного связывания одного или более связывающих доменов, которые связывают антиген, отличный от CD28, со своим антигеном.

a. CD28-связывающий домен

[0345] Мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды включают по меньшей мере один CD28-связывающий домен, такой как однодоменное антитело (VHH домен), которое связывается с CD28, и один или более дополнительных связывающих доменов (BD; например, sdAb), которые связываются с антигеном, который является отличным от CD28. В некоторых вариантах осуществления этот другой антиген представляет собой опухоль-ассоциированный антиген (TAA) или ассоциированный с микроокружением опухоли антиген (TMEAA). В некоторых вариантах осуществления этот второй антиген представляет собой иммуномодулирующий антиген, при этом указанный антиген вовлечен в усиление или подавление сигнального пути в иммунной клетке. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления представленные мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды включают по меньшей мере одно CD28 sdAb (VHH) и одно или более TAA sdAb. В некоторых вариантах осуществления представленные мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды включают по меньшей мере одно CD28 sdAb (VHH) и один или более BD, которые связываются с антигеном в TME. В некоторых вариантах осуществления антиген в TME представляет собой антиген, экспрессируемый активированными и/или истощенными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления антиген в TME представляет собой антиген, экспрессируем другими Т-клетками в TME.

[0346] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает одно CD28 sdAb (т.е. мультиспецифический C28-связывающий полипептид является одновалентным для CD28). Один CD28 может представлять собой или содержать любую из последовательностей CD28 sdAb, как описано в Разделе II. В некоторых вариантах осуществления одно CD28 sdAb представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, 220 или 280. В некоторых вариантах осуществления одно CD28 sdAb представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления одно CD28 sdAb представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:220. В некоторых вариантах осуществления одно CD28 sdAb представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:280.

[0347] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-

связывающий полипептид является мультивалентнымым для CD28. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает два или более CD28 sdAb, например, три или более, четыре или более, пять или более, или шесть или более CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид включает два CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления два CD28 sdAb являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления два антитела к CD28 являются разными, например, они связываются с разными эпитопами CD28. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид включает четыре CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления все четыре CD28 sdAb являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления первые два из 4 CD28 sdAb являются идентичными, и остальные два из четырех CD28 sdAb являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления три из четырех CD28 sdAb являются идентичными, а четвертое из четырех CD28 sdAb является отличным от других трех. В любом из представленных вариантов осуществления включенные CD28 sdAb (VHH) представляют собой или содержат любую из последовательностей CD28 VHH, описанных в Разделе II.

[0348] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает по меньшей мере одно CD28 sdAb, имеющее аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает два CD28 sdAb, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает четыре CD28 sdAb, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает по меньшей мере одно CD28 sdAb, имеющее аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает два CD28 sdAb, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает четыре CD28 sdAb, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280.

b. TAA-связывающий домен

[0349] Представленные мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды содержат один или более TAA-связывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления один или более TAA-связывающих доменов представляют собой один или более TAA sdAb. В некоторых вариантах осуществления TAA является любым, описанным в Разделе IIIC(c)(ii). Одно TAA sdAb может представлять собой или содержать любую из последовательностей TAA sdAb, описанных в Разделе IIIC(c)(ii).

[0350] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-

связывающий полипептид является одновалентным для TAA, при этом мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает одно однодоменное антитело (или VHH), которое связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA).

[0351] В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой PDL1. В некоторых вариантах осуществления TAA sdAB содержит CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO:100, 101 и 102, соответственно. В некоторых вариантах осуществления TAA sdAb представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:99.

[0352] В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой 5T4. В некоторых вариантах осуществления TAA sdAB содержит CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO:241, 242 и 243, соответственно. В некоторых вариантах осуществления TAA sdAb представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:240. В некоторых вариантах осуществления TAA sdAB содержит CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO:246, 247 и 248, соответственно. В некоторых вариантах осуществления TAA sdAb представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:245.

[0353] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид содержит один или более TAA-связывающих доменов, таких как одно или более TAA sdAb. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает два или более TAA VHH домена, например, три или более, четыре или более, пять или более, или шесть или более TAA VHH доменов. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает 2 TAA sdAb. В некоторых вариантах осуществления два TAA sdAb связываются с одним и тем же TAA. В некоторых вариантах осуществления два TAA sdAb связываются с одним и тем же эпитопом одного и того же TAA. В некоторых вариантах осуществления два TAA sdAb связываются с разными эпитопами одного и того же TAA. В некоторых вариантах осуществления два TAA sdAb связываются с разными TAA. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид включает четыре TAA sdAb. В некоторых вариантах осуществления все четыре TAA sdAb связываются с одним и тем же TAA. В некоторых вариантах осуществления первые два из 4 TAA sdAb связываются с первым TAA, а другие два из четырех TAA sdAb связываются с другим TAA. В некоторых вариантах осуществления три из четырех TAA sdAb связываются с одним и тем же TA, а четвертый из четырех TAA sdAb связывается с другим TAA. В любом из представленных вариантов осуществления TAA является любым, описанным в Разделе IIIC(c)(ii). В любом из представленных вариантов осуществления включенные TAA sdAb (VHH) представляют собой или содержат любую из последовательностей TAA VHH, описанную в Разделе IIIC(c)(ii).

[0354] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает по меньшей мере одно TAA sdAb, имеющее

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:99. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает два TAA sdAb, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:99.

[0355] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает по меньшей мере одно TAA sdAb, имеющее аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:240. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает два TAA sdAb, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:245. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает TAA sdAb, имеющее аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:240, и TAA sdAb, имеющее аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:245.

[0356] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид содержит от N-конца к C-концу: (TAA sdAb)-линкер-(CD28 sdAb). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид содержит от N-конца к C-концу: (TAA sdAb)-линкер-(TAA sdAb)-линкер-(CD28 sdAb). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид содержит от N-конца к C-концу: (TAA sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-(CD28 sdAb). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид содержит от N-конца к C-концу: (TAA sdAb)-линкер-(TAA sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-(CD28 sdAb).

[0357] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая полипептидная конструкция включает фрагмент, который связывается с белком A. В некоторых вариантах осуществления белок A-связывающий фрагмент способствует очистке мультиспецифических полипептидных конструкций, особенно не содержащих Fc-область.

c. Fc-область

[0358] В некоторых вариантах осуществления обусловленный мультиспецифический CD28-связывающий полипептид дополнительно включает Fc-область иммуноглобулина, такую как любая описанная в Разделе IIIA или IIIC(c)(iii).

[0359] В некоторых вариантах осуществления Fc-область связана с по меньшей мере одним CD28 sdAb через линкер или линкеры. В некоторых вариантах осуществления Fc-область связана с по меньшей мере одним CD28 sdAb через нерасщепляемый линкер или линкеры. В некоторых вариантах осуществления Fc-область связана с по меньшей мере одной CD28 VHH связывающей областью через расщепляемый линкер или иным образом нестабильный линкер или линкеры.

[0360] Представленные обусловленные мультиспецифические полипептидные конструкции включают конфигурацию, в которой Fc-область является C-концевой относительно по меньшей мере одного из по меньшей мере одного CD28 sdAb. В таком

варианте осуществления Fc домен и CD28 sdAb соединены через линкер, который является N-концевым по отношению к Fc-области. В некоторых вариантах осуществления Fc домен расположен в карбокси-концевой (С-концевой) области мультиспецифической полипептидной конструкции.

[0361] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид содержит один или более TAA-связывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно из одного или более TAA sdAb связано с по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления TAA sdAb является N-концевым по отношению к CD28 sdAb, таким образом, TAA sdAb связан с CD28 sdAb на С-конце TAA sdAb.

[0362] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает от N-конца к С-концу: (TAA sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-Fc. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает от N-конца к С-концу: (TAA sdAb)-линкер-(TAA sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-Fc. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает от N-конца к С-концу: (TAA sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-Fc. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает от N-конца к С-концу: (TAA sdAb)-линкер-(TAA sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-Fc.

[0363] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид представляет собой димер, образованный полипептидами, каждый из которых содержит Fc.

[0364] В некоторых вариантах осуществления обусловленная мультиспецифическая полипептидная конструкция представляет собой димер, в котором димеризация формируется путем ковалентных или нековалентных взаимодействий между двумя полипептидными цепями. В некоторых вариантах осуществления две полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, например межцепочечными дисульфидными связями. В некоторых вариантах осуществления Fc-область опосредует димеризацию через межцепочечные дисульфидные связи.

[0365] В некоторых вариантах осуществления обусловленная мультиспецифическая полипептидная конструкция содержит гомодимерную Fc-область (такую как любая описанная в Разделе IIIA или IIIC(c)(iii)), которая опосредует димеризацию CD28-связывающих полипептидных цепей, которые являются одинаковыми, таких как любые из описанных выше. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает две полипептидные цепи, каждая из которых включает, от N-конца к С-концу: (TAA sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-Fc. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает две полипептидные цепи, каждая из которых включает, от N-конца к С-концу: (TAA sdAb)-линкер-(TAA

sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-Fc. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает две полипептидные цепи, каждая из которых включает, от N-конца к C-концу: (TAA sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-Fc. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает две полипептидные цепи, каждая из которых включает, от N-конца к C-концу: (TAA sdAb)-линкер-(TAA sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-Fc.

[0366] В конкретных вариантах осуществления обусловленная мультиспецифическая полипептидная конструкция содержит гетеродимерную Fc-область (такую как любая описанная в Разделе IIIA или IIIC(c)(iii)), в которой, в некоторых случаях, полипептидные цепи мультиспецифической полипептидной конструкции являются разными (гетеродимер).

[0367] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид образован из двух полипептидов, или включает два полипептида, которые включают первый полипептид, включающий первый Fc полипептид гетеродимерной Fc-области, и необязательно по меньшей мере один CD28 VHH и/или один или более TAA-связывающих доменов; и второй полипептид, включающий второй Fc полипептид гетеродимерной Fc-области, и необязательно по меньшей мере один CD28 VHH и/или один или более TAA-связывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй полипептид включает по меньшей мере один CD28 VHH и один или более TAA-связывающих доменов, которые соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит ноль, один, два или три sdAb, которые связываются с CD28. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид содержит ноль, один, два или три sdAb, которые связываются с CD28. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит ноль, один, два или три TAA-связывающих домена, которые связываются с TAA. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид содержит ноль, один, два или три TAA-связывающих домена, которые связываются с TAA. В некоторых вариантах осуществления обусловленная мультиспецифическая полипептидная конструкция содержит по меньшей мере одно CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления обусловленная мультиспецифическая полипептидная конструкция содержит по меньшей мере два CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления обусловленная мультиспецифическая полипептидная конструкция содержит один или более TAA-связывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления обусловленная мультиспецифическая полипептидная конструкция содержит по меньшей мере два TAA-связывающих домена.

[0368] В некоторых случаях по меньшей мере одно из по меньшей мере одного CD28 sdAb находится в N-концевом положении относительно Fc полипептида. В некоторых случаях по меньшей мере один из одного или более TAA-связывающих доменов находится в N-концевом положении относительно Fc полипептида. В некоторых

случаях по меньшей мере один из одного или более TAA-связывающих доменов находится в N-концевом положении по отношению к по меньшей мере одному из по меньшей мере одного CD28 sdAb. В некоторых случаях по меньшей мере один из одного или более TAA-связывающих доменов и по меньшей мере один CD28 VHH домен находятся в N-концевом положении относительно Fc полипептида.

[0369] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид образован из двух полипептидов, или включает два полипептида, которые включают первый полипептид, имеющий первое TAA sdAb, CD28 VHH и первый Fc полипептид гетеродимерной Fc-области; и второй полипептид, имеющий второе TAA sdAb, при этом необязательно TAA является таким же или другим, CD28 VHH, при этом необязательно VHH является таким же или другим, и второй Fc полипептид гетеродимерной Fc-области. sdAb, которое связывается с TAA, может быть в амино-концевом положении относительно Fc полипептида гетеродимерной Fc и/или в амино-концевом положении относительно CD28 VHH. sdAb, которое связывается с TAA, может быть расположено в амино-концевом положении относительно Fc полипептида гетеродимерной Fc и в амино-концевом положении относительно по меньшей мере одного из по меньшей мере одного CD28 VHH.

[0370] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид образован из двух полипептидов, или включает два полипептида, включающих первый полипептид, имеющий одно или более TAA sdAb, по меньшей мере один CD28 VHH и первый Fc полипептид гетеродимерной Fc-области; и второй полипептид, имеющий второй Fc полипептид гетеродимерной Fc-области. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая полипептидная конструкция образована из двух полипептидов, или включает два полипептида, включающих первый полипептид, имеющий по меньшей мере один CD28 VHH и первый Fc полипептид гетеродимерной Fc-области; и второй полипептид, имеющий одно или более TAA sdAb и второй Fc полипептид гетеродимерной Fc-области. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая полипептидная конструкция образована из двух полипептидов, или включает два полипептида, включающих первый полипептид, имеющий одно или более TAA sdAb, по меньшей мере один CD28 VHH и первый Fc полипептид гетеродимерной Fc-области; и второй полипептид, имеющий одно или более TAA sdAb и второй Fc полипептид гетеродимерной Fc-области. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид образован из двух полипептидов, или включает два полипептида, включающих первый полипептид, имеющий одно или более TAA sdAb, по меньшей мере один CD28 VHH и первый Fc полипептид гетеродимерной Fc-области; и второй полипептид, имеющий по меньшей мере один CD28 VHH и второй Fc полипептид гетеродимерной Fc-области. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид образован из двух полипептидов, или включает два полипептида, включающих первый полипептид, имеющий одно или более TAA sdAb и первый Fc полипептид гетеродимерной Fc-области;

и второй полипептид, имеющий по меньшей мере один CD28 VHH и второй Fc полипептид гетеродимерной Fc-области.

[0371] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид не содержит CD3-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид связывает CD28 независимо от CD3.

b. Затрудненные CD3 мультиспецифические конструкции

[0372] В любом из представленных вариантов осуществления мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды дополнительно содержат CD3-связывающую область. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды включают по меньшей мере один CD28-связывающий домен (например, sdAb), один или более TAA-связывающих доменов (например, sdAb), Fc-область и CD3-связывающую область. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область является С-концевой относительно Fc-области. Например, в некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид включает, от N-конца к С-концу: (TAA sdAb)-линкер-(CD28 sdAb)-линкер-Fc-CD3-связывающую область.

[0373] В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область не способна, или по существу не способна, связываться или взаимодействовать с CD3, пока одна или более TAA-связывающих областей, или каждая из одной или более TAA-связывающих областей, не будет связана со своим антигеном. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды, представленные в настоящей заявке, существуют в двух состояниях с точки зрения способности к связыванию и/или взаимодействию с CD3: (1) «неактивное» состояние возникает, когда отсутствует связывание какого-либо или всех антигенсвязывающих доменов с TAA, таким образом, связывание CD3 является обусловленным и взаимодействие с CD3 отсутствует или уменьшается, и (2) «активное» состояние возникает при связывании антигена, когда какой-либо или все из антигенсвязывающих доменов связываются с TAA, так что CD3-связывающая область способна связываться с CD3.

[0374] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид дополнительно включает одну или более копий анти-CD3 связывающего домена. Анти-CD3 связывающие домены по изобретению активируют Т-клетки посредством связывания CD3 или члена CD3 комплекса на Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающие домены по изобретению специфически связываются с эпсилон-цепью CD3, также известной как CD3ε. Анти-CD3ε связывающие домены по изобретению активируют Т-клетки посредством связывания CD3ε на Т-клетках. Анти-CD3 связывающие домены по изобретению проявляют агонизм, стимулируют, активируют и/или иным образом усиливают CD3-опосредованную Т-клеточную активацию. Биологическая активность CD3 включает, например, активацию Т-

клеток и другую передачу сигналов посредством взаимодействия между CD3 и антигенсвязывающими субъединицами Т-клеточного рецептора (TCR). Например, анти-CD3 связывающие домены по настоящему изобретению полностью или частично активируют Т-клетки посредством связывания CD3ε на Т-клетках путем частичного или полного модулирования, например, агонистической активности, стимуляции, активации или иного усиления CD3-опосредованной активации Т-клеток.

[0375] CD3 связывающий домен может представлять собой любой описанный выше. В конкретных вариантах осуществления CD3 связывающий домен представляет собой Fv фрагмент антитела, который связывается с CD3ε (указанный в настоящей заявке как анти-CD3ε Fv фрагмент). В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε Fv фрагмент антитела представляет собой дисульфид-стабилизированный анти-CD3 связывающий Fv фрагмент (dsFv). В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающий домен является одновалентным для связывания CD3.

[0376] В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область представляет собой Fv фрагмент антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (Hv, также называемую VH) и вариабельную область легкой цепи (Lv, также называемую VL), такую как любая из описанных. В аспектах таких вариантов осуществления Fc-область иммуноглобулина представляет собой гетеродимерную Fc-область, содержащую два разных Fc полипептида, способных к гетеродимерной ассоциации между обоими полипептидами Fc гетеродимера, такую как любая описанная в настоящей заявке. В таких вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) CD3-связывающей области связаны на противоположных цепях гетеродимерной Fc.

[0377] В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область представляет собой Fv или dsFv SP34 (Pessano et ai. The EMBO Journal. 4: 337-344, 1985) или гуманизированного варианта SP34 (WO2015001085).

[0378] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен представляет собой Fv, такой как dsFv фрагмент, который включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен представляет собой Fv или dsFv фрагмент, в котором содержится последовательность VH CDR1, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO: 29); последовательность VH CDR2, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30); последовательность VH CDR3, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31), последовательность VL CDR1, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32); последовательность VL CDR2, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO: 33); и последовательность

VL CDR3, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 34). В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен представляет собой Fv, такой как dsFv фрагмент, который включает аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID NO: 35-65, 340, 341 или 283, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 66-84, 281, 338 или 339.

[0379] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает последовательность VH CDR1, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности TYAMN (SEQ ID NO: 29); последовательность VH CDR2, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30); последовательность VH CDR3, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31), последовательность VL CDR1, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32); последовательность VL CDR2, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности GTNKRAP (SEQ ID NO: 33); и последовательность VL CDR3, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 34).

[0380] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает последовательность VH CDR1, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 252); последовательность VH CDR2, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 286); последовательность VH CDR3, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31), последовательность VL CDR1, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32); последовательность VL CDR2, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO: 33); и последовательность VL CDR3, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 34).

[0381] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает последовательность VH CDR1, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 252); последовательность VH CDR2, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или

более идентична аминокислотной последовательности RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 286); последовательность VH CDR3, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31), последовательность VL CDR1, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32); последовательность VL CDR2, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности GTNKRAP (SEQ ID NO: 33); и последовательность VL CDR3, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 34).

[0382] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает последовательность VH CDR1, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 252); последовательность VH CDR2, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 286); последовательность VH CDR3, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31), последовательность VL CDR1, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 304); последовательность VL CDR2, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO: 33); и последовательность VL CDR3, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 288).

[0383] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает последовательность VH CDR1, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 252); последовательность VH CDR2, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 286); последовательность VH CDR3, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31), последовательность VL CDR1, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 304); последовательность VL CDR2, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности GTNKRAP (SEQ ID NO: 33); и последовательность VL CDR3, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 288).

[0384] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен

включает последовательность VH CDR1, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность GFTFSTYAMN (SEQ ID NO: 302); последовательность VH CDR2, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 303); последовательность VH CDR3, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 287), последовательность VL CDR1, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 304); последовательность VL CDR2, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO: 33); и последовательность VL CDR3, которая включает по меньшей мере аминокислотную последовательность ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 288).

[0385] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает последовательность VH CDR1, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности GFTFSTYAMN (SEQ ID NO: 302); последовательность VH CDR2, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 303); последовательность VH CDR3, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 287), последовательность VL CDR1, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 304); последовательность VL CDR2, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности GTNKRAP (SEQ ID NO: 33); и последовательность VL CDR3, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 288).

[0386] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает CDR3, которая включает по меньшей мере аминокислоты VLWYSNRWV (SEQ ID NO:289). В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает CDR3, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотам VLWYSNRWV (SEQ ID NO:289).

[0387] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает одну или более копий антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, выбранного из группы, состоящей из Fab фрагмента, $F(ab')_2$ фрагмента, Fv фрагмента, scFv, scAb, dAb, однодоменного антитела из тяжелых цепей и однодоменного антитела из легких цепей. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающий домен включает Fv фрагмент антитела, который связывается с CD3ε (указанный в настоящей заявке как анти-CD3ε Fv фрагмент). В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε Fv фрагмент антитела представляет собой дисульфид-стабилизированный анти-CD3

связывающий Fv фрагмент (dsFv). В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающий домен является одновалентным для связывания CD3.

[0388] В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область не является одноцепочечным антителом. Например, в некоторых аспектах CD3-связывающая область не является одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv).

[0389] В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающая область представляет собой Fv фрагмент антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (Hv, также называемую VH) и вариабельную область легкой цепи (Lv, также называемую VL), такой как любой описанный фрагмент. В аспектах таких вариантов осуществления Fc-область иммуноглобулина представляет собой гетеродимерную Fc-область, содержащую два разных Fc полипептида, способных к гетеродимерной ассоциации между обоими полипептидами Fc гетеродимера, такую как любая описанная в Разделе III.C.2.b. В таких вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) CD3-связывающей области связаны на противоположных цепях гетеродимерного Fc.

[0390] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 27, 28, 35-84, 281, 338-341 и 283. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы SEQ ID NO: 27, 35-65, 340, 341 и 283, и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 28, 66-84, 281, 338 и 339.

[0391] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен представляет собой Fv фрагмент, который включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен представляет собой Fv фрагмент, который включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-84, 281, 338-341 и 283. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен представляет собой Fv фрагмент, который включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-84, 281, 338-341

и 283. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен представляет собой Fv фрагмент, который включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы SEQ ID NO: 35-65, 340, 341 и 283, и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 66-84, 281, 338 и 339. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен представляет собой Fv фрагмент, который включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-65, 340, 341 и 283, и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 66-84, 281, 338 и 339.

[0392] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен представляет собой Fv или dsFv фрагмент, который включает аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-65, 340, 341 и 283, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 66-84, 281, 338 и 339. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающий домен представляет собой Fv или dsFv, в котором содержится вариабельная область тяжелой цепи (VH), включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и вариабельная область легкой цепи (VL), включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 связывающий домен представляет собой Fv или dsFv, в котором содержится вариабельная область тяжелой цепи (VH), включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и вариабельная область легкой цепи (VL), включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 281.

[0393] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен представляет собой Fv фрагмент, который включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен представляет собой Fv фрагмент, который включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной

последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, 35-84, 281, 338-341, 283. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен представляет собой Fv фрагмент, который включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, 35-84, 281, 338-341 и 283. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε Fv фрагмент антитела включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 35-65, 340, 341 и 283, и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 66-84, 281, 338 и 339. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε Fv фрагмент антитела включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы SEQ ID NO: 27, 35-65, 340, 341 и 283, и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 66-84, 281, 338 и 339.

[0394] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε Fv фрагмент антитела включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 35-46, 48-50, 340, 341 и 283, и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 66, 68-74, 76, 78, 80, 281, 338 и 339. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε Fv фрагмент антитела включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы SEQ ID NO: 27, 35-46, 48-50, 340, 341 и 283, и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 66, 68-74, 76, 78, 80, 338 и 339.

[0395] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε Fv фрагмент антитела включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 35-46, 48-50, 340, 341 и 283, и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 66, 68-74, 76, 78,

80, 281, 338 и 339. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε Fv фрагмент антитела включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы SEQ ID NO: 27, 35-46, 48-50, 340, 341 и 283, и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 66, 68-74, 76, 78, 80, 281,338 и 339.

[0396] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:27. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности of SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность of SEQ ID NO: 28.

[0397] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 340. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 338. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 340, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 338. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 340. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 340, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338.

[0398] В конкретных вариантах осуществления Fv представляет собой дисульфид-стабилизированный Fv фрагмент (dsFv), в котором V_H-V_L гетеродимер стабилизирован межцепочечной дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления межцепочечная дисульфидная связь сконструирована посредством мутации положения в положениях каркасного участка VH и/или VL цепи. В некоторых вариантах осуществления дисульфид-стабилизированный анти-CD3 Fv включает анти-CD3 VH с мутацией 44 в Cys и анти-CD3 VL с мутацией 100 в Cys в соответствии с нумерацией Kabat. Например, в некоторых вариантах осуществления VH цепь содержит мутацию G44C, а VL цепь содержит мутацию G100C, каждая в соответствии с нумерацией Kabat. В некоторых вариантах осуществления дисульфид-стабилизированный анти-CD3 Fv включает анти-CD3 VH с мутацией в положении 105 в Cys и анти-CD3 VL с мутацией положени 43 в Cys в соответствии с нумерацией Kabat.

[0399] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε Fv фрагмент антитела включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47, 52-65, 341 или 283, и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 67, 75, 77, 79, 81-84, 281 или 339. В некоторых из таких вариантов осуществления анти-CD3 Fv представляет собой dsFv, который имеет VH цепь, содержащую мутацию G44C, и VL цепь, содержащую мутацию G100C, каждая в соответствии с нумерацией Kabat. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε Fv фрагмент антитела включает комбинацию аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID NO: 47, 52-65, 341 или 283, и аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 67,

75, 77, 79, 81-84, 281 или 339.

[0400] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 75. В некоторых из таких вариантах осуществления анти-CD3 Fv представляет собой dsFv, который имеет VH цепь, содержащую мутацию G44C, и VL цепь, содержащую мутацию G100C, каждая в соответствии с нумерацией Kabat. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

[0401] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 341. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 339. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 341, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 339. В некоторых из таких вариантах осуществления анти-CD3 Fv представляет собой dsFv, который имеет VH цепь, содержащую мутацию G44C, и VL цепь, содержащую мутацию G100C, каждая в соответствии с нумерацией Kabat. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 341. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 339. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 341, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 339.

[0402] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 283. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 339. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:339. В некоторых из таких вариантах осуществления анти-CD3 Fv представляет собой dsFv, который имеет VH цепь, содержащую мутацию G44C, и VL цепь, содержащую мутацию G100C, каждая в соответствии с нумерацией Kabat. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 283. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 339. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε связывающий домен включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 339.

c. Компоненты мультиспецифических форматов

i. CD28 VHH антигенсвязывающий домен

[0403] Мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды, описанные в настоящей заявке, включают по меньшей мере один CD28 VHH домен из любых, представленных в настоящей заявке, например любых из описанных в Разделе II. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239, 280 и 342-385. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-219, 221-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-219, 221-239, 280 и 342-385. В некоторых случаях, по меньшей мере один CD28 VHH представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:188. В некоторых случаях по меньшей мере один CD28 VHH представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:220. В некоторых случаях, по меньшей мере один CD28 VHH представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:280.

[0404] В конкретных вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид содержит по меньшей мере два CD28 домена. В конкретных вариантах осуществления мультиспецифическая CD28-связывающая полипептидная конструкция содержит по меньшей мере три или по меньшей мере четыре CD28 домена. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-239, 280 и 342-385. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-219, 221-239 и 280. В некоторых вариантах осуществления CD28 VHH домен включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:186-188, 213-219, 221-239, 280 и 342-385.

[0405] В некоторых случаях по меньшей мере один CD28 VHH домен находится в карбокси-концевом положении относительно по меньшей мере одного TAA-связывающего домена. В некоторых случаях по меньшей мере один CD28 VHH домен находится в карбокси-концевом положении относительно по меньшей мере двух TAA-связывающих доменов. В некоторых случаях по меньшей мере два CD28 VHH домена находятся в карбокси-концевом положении относительно по меньшей мере одного TAA-связывающего домена. В некоторых случаях по меньшей мере два CD28 VHH домена находятся в карбокси-концевом положении относительно по меньшей мере двух TAA-связывающих доменов.

[0406] В некоторых случаях по меньшей мере один CD28 VHH домен находится в амино-концевом положении относительно Fc-области. В некоторых случаях по меньшей мере один CD28 VHH домен находится в амино-концевом положении относительно Fc-области гомодимерного Fc. В некоторых случаях по меньшей мере один CD28 VHH домен находятся в амино-концевом положении относительно Fc-области гетеродимерного Fc. В некоторых случаях по меньшей мере два CD28 VHH домена находятся в амино-концевом положении относительно Fc-области. В некоторых случаях по меньшей мере два CD28 VHH домена находятся в амино-концевом положении относительно Fc-области гомодимерного Fc. В некоторых случаях по меньшей мере два CD28 VHH домена находятся в амино-концевом положении относительно Fc-области гетеродимерного Fc.

[0407] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один CD28 VHH находится в карбокси-концевом положении относительно TAA-связывающего домена и в амино-концевом положении относительно Fc-области. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два CD28 VHH находятся в карбокси-концевом положении относительно TAA-связывающего домена и в амино-концевом положении относительно Fc-области.

[0408] В аспектах мультиспецифической CD28-связывающей полипептидной конструкции, содержащей по меньшей мере два или содержащей два CD28 VHH домена, каждый из CD28 VHH доменов может связываться с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом на CD28.

[0409] В аспектах полипептидной конструкции, содержащей по меньшей мере два или содержащей два CD28 VHH домена, каждый из CD28 VHH доменов может связываться с разным или неперекрывающимся эпитопом на CD28.

[0410] В некоторых случаях первый sdAb VHH домен включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, или ее гуманизированный вариант, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO:188 и связывается с CD28; и второй sdAbVHH домен включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, или ее гуманизированный вариант, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO:188 и связывается с CD28.

[0411] В некоторых случаях первый sdAb VHH домен включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, или ее гуманизированный вариант, представленный в любой из SEQ ID NO:213-239 и 280; и второй sdAbVHH домен включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, или ее гуманизированный вариант, представленный в любой из SEQ ID NO:213-239 и 280. В некоторых случаях первый sdAb VHH домен включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, или ее гуманизированный

вариант, представленный в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385; и второй sdAbVHH домен включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, или ее гуманизированный вариант, представленный в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385. В некоторых случаях первый sdAb VHH домен включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, или ее гуманизированный вариант, представленный в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280; и второй sdAbVHH домен включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, или ее гуманизированный вариант, представленный в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280. В некоторых случаях первый sdAb VHH домен включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, или ее гуманизированный вариант, представленный в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385; и второй sdAbVHH домен включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, или ее гуманизированный вариант, представленный в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385.

[0412] В некоторых вариантах осуществления первый sdAbVHH домен и второй sdAbVHH домен включают аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 188 и SEQ ID NO: 188, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый sdAbVHH домен и второй sdAbVHH домен включают аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 220 и SEQ ID NO: 220, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый sdAbVHH домен и второй sdAbVHH домен включают аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 280 и SEQ ID NO: 280, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый sdAbVHH домен и второй sdAbVHH домен включают аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 188 и SEQ ID NO: 220. В некоторых вариантах осуществления первый sdAbVHH домен и второй sdAbVHH домен включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 188 и SEQ ID NO: 220, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый sdAbVHH домен и второй sdAbVHH домен включают аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 188 и SEQ ID NO: 280. В некоторых вариантах осуществления первый sdAbVHH домен и второй sdAbVHH домен включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 188 и SEQ ID NO: 280, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый sdAbVHH домен и второй sdAbVHH домен включают аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 220 и SEQ ID NO: 280. В некоторых вариантах осуществления первый sdAbVHH домен и второй sdAbVHH домен включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 220 и SEQ ID NO: 280, соответственно.

ii. Связывающий домен (например, TAA-связывающий домен)

[0413] Мультиспецифические CD28-связывающие полипептиды по настоящему изобретению включают один или более дополнительных связывающих доменов (BD), которые связываются с антигеном, который не является CD28.

[0414] В некоторых вариантах осуществления один или более BD представляют собой один BD. В некоторых вариантах осуществления один или более BD представляют собой два, три, четыре или более BD. В некоторых вариантах осуществления один или более BD представляют собой два BD. В некоторых вариантах осуществления один или более BD представляют собой три BD. В некоторых вариантах осуществления один или более BD представляют собой четыре BD.

[0415] В некоторых аспектах один или более BD связываются с маркером активации Т-клеток. В некоторых аспектах один или более BD связываются с маркером истощения Т-клеток. В некоторых аспектах один или более BD связываются с маркером микроокружения опухоли.

[0416] В некоторых вариантах осуществления маркер активации Т-клеток выбран из CD25, CD44, CD69, CD71, CD107a, CD137, HLA-DR и/или KLRG1. В некоторых вариантах осуществления маркер истощения Т-клеток выбран из 2B4, CD160, LAG3, PD-1 и/или TIGIT. В некоторых вариантах осуществления маркер микроокружения опухоли выбран из альфа-SMA, EDB, FAP, FSP-1, PDGFRальфа и/или PDGFRбета.

[0417] в некоторых аспектах один или более дополнительных связывающих доменов представляют собой связывающий домен, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA), таким как один или более, два или более, три или более, или четыре или более TAA-связывающих домена. В некоторых аспектах один или более антигенсвязывающих доменов, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, выбран из антитела или антигенсвязывающего фрагмента, природного (или нативного) соответствующего партнера по связыванию, Антикалина (сконструированного липокалина), Дарпина, Финомера, Центирина (сконструированного домена фибронетицина III), цистинового узлового домена, Аффилина, Аффитела или сконструированного CH3 домена. В некоторых вариантах осуществления природный соответствующий партнер по связыванию включает внеклеточный домен, или его связывающий фрагмент, нативного соответствующего партнера по связыванию TAA, или его вариант, который демонстрирует активность связывания с TAA.

[0418] В некоторых вариантах осуществления один или более антигенсвязывающих доменов, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из Fab фрагмента, $F(ab')_2$ фрагмента, Fv фрагмента, scFv, scAb, dAb, однодоменного антитела из тяжелых цепей и однодоменного антитела из легких цепей. В некоторых вариантах осуществления один или более антигенсвязывающих доменов, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, представляют собой одноцепочечные антитело. В некоторых примерах одноцепочечный представляет собой scFv, scAb, однодоменное антитело из тяжелых цепей или однодоменное антитело из легких цепей.

[0419] В некоторых вариантах осуществления один или более антигенсвязывающих доменов, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, представляют собой одноцепочечное антитело. В некоторых примерах одноцепочечный представляет собой scFv, scAb, однодоменное антитело из тяжелых цепей или однодоменное антитело из легких цепей.

[0420] В некоторых вариантах осуществления один или более антигенсвязывающих доменов, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, включают фрагменты однодоменного антитела (sdAb), например V_HH, V_{NAR}, сконструированные V_H или V_K домены. V_HH могут быть получены из природных верблюжьих антител только с тяжелыми цепями, от генетически модифицированных грызунов, которые продуцируют антитела только с тяжелыми цепями, или наивных/синтетических библиотек верблюжьих или гуманизированных верблюжьих однодоменных антител. V_{NAR} могут быть получены из антител, состоящих только из тяжелых цепей, хрящевых рыб. Использовали различные способы для получения мономерных sdAb из традиционно гетеродимерных V_H и V_K доменов, включая конструирование интерфейсов и выбор конкретных семейств зародышевой линии.

[0421] В некоторых вариантах осуществления один или более BD, или независимо каждый из BD, содержит sdAb, которое связывается с антигеном, отличным от CD28. В некоторых вариантах осуществления один или более BD находятся в амино-концевом положении относительно CD28 VHH. В некоторых вариантах осуществления один или более BD находятся в амино-концевом положении относительно Fc-области. В некоторых вариантах осуществления один или более BD находятся в амино-концевом положении относительно CD28 VHH и Fc-области. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая полипептидная конструкция содержит только один BD, который может находиться в амино-концевом положении относительно CD28 VHH или в карбокси-концевом положении относительно CD28 VHH. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид содержит два BD, находящихся в амино-концевом положении относительно CD28 VHH и/или в карбокси-концевом положении относительно CD28 VHH. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая CD28-связывающая полипептидная конструкция содержит три BD, два из которых находятся в амино-концевом положении относительно CD28 VHH, а третий расположен на другом конце мультиспецифической CD28-связывающей полипептидной конструкции.

[0422] В некоторых вариантах осуществления один или более антигенсвязывающих доменов, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, мультиспецифических CD28-связывающих полипептидов содержат sdAb, которое связывается с TAA. В некоторых вариантах осуществления один или более scFv или sdAb, которые связываются с TAA, находятся в амино-концевом положении относительно CD28 VHH. В некоторых вариантах осуществления одно или более sdAb, которые связываются с TAA, находятся в амино-концевом положении относительно Fc-области. В некоторых

вариантах осуществления одно или более sdAb, которые связываются с TAA, находятся в амино-концевом положении относительно CD28 VHH и Fc-области. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая полипептидная конструкция содержит только одно sdAb, которое связывается с TAA, которое может находиться в амино-концевом положении относительно CD28 VHH или в карбокси-концевом положении относительно CD28 VHH. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид содержит два sdAb, которые связываются с TAA, находящиеся в амино-концевом положении относительно CD28 VHH и/или в карбокси-концевом положении относительно CD28 VHH. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая CD28-связывающая полипептидная конструкция содержит три sdAb, два из которых находятся в амино-концевом положении относительно CD28 VHH, а третий расположен на другом конце мультиспецифической CD28-связывающей полипептидной конструкции.

[0423] В некоторых вариантах осуществления один или более антигенсвязывающих доменов, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, содержат связывающие домены в виде однодоменных антител (sdAb).

[0424] В некоторых вариантах осуществления один или более антигенсвязывающих доменов, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, содержат более чем одну цепь. В некоторых вариантах осуществления один или более антигенсвязывающих доменов, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, содержат последовательности VH и VL, объединенные в виде FABs.

[0425] В некоторых вариантах осуществления один или более BD, или независимо каждый из BD, представляет собой или включает внеклеточный домен или его связывающий фрагмент природного (или нативного) соответствующего партнера по связыванию антигена, или его вариант, который демонстрирует активность связывания с антигеном.

[0426] В некоторых вариантах осуществления один или более антигенсвязывающих доменов, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, представляют собой или включают внеклеточный домен или его связывающий фрагмент природного (или нативного) соответствующего партнера по связыванию TAA, или его вариант, который демонстрирует активность связывания с TAA.

[0427] В некоторых вариантах осуществления один или более BD, или независимо каждый из BD, связываются с одним и тем же антигеном. В некоторых вариантах осуществления присутствует более чем один BD, который связывается с антигеном, и каждый из BD связывается с разным антигеном. В некоторых вариантах осуществления каждый из BD связывается с одним и тем же антигеном. В некоторых вариантах осуществления каждый из BD связывается с разным антигеном. В некоторых вариантах осуществления каждый из BD связывается с разным эпитопом на одном и том же антигене. В некоторых вариантах осуществления каждый из BD связывается с одним и тем же эпитоп на одном и том же антигене.

[0428] В некоторых вариантах осуществления один или более антигенсвязывающих доменов, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, связываются с одним и тем же антигеном. В некоторых вариантах осуществления присутствует более чем один антигенсвязывающий домен, который связывается с TAA, и каждый из антигенсвязывающих доменов связываются с разным антигеном. В некоторых вариантах осуществления каждый из антигенсвязывающих доменов связывается с одним и тем же опухоль-ассоциированным антигеном (TAA). В некоторых вариантах осуществления каждый из антигенсвязывающих доменов связывается с разным TAA. В некоторых вариантах осуществления каждый из антигенсвязывающих доменов связывается с разным эпитопом на одном и том же TAA. В некоторых вариантах осуществления каждый из антигенсвязывающих доменов связывается с одним и тем же эпитопом на одном и том же TAA.

[0429] В некоторых вариантах осуществления один или более BD, или независимо каждый из BD, которые связываются с антигеном, приводят к одновалентному, двухвалентному, трехвалентному или четырехвалентному связыванию с антигеном. В некоторых вариантах осуществления двухвалентное связывание с антигеном включает два BD, которые связываются с одним и тем же эпитопом одного и того же антигена (например, моно-эпитопные). В некоторых вариантах осуществления двухвалентном связывание с антигеном включает два BD, которые связываются с разными эпитопами одного и того же антигена (например, биэпитопные). В некоторых вариантах осуществления одновалентное связывание с антигеном включает один BD, который связывается с одним эпитопом антигена (например, моно-эпитопный).

[0430] В некоторых вариантах осуществления один или более антигенсвязывающих доменов, или независимо каждый из антигенсвязывающих доменов, которые связываются с TAA, приводят к одновалентному, двухвалентному, трехвалентному или четырехвалентному связыванию с TAA. В некоторых вариантах осуществления двухвалентное связывание с TAA включает два антигенсвязывающих домена, которые связываются с одним и тем же эпитопом одного и того же антигена (например, моно-эпитопные). В некоторых вариантах осуществления двухвалентное связывание с TAA включает два антигенсвязывающих домена, которые связываются с разными эпитопами одного и того же антигена (например, биэпитопные). В некоторых вариантах осуществления одновалентное связывание с TAA включает один антигенсвязывающий домен, который связывается с одним эпитопом антигена (например, моноэпитопный).

[0431] В некоторых вариантах осуществления антиген, с которым связываются один или более BD, выбран из группы, состоящей из: 1-92-LFA-3, 2B4, 5T4, интегрина альфа-4, интегрина альфа-V, интегрина альфа4бета1, интегрина альфа4бета7, альфа-SMA, AGR2, анти-Lewis-Y, рецептора апелина J, APRIL, B7-H3, B7-H4, BAFF, BTLA, комплемента C5, C-242, CA9, CA19-9, (Lewis a), карбоангидразы 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L,

CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD69, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD107a, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD137, CD138, CD160, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), КЛАУДИН-3, КЛАУДИН-4, cMet, коллагена, Cripto, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, рецептора эндотелина B (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, F белка RSV, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT-3, рецептора фолата альфа (FRальфа), FSP-1, GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, рецепторов GP IIb/IIIa, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HLA-DR, HVEM, гиалуронидазы, ICOS, IFNальфа, IFNбета, IFNгамма, IgE, рецептора IgE (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12Rбета1, IL13, IL13R, IL13Ra2, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, рецептора акцессорного белка IL1 (IL1RAP), инсулинового рецептора, Jagged лигандов, Jagged 1, Jagged 2, KISS1-R, KLRG1, LAG-3, LIF-R, Lewis X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, мезотелина, MRP4, MUC1, муцина-16 (MUC16, CA-125), Na/K АТФазы, NGF, никастрина, рецепторов Notch, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFRальфа, PDGFRбета, PD-1, PD-L1, PD-L2, фосфатидил-серина, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, Siglec15, сфингозин 1 фосфата, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGFбета, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNFальфа, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, трансферрина, рецептора трансферрина, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2 и WISP-3.

[0432] В некоторых вариантах осуществления TAA выбран из группы, состоящей из 1-92-LFA-3, 5T4, интегрина альфа-4, интегрина альфа-V, интегрина альфа4бета1, интегрина альфа4бета7, AGR2, анти-Lewis-Y, рецептора апелина J, APRIL, B7-H3, B7-H4, BAFF, BTLA, комплемента C5, C-242, CA9, CA19-9, (Lewis a), карбоангидразы 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD137, CD138, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), КЛАУДИН-3, КЛАУДИН-4, cMet, коллагена, Cripto, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, рецептора эндотелина B (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, F белка RSV, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT-3, рецептора фолата альфа (FRα), GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, рецепторов GP IIb/IIIa, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HVEM, гиалуронидазы, ICOS, IFNальфа, IFNбета, IFNгамма, IgE, рецептора IgE (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40,

IL-12R, IL-12Rбета1, IL13, IL13R, IL13Ra2, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, рецептора акцессорного белка IL1 (IL1RAP), инсулинового рецептора, Jagged лигандов, Jagged 1, Jagged 2, KISS1-R, LAG-3, LIF-R, Lewis X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, мезотелина, MRP4, MUC1, муцина-16 (MUC16, CA-125), Na/K АТФазы, NGF, никастрина, рецепторов Notch, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFRальфа, PDGFRбета, PD-1, PD-L1, PD-L2, фосфатидил-серина, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, Siglec15, сфингозин 1 фосфата, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGFбета, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNFальфа, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, трансферрина, рецептора трансферрина, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2 и WISP-3.

[0433] В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой PDL1. В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой Siglec15. В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой B7H3. В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой B7H4. В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой IL1RaP. В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой IL13Ra2. В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой gpNMB. В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой мезотелин. В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой EGFR. В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой cMET. В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой HER2. В некоторых вариантах осуществления TAA представляет собой ENPP3.

[0434] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA) рецептором фолата альфа (FRα). Например, антигенсвязывающий домен содержит связывающий домен в виде sdAb, который связывается с FRα. Иллюстративные FRα-связывающие sdAb представлены в любой из SEQ ID NO: 253, 254 и 255. Антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, в представленной мультиспецифической полипептидной конструкции может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из вышеуказанных SEQ ID NO и связывать FRα.

[0435] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA) 5T4. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой sdAb, например VHH. Иллюстративные 5T4-связывающие sdAb представлены в любой из SEQ ID NO:240 или 245. В некоторых вариантах осуществления VHH содержит CDR1, CDR2 и CDR3,

представленные в SEQ ID NO: 241, 242 и 243, соответственно. В некоторых вариантах осуществления 5T4-связывающий sdAb представлен в SEQ ID NO:240. В некоторых вариантах осуществления VHH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 246, 247 и 248, соответственно. В некоторых вариантах осуществления 5T4-связывающий sdAb представлен в SEQ ID NO:245. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит Fab фрагмент антитела, включающий Fd и LC, который связывается с 5T4. Иллюстративный 5T4 Fd представлен в SEQ ID NO: 256, а иллюстративная 5T4 LC представлена в SEQ ID NO: 257. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен антитела включает VH-CH1 (Fd) или VL-CL, представленные в SEQ ID NO: 258 и 259 (патент США № US 8044178). Антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, в представленной мультиспецифической полипептидной конструкции может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из вышеуказанных SEQ ID NO и связывать 5T4.

[0436] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA) PDL1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой sdAb, например VHH. Иллюстративное PDL1-связывающее sdAb представлено в SEQ ID NO:99. В некоторых вариантах осуществления VHH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 100, 101 и 102, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит Fab фрагмент антитела, включающий Fd и LC, который связывается с PDL1. Антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, в представленной мультиспецифической полипептидной конструкции может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из вышеуказанных SEQ ID NO и связывать PDL1.

[0437] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA) cMET. Например, антигенсвязывающий домен содержит связывающий домен в виде sdAb, которое связывается с cMET. Иллюстративный cMET-связывающий sdAb представлен в SEQ ID NO: 260 (патент США № 9346884). Антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, в представленной мультиспецифической полипептидной конструкции может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из вышеуказанных SEQ ID NO и связывать cMET.

[0438] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен,

связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA) B7H3. Например, антигенсвязывающий домен содержит связывающий домен в виде scFv, который связывается с B7H3. Иллюстративный B7H3-связывающий scFv представлен в SEQ ID NO:261. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой sdAb, например VHH. Иллюстративные B7H3-связывающие sdAb представлены в любой из SEQ ID NO: 262-266. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит Fab фрагмент антитела, включающий VH-CH1 (Fd) и LC. Иллюстративный B7H3 Fd представлен в SEQ ID NO: 267, а иллюстративная B7H3 LC представлена в SEQ ID NO: 268 (публикация PCT № WO2017/030926). Антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, в представленной мультиспецифической полипептидной конструкции может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из вышеуказанных SEQ ID NO и связывать B7H3.

[0439] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA) CD20. В некоторых вариантах осуществления такой антигенсвязывающий домен содержит VH, представленный в SEQ ID NO: 269, и VL, представленный в SEQ ID NO: 270, или последовательность, которая демонстрирует идентичность последовательности на уровне или около по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 269 и SEQ ID NO:270. Например, антигенсвязывающий домен содержит связывающий домен в виде scFv, который связывается с CD20. Иллюстративные CD20-связывающие scFv представлены в SEQ ID NO: 271 (публикация США № US 2005/0123546). Антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, в представленной мультиспецифической полипептидной конструкции может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из вышеуказанных SEQ ID NO и связывать CD20.

[0440] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA) DLL3. Например, антигенсвязывающий домен содержит связывающий домен в виде scFv, который связывается с DLL3. Иллюстративный DLL3-связывающий scFv представлен в SEQ ID NO: 272 и 273 (публикация США № US 2017/0037130). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой sdAb, например VHH. Иллюстративные DLL3-связывающие sdAb представлены в любой из SEQ ID NO: 274 или SEQ ID NO:275. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит Fab фрагмент антитела, включающий Fd и LC, который связывается с DLL3. Иллюстративный DLL3 Fd представлен в SEQ ID NO: 276, а

иллюстративная DLL3 LC представлена в SEQ ID NO: 277 (патент США № US 8044178). Антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, в представленной мультиспецифической полипептидной конструкции может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из вышеуказанных SEQ ID NO и связывать DLL3.

[0441] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA) gpNMB. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит Fab фрагмент, включающий Fd и LC цепь. Иллюстративный gpNMB Fd представлен в SEQ ID NO: 278, а иллюстративная gpNMB LC представлена в SEQ ID NO: 279. Антигенсвязывающий домен, или независимо каждый антигенсвязывающий домен, в представленной мультиспецифической полипептидной конструкции может иметь идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из вышеуказанных SEQ ID NO и связывать gpNMB.

[0442] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связан, непосредственно или опосредованно через линкер, с CD28 VHH областью и/или с Fc пептидом. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связан, непосредственно или опосредованно через линкер, с CD28 VHH областью. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связан, непосредственно или опосредованно, с Fc пептидом. В некоторых вариантах осуществления связывание осуществляется через линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой связывающий пептид (LP), который может включать любой гибкий или жесткий линкер, описанный в Разделе IIIC(d), хотя, как правило, пептиды, связывающие антигенсвязывающий домен или домены, не являются расщепляемым линкером.

[0443] В некоторых вариантах осуществления связывающий пептид представляет собой пептид длиной примерно от 1 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления связывающий пептид представляет собой пептид, который представляет собой или включает любой Gly-Ser линкер, представленный в любой из SEQ ID NO: 1-7, 89, 90, 123-129, 142, 244 и 249.

iii. Fc-область

[0444] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид, представленный в настоящей заявке, включает Fc-область иммуноглобулина. Fc полипептид может представлять собой любой, представленный в Разделе IIIA. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой гомодимерную Fc-область. В конкретных вариантах осуществления Fc-область образована Fc доменами, которые являются мутантными или модифицированными для промотирования гетеродимеризации, при которой различные полипептиды могут быть димеризованы с

образованием гетеродимера. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления димер представляет собой гетеродимер, в котором две полипептидные цепи мультиспецифической полипептидной конструкции являются разными.

[0445] Известны различные способы для промотирования гетеродимеризациим комплементарных Fc полипептидов, см., например, Ridgway et al, Protein Eng. 9:617-621 (1996); Merchant et al, Nat. Biotechnol. 16(7): 677-81 (1998); Moore et al. (2011) MAbs, 3:546-57; Von Kreudenstein et al. MAbs, (2013) 5:646-54; Gunasekaran et al. (2010) J. Biol. Chem., 285:19637-46; Leaver-Fay et al. (2016) Structure, 24:641-51; Ha et al. (2016) Frontiers in Immunology, 7:1; Davis et al. (2010) Protein Eng Des Sel, 23:195-202; опубликованные международные заявки PCT №№ WO 1998/050431, WO 2009/089004, WO2011143545 WO 2014/067011, WO 2012/058768, WO2018027025; опубликованные патентные заявки США №№ US20140363426, US20150307628, US20180016354, US20150239991; и патентные заявки США №№ US5731168, US7183076, US9701759, US9605084 и US9650446. Способы для промотирования гетеродимеризации Fc цепей включают мутагенез Fc-области, например путем включения ряда мутаций “выступ во впадину” или включения мутаций для осуществления электростатической координации Fc для обеспечения притягивающих взаимодействий между различными полипептидными цепями. Например, в некоторых вариантах осуществления Fc полипептиды гетеродимера включают мутацию для изменения полярности заряда на границе раздела Fc димера, так что коэкспрессия электростатически согласованных цепей Fc поддерживает благоприятные притягивающие взаимодействия, тем самым способствуя образованию желаемого гетеродимера Fc, тогда как неблагоприятные взаимодействия отталкивающих зарядов подавляют нежелательное образование гомодимера Fc (Guneskaran et al. (2010) JBC, 285: 19637-19646). При совместной экспрессии в клетке возможна ассоциация между цепями, но самоассоциация цепей по существу не происходит из-за отталкивания заряда. Другие стратегии создания гетеродимерного Fc включают смешивание сегментов человеческого IgG и IgA CH3 домена для создания комплементарного гетеродимера CH3, который называется SEED Fc.

[0446] Способы и варианты гетеродимеризации также включают описанные в опубликованной международной заявке PCT WO 2014/145806, включая мутации «выступы и впадины» (также называемые «асимметричными» вариантами), мутации, связанные с «электростатическим взаимодействием» или «парами заряда», и варианты pI. Гетеродимерные варианты также включают любые варианты, описанные в опубликованных заявках США №№ US2012/0149876 или US2018/011883.

[0447] В некоторых вариантах осуществления для промотирования гетеродимеризации оба полипептида гетеродимера Fc содержат спаренные или комплементарные аминокислотные модификации. Иллюстративные спаренные аминокислотные модификации полипептидов Fc слияния представлены в **Таблице 3**.

Таблица 3

Спаренные аминокислоты гетеродимерного Fc

Первый Fc полипептид	**Второй Fc полипептид**
T366W	T366S/L368W/Y407V
T366W/S354C	T366S/L368A/Y407V/Y349C
S364H/F405A	Y349T/Y349F
T350V/L351Y/F405A/Y407V	T350V/T366L/K392L/T394W
K360D/D399M/Y407A	E345R/Q347R/T366V/K409V
K409D/K392D	D399K/E356K
K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
L360E/K409W/Y349C	Q347R/399V/F405T/S354C
K370E/K409W	E357N/D399V/F405T

[0448] В некоторых вариантах осуществления модификации включают введение выступающей части (выступа) в первый Fc полипептид и полости (впадины) во второй Fc полипептид таким образом, чтобы выступ мог располагаться во впадине для промотирования связывания в комплекс первого и второго Fc-содержащих полипептидов. Аминокислоты, являющиеся целью для замены и/или модификации для создания выступов или впадин в полипептиде, типично являются граничными аминокислотами, которые взаимодействуют или контактируют с одной или более аминокислотами на границе раздела второго полипептида.

[0449] В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид, модифицированный таким образом, чтобы он содержал выступающие (выступ) аминокислоты, включает замену нативной или исходной аминокислоты на аминокислоту, которая имеет по меньшей мере одну боковую цепь, выступающую от границы раздела первого Fc полипептида и, следовательно, может располагаться в компенсаторной полости (впадина) на смежной границе раздела второго полипептида. Чаще всего замещающая аминокислота представляет собой аминокислоту с бóльшим объемом боковой цепи, чем у исходного аминокислотного остатка. Специалист в данной области знает, как определить и/или оценить свойства аминокислотных остатков, чтобы идентифицировать те, которые являются идеальными замещающими аминокислотами для создания выступа. В некоторых вариантах осуществления замещающие остатки для образования выступа представляют собой встречающиеся в природе аминокислотные остатки и включают, например, аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y) или триптофан (W). В некоторых примерах исходный остаток, идентифицированный для замены, представляет собой аминокислотный остаток с небольшой боковой цепью, такой как, например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, глицин, серин, треонин или валин.

[0450] В некоторых вариантах осуществления второй Fc полипептид, модифицированный так, чтобы он содержал полость (впадину), включает замену нативной или исходной аминокислоты на аминокислоту, которая имеет по меньшей мере одну боковую цепь, отодвинутую от границы раздела второго полипептида и, таким образом,

может приспособиться к соответствующему выступу на границе раздела первого полипептида. Чаще всего замещающая аминокислота имеет меньший объем боковой цепи, чем исходный аминокислотный остаток. Специалист в данной области знает, как определить и/или оценить свойства аминокислотных остатков, чтобы идентифицировать те из них, которые являются идеальными замещающими остатками для образования впадины. Как правило, замещающие остатки для образования впадины представляют собой встречающиеся в природе аминокислоты и включают, например, аланин (A), серин (S), треонин (T) и валин (V). В некоторых примерах исходная аминокислота, идентифицированная для замены, представляет собой аминокислоту с большой боковой цепью, такую как, например, тирозин, аргинин, фенилаланин или триптофан.

[0451] Граница раздела CH3 человеческого IgG1, например, включает шестнадцать остатков в каждом домене, расположенных на четырех антипараллельных β-цепях, которые скрывают 1090 Å2 от каждой поверхности (см., например, Deisenhofer et al. (1981) Biochemistry, 20: 2361-2370; Miller et al., (1990) J Mol. Biol., 216, 965-973; Ridgway et al., (1996) Prot. Engin., 9: 617-621; патент США № 5731168). Модификации CH3 домена для создания выпуклостей или впадин описаны, например, в патенте США № 5731168; международных патентных заявках WO 98/50431 и WO 2005/063816; и Ridgway et al., (1996) Prot. Engin., 9: 617-621. В некоторых примерах модификации CH3 домена для создания выступов или впадин обычно нацелены на остатки, расположенные на двух центральных антипараллельных β-цепях. Цель состоит в том, чтобы свести к минимуму риск того, что образовавшиеся выступы могут быть размещены как выступающие в окружающий растворитель вместо того, чтобы размещаться в компенсационной впадине в CH3 домене-партнере.

[0452] Например, в некоторых вариантах осуществления гетеродимерный Fc включает полипептид, имеющий аминокислотную модификацию в CH3 домене по Thr366, который при замене более объемной аминокислотой, например Try (T366W), способен предпочтительно связываться с вторым CH3 доменом, имеющим аминокислотные модификации до менее объемных аминокислот в положениях Thr366, Leu368 и Tyr407, например Ser, Ala и Val, соответственно (T366S/L368A/Y407V). Гетеродимеризацию посредством модификаций CH3 можно дополнительно стабилизировать путем введения дисульфидной связи, например путем замены Ser354 на Cys (S354C) и Tyr349 на Cys (Y349C) на противоположных CH3 доменах (с. обзор в Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7-15).

[0453] В конкретных вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид содержит первый Fc и второй Fc, способные опосредовать гетеродимеризацию Fc, содержащего первый Fc полипептид, содержащий мутации T366W и S354C, и второй Fc полипептид, содержащий мутации T366S, L368A, Y407V и Y349C. В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид выбран из Fc полипептида, включающего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 328 или 334, и второй Fc полипептид выбран из Fc полипептида, включающего последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 329, 332 или 336. В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:103, 107, 115 или 117, а второй Fc полипептид представляет собой или включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:104, 108, 111, 113, 119 или 121.

[0454] В некоторых вариантах осуществления Fc полипептид демонстрирует характеристики, обеспечивающие Fc-опосредованные эффекторные функции. В конкретных примерах первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:328, а второй Fc полипептид представляет собой или включает SEQ ID NO: 329 или 332. В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 103, а второй Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 104 или 111. В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, а второй Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 108 или 113. Первый и второй Fc полипептид может быть сформатирован на любой полипептидной цепи конструкции.

[0455] В некоторых вариантах осуществления один из первого и второго Fc полипептидов или оба могут дополнительно включать одну или более аминокислотных мутаций для дальнейшего уменьшения одной или более эффекторных функций Fc, таких как пониженное связывание с Fc-рецептором. Иллюстративные мутации для уменьшения эффекторных функций Fc включают любые из описанных. В некоторых вариантах осуществления модификация может представлять собой делецию одного или более положений Glu233 (E233), Leu234 (L234) или Leu235 (L235), такую как делеция аминокислот Glu233 (E233), Leu234 (L234) и Leu235 (L235). В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид выбран из Fc полипептида, включающего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 328 или 334, а второй Fc полипептид выбран из Fc полипептида, включающего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 329, 332 или 336. В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:105, 109, 116 или 118, а второй Fc полипептид представляет собой или включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 106, 110, 112, 114, 120 или 122.

[0456] В конкретных примерах первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:330, а второй Fc полипептид представляет собой или включает SEQ ID NO: 331 или 333. В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105, а второй Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106

или 112. В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 109, а второй Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 110 или 114. Первый и второй Fc полипептид могут быть сформатированы на любой полипептидной цепи конструкции.

[0457] В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид или второй Fc полипептид дополнительно включает мутации M252Y и/или M428V. В конкретных примерах первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:334, а второй Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:336. В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:115, а второй Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:117, а второй Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 121. В других примерах первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:335, а второй Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:337. В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:116, а второй Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 120. В некоторых вариантах осуществления первый Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:118, а второй Fc полипептид представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 122. Первый и второй Fc полипептид может быть сформатирован на любой полипептидной цепи конструкции.

[0458] Дополнительные примеры вариантов, которые могут способствовать развитию гетеродимеров, включают любую комбинацию или пару стерических вариантов (например, асимметричных вариантов) первого Fc полипептида и второго Fc полипептида из: S364K/E357Q и L368D/K370S; L368D/K370S и S364K; L368E/K370S и S364K; T411T/E360E/Q362E и D401K; L368D/K370S и S364K/E357L, K370S и S364K/E357Q и T366S/L368A/Y407V и T366W или 366S/L368A/Y407V/Y349C и T366W/S354C), где каждая пара представляет собой мутации в первом Fc полипептиде и втором Fc полипептиде. В конкретных вариантах осуществления представленная конструкция содержит первый и второй Fc полипептид, содержащие пару мутаций L368D/K370S и S364K и E357Q.

[0459] Дополнительный механизм, который можно использовать для получения гетеродимеров, иногда называют “электростатическим взаимодействием”, как описано в Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285(25):19637 (2010). Это иногда называют «парами

заряда». В этом варианте осуществления электростатика используется для направления форматирования в сторону гетеродимеризации. Как понятно специалистам в данной области техники, они также могут влиять на pI и, следовательно, на очистку, и, таким образом, в некоторых случаях также могут рассматриваться как варианты pI. Однако, поскольку они были образованы для форсирования гетеродимеризации и не использовались в качестве средств очистки, они классифицируются как «стерические варианты». В одном варианте осуществления первый Fc полипептид может содержать мутации D221E/P228E/L368E, а второй Fc полипептид может содержать мутации D221R/P228R/K409R. В других вариантах осуществления первый Fc полипептид может содержать мутации C220E/P228E/368E, а второй Fc полипептид может содержать мутации C220R/E224R/P228R/K409R.

[0460] В некоторых вариантах осуществления гетеродимеризации могут способствовать варианты pI. В некоторых аспектах вариант pI может включать те, которые повышают pI белка (основные изменения). В других аспектах вариант pI может включать те, которые снижают pI белка (кислотные изменения). В некоторых случаях могут быть получены все комбинации этих вариантов, включая комбинации, в которых один Fc полипептид может быть дикого типа или вариантом, который не демонстрирует значительного отличия pI от дикого типа, а другой Fc полипептид может быть либо более основный, либо более кислотный. Альтернативно, каждый Fc полипептид может быть изменен, один на более основный и один на более кислотный. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один Fc полипептид представляет собой отрицательный pI вариант Fc, содержащий мутации Q295E/N384D/Q418E/N421D.

[0461] В некоторых вариантах осуществления можно использовать комбинацию стерических вариантов гетеродимеризации (например, выступа и впадины) и варианты pI или пары заряда.

[0462] В конкретных вариантах осуществления представленные конструкции содержат (a) первый Fc полипептид, включающий асимметричные варианты S364K/E357Q; и b) второй Fc полипептид, содержащий асимметричные варианты L368D/K370S и pI варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D. В некоторых вариантах осуществления один из первого и второго полипептида или оба могут содержать дополнительные мутации для уменьшения эффекторной активности Fc, такие как иллюстративные мутации E233P/L234V/L235A/G236del/S267K. Примеры такого первого Fc полипептида и второго Fc полипептида, способных опосредовать Fc гетеродимеризацию, включают последовательности, представленные в SEQ ID NO:284 и 285. Первый и второй Fc полипептид могут быть сформатированы на любой полипептидной цепи конструкции.

[0463] Полученные обусловленные мультиспецифические полипептидные конструкции могут быть очищены любым подходящим методом, таким как, например, аффинная хроматография на колонках с белком A или белком G. Когда две молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие разные полипептиды, трансформируются в клетки,

происходит образование гомо- и гетеродимеров. Условия экспрессии можно регулировать таким образом, чтобы образование гетеродимера было более предпочтительным, чем образование гомодимера.

[0464] Известны способы выделения гетеродимеров из гомодимеров, основанные на дифференциальном сродстве гетеродимеров к аффинному реагенту. В некоторых аспектах такие способы включают конструирование гетеродимера таким образом, чтобы одна из Fc полипептидных цепей не связывалась с белком A, являющимся аффинным реагентом. В некоторых случаях одна из полипептидных цепей может содержать одну или более аминокислотных замен для отмены или снижения аффинности в отношении реагента-белка A в одном из полипептидов Fc гетеродимера см., например, WO2017134440, WO2010151792, Jendeberg et al. (Jendeberg et al., (1997) J. Immunol. Methods, 201(1): 25-34. В некоторых из этих вариантов осуществления Fc-область может быть модифицирована в сайте связывания белка A на одном члене гетеродимера таким образом, чтобы предотвратить связывание белка A и тем самым обеспечить более эффективную очистку гетеродимерного слитого белка. Примером модификации в этом сайте связывания является Ile253, например Ile253Arg (I253R). В некоторых вариантах осуществления модификация может представлять собой H435R или H435R/Y436F. В некоторых вариантах осуществления Fc полипептид Fc гетеродимера может содержать модификацию, так что он способен связываться с белком A, но не с белком G (pA+/pG-). Примеры аминокислотных модификаций pA+/pG- включают Fc, содержащий серин в положении 428, серин в положении 434 и необязательно гистидин в положении 436, что касается человеческого IgG1, или включающий эти остатки в соответствующих положениях человеческого IgG 2, 3 или 4. В некоторых аспектах такие аминокислотные модификации в одном IgG Fc полипептиде в положениях 428, 434 и необязательно 436 снижают или предотвращают связывание белка G, улучшая очистку белка.

[0465] В некоторых вариантах осуществления любая из таких модификаций для придания дифференциальной аффинности аффинному реагенту может быть объединена с любой одной или более другими аминокислотными модификациями, описанными выше. Например, модификация I253R может быть объединена либо с модификациями T366S/L368A/Y407V, либо с модификациями T366W. T366S/L368A/Y407V-модифицированный Fc способен образовывать гомодимеры, поскольку отсутствует стерическая окклюзия границы раздела димеризации, как в случае модифицированного Fc T336W. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления модификация I253R комбинируется с T366S/L368A/Y407V-модифицированным Fc, чтобы предотвратить очистку любого гомодимерного Fc, который мог образоваться. Аналогичные модификации можно использовать, комбинируя T366S/L368A/Y407V и H453R.

[0466] В некоторых вариантах осуществления Fc-области гетеродимерной молекулы дополнительно могут содержать одну или более других мутаций Fc, таких как любая описанная выше мутация. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная молекула содержит Fc-область с мутацией, которая уменьшает эффекторную функцию. В

некоторых вариантах осуществления Fc-область изменена для обеспечения пониженных Fc-опосредованных эффекторных функций, например посредством пониженного связывания с Fc-рецептором, например связывания с FcγR, но, как правило, не с FcRn.

[0467] В некоторых вариантах осуществления Fc-область мутирована в одном или более из следующих положений для уменьшения связывания с Fc-рецептором: Glu233 (E233), Leu234 (L234) или Leu235 (L235). Одна или более мутаций могут включать E233P, L234V и/или L235A.

[0468] В конкретных вариантах осуществления мутации Fc-области для уменьшения эффекторной функции Fc, например посредством снижения связывания с Fc-рецептором, FcγR, включают мутации из числа любых из G236R/L328R, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G или E233P/L234V/L235A/G236del, D265A/P329A, D265A/P329G, D265A/N297A, L234V/L235A/D265A, L234V/L235A/N297A, L234V/L235A/P329A или L234V/L235A/P329G.

[0469] В некоторых вариантах осуществления один Fc полипептид гетеродимерной Fc включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 328 (например, SEQ ID NO:103 или 107), 334 (например, SEQ ID NO:115 или 117), а другой Fc полипептид гетеродимерной Fc содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 329 (например, SEQ ID NO:104 или 108), 332 (например, SEQ ID NO:111 или 113), 336 (например, SEQ ID NO:119 или 121). В некоторых вариантах осуществления один Fc полипептид гетеродимерной Fc включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 330 (SEQ ID NO:105 или 109), 335 (например, SEQ ID NO:116 или 118), а другой Fc полипептид гетеродимерной Fc включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 331 (например, SEQ ID NO:106 или 110), 333 (например, SEQ ID NO:112 или 114), 337 (например, SEQ ID NO:120 или 122).

[0470] В некоторых вариантах осуществления Fc-область представленных мультиспецифических полипептидных конструкций демонстрирует одну или более эффекторных функций. В некоторых случаях Fc-область способна обеспечивать Fc-опосредованные эффекторные функции, такие как, например, ADCC (*например,* высвобождение гранзима B NK-клетками), ADCP и/или CDC. Как правило, Fc-область отвечает за эффекторные функции, такие как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC) и антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), в дополнение к антигенсвязывающей способности, которая является основной функцией иммуноглобулинов. Кроме того, последовательность FcRn, присутствующая в Fc-области, играет роль, регулирующую уровень IgG в сыворотке путем увеличения периода полужизни in vivo посредством конъюгации с FcRn рецептором in vivo. В некоторых вариантах осуществления, в которых мультиспецифические полипептидные конструкции содержат расщепляемый линкер, расщепление линкера может дать два компонента,

каждый из которых обладает биологической активностью: CD3-связывающая область, которая способна связываться и взаимодействовать с CD3 на Т-клетке; и Fc-область, связанная с CD28 VHH доменом, которая может проявлять мишень-специфическую эффекторную функцию. В конкретных вариантах осуществления, представленных в настоящей заявке, мультиспецифические полипептидные конструкции содержат нерасщепляемый линкер и могут, в некоторых аспектах, не проявлять независимую Fc-опосредованную эффекторную функцию.

[0471] В некоторых вариантах осуществления Fc-область включает Fc полипептид, который является мутантным или модифицированным для изменения одной или более эффекторных функций. Таким образом, в некоторых случаях эффекторные функции, такие как одна или более из ADCC, ADCP и/или CDC, могут быть изменены, например понижены или усилены, в Fc для применения с представленными обусловленными мультиспецифическими полипептидными конструкциями. Иллюстративные мутации для уменьшения эффекторной функции включают любые описанные выше.

[0472] В некоторых вариантах осуществления IgG1 Fc полипептид или его вариант, такой как любой описанный ниже, может быть получен в G1 m1 или G1 m3 аллотипе. В некоторых вариантах осуществления Fc-область может содержать аминокислоты человеческого G1 m1 аллотипа, такие как остатки, содержащие Asp (D) и Leu (L) в положениях 356 и 358, например представленные в SEQ ID NO:8. В некоторых случаях Fc полипептид может содержать аминокислотные замены E356D и M358L для восстановления остатков аллотипа G1 m1. В других вариантах осуществления Fc-область может содержать аминокислоты человеческого G1 m3 аллотипа, например остатки Glu (E) и Met (M) в положениях 356 и 358 в соответствии с EU нумерацией, например, как представлено в SEQ ID NO: 284 и 285. В некоторых случаях Fc полипептид может содержать аминокислотные замены D356E и L358M для восстановления остатков аллотипа G1 m3.

[0473] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид не включает Fc-область.

d. Линкер

[0474] В любом из представленных вариантов осуществления CD28-связывающий полипептид содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяет или связывает первый компонент и второй компонент.

[0476] Например, CD28 VHH-Fc слияние содержит линкер, который соединяет или связывает по меньшей мере одно из по меньшей мере одного CD28 sdAb с Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления линкер расположен на конце С-концевой области первого компонента, таким образом первый компонент, содержащий по меньшей мере один CD28 VHH, является N-концевым по отношению к Fc-области.

[0476] В любом из представленных вариантов осуществления мультиспецифический CD28-связывающий полипептид, содержащий одно или более TAA sdAb и по меньшей мере одно CD28 sdAb, включает линкер, который соединяет или

связывает по меньшей мере одно из одного или более TAA sdAb и по меньшей мере одно из по меньшей мере одного CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления линкер расположен на конце С-концевой области первого компонента, таким образом первый компонент, содержащий одно или более TAA sdAb, является N-концевым по отношению к по меньшей мере одному CD28 sdAb.

[0477] В некоторых вариантах осуществления представленные CD28-связывающие полипептиды являются мультимерами, такими как димеры, содержащие первый и второй полипептид, таким образом, представленные конструкции включают линкер, соединяющий первый компонент и по меньшей мере один CD28 VHH первого полипептида, и линкер, соединяющий первый компонент и по меньшей мере один CD28 VHH второго полипептида.

[0478] В некоторых вариантах осуществления первый полипептид включает по меньшей мере один TAA-связывающий домен и/или по меньшей мере один CD28 VHH и первый Fc полипептид гетеродимерной Fc-области, а второй полипептид включает по меньшей мере один TAA-связывающий домен и/или по меньшей мере один CD28 VHH и второй Fc полипептид гетеродимерной Fc-области. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид включает по меньшей мере один TAA-связывающий домен и по меньшей мере один CD28 VHH, где TAA-связывающий домен и CD28 VHH соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид включает по меньшей мере один TAA-связывающий домен и по меньшей мере один CD28 VHH, где TAA-связывающий домен и CD28 VHH соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептид включают каждый по меньшей мере один TAA-связывающий домен и по меньшей мере один CD28 VHH, где TAA-связывающий домен и CD28 VHH каждого полипептида соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления линкеры, присутствующие в первом и втором полипептидах обусловленного мультиспецифического CD28-связывающего полипептида, являются одинаковыми.

[0479] В некоторых вариантах осуществления обусловленный мультиспецифический CD28-связывающий полипептид содержит Fc домен. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид содержит линкер, который соединяет или связывает CD28 VHH и Fc домен. В некоторых вариантах осуществления линкер расположен на конце С-концевой области CD28 VHH, таким образом, CD28 VHH является N-концевым по отношению к Fc домену. Должно быть понятно, что поскольку представленные обусловленные мультиспецифические полипептидные конструкции являются мультимерами, такими как димеры, содержащие первый и второй полипептид, представленные конструкции включают линкер, соединяющий CD28 VHH и Fc домен первого полипептида, и линкер, соединяющий CD28 VHH и Fc домен второго полипептида. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид включает по меньшей мере один TAA-связывающий домен и/или по меньшей мере один CD28 VHH и первый Fc полипептид гетеродимерной Fc-области, а второй полипептид включает по

меньшей мере один TAA-связывающий домен и/или по меньшей мере один CD28 VHH и второй Fc полипептид гетеродимерной Fc-области. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид включает по меньшей мере один CD28 VHH, где CD28 VHH и Fc домен соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид включает по меньшей мере один CD28 VHH, где CD28 VHH и Fc домен соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептид включают каждый по меньшей мере один CD28 VHH, где CD28 VHH Fc домен каждого полипептида соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления линкеры, присутствующие в первом и втором полипептидах CD28-связывающей полипептидной конструкции, являются одинаковыми.

[0480] Известны различные полипептидные линкеры для применения в слитых белках (см., например, Chen et al. (2013) Adv. Drug. Deliv. 65:1357-1369; и международные публикации PCT №№ WO 2014/099997, WO2000/24884; патент США № 5258498; патент США № 5525491; патент США № 5525491, патент США № 6132992).

[0481] В некоторых вариантах осуществления обусловленная мультиспецифическая полипептидная конструкция по изобретению включает линкер, который соединяет по меньшей мере одно из одного или более TAA sdAb и по меньшей мере одно из по меньшей мере одного CD28 sdAb. В некоторых вариантах осуществления линкер не является расщепляемым линкером.

[0482] В некоторых вариантах осуществления обусловленная мультиспецифическая полипептидная конструкция по изобретению включает линкер, который соединяет по меньшей мере одно из по меньшей мере одного CD28 sdAb и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления линкер не является расщепляемым линкером.

[0483] Типично, линкер также является таким, который обеспечивает правильную укладку полипептидной конструкции, не демонстрирует заряда, который мог бы быть несовместимым с активностью или функцией связанных полипептидов, и не образует связей или других взаимодействий с аминокислотными остатками в одном или более из доменов, которые могли бы сдерживать или изменять активность связанных полипептидов.

[0484] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой полипептидный линкер. Полипептидный линкер может представлять собой гибкий линкер или жесткий линкер или их комбинацию. В некоторых аспектах линкер представляет собой короткий, средний или длинный линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет до 40 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет до 25 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину по меньшей мере или имеет по меньшей мере около 2 аминокислот. В некоторых аспектах подходящей является, например, длина, составляющая по меньшей мере один и типично меньше чем около 40 аминокислотных остатков, например 2-25 аминокислотных остатков, 5-20 аминокислотных остатков, 5-15 аминокислотных остатков, 8-12

аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления линкер включает от или от около 2 до 24 аминокислот, от 2 до 20 аминокислот, от 2 до 18 аминокислот, от 2 до 14 аминокислот, от 2 до 12 аминокислот, от 2 до 10 аминокислот, от 2 до 8 аминокислот, от 2 до 6 аминокислот, от 6 до 24 аминокислот, от 6 до 20 аминокислот, от 6 до 18 аминокислот, от 6 до 14 аминокислот, от 6 до 12 аминокислот, от 6 до 10 аминокислот, от 6 до 8 аминокислот, от 8 до 24 аминокислот, от 8 до 20 аминокислот, от 8 до 18 аминокислот, от 8 до 14 аминокислот, от 8 до 12 аминокислот, от 8 до 10 аминокислот, от 10 до 24 аминокислот, от 10 до 20 аминокислот, от 10 до 18 аминокислот, от 10 до 14 аминокислот, от 10 до 12 аминокислот, от 12 до 24 аминокислот, от 12 до 20 аминокислот, от 12 до 18 аминокислот, от 12 до 14 аминокислот, от 14 до 24 аминокислот, от 14 до 20 аминокислот, от 14 до 18 аминокислот, от 18 до 24 аминокислот, от 18 до 20 аминокислот или от 20 до 24 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

[0485] Линкеры могут представлять собой природные линкеры, синтетические линкеры или их комбинацию. Особенно подходящие линкерные полипептиды преимущественно включают аминокислотные остатки, выбранные из Глицина (Gly), Серина (Ser), Аланина (Ala) и Треонина (Thr). Например, линкер может содержать по меньшей мере 75% (в расчете на общее количество остатков, присутствующих в пептидном линкере), например по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90% аминокислотных остатков, выбранных из Gly, Ser, Ala и Thr. Линкер также может состоять только из Gly, Ser, Ala и/или Thr остатков. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит 1-25 глициновых остатков, 5-20 глициновых остатков, 5-15 глициновых остатков, или 8-12 глициновых остатков. В некоторых аспектах подходящие пептидные линкеры типично содержат по меньшей мере 50% глициновых остатков, например по меньшей мере 75% глициновых остатков. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер включает только глициновые остатки. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер включает только глициновые и сериновые остатки.

[0486] В некоторых вариантах осуществления эти линкеры состоят преимущественно из аминокислот Глицина и Серина, и указаны в настоящей заявке как GS-линкеры. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит (GGS)n, где n имеет значение от 1 до 10, такое как 1-5, например 1-3, например GGS(GGS)n (SEQ ID NO:244), где n имеет значение от 0 до 10. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит последовательность (GGGGS)n (SEQ ID NO: 123), где n имеет значение от 1 до 10 или n имеет значение от 1 до 5, такое как от 1 до 3. В других вариантах осуществления линкер содержит (GGGGGS)n (SEQ ID NO:124), где n имеет значение от 1 до 4, такое как от 1 до 3. Линкер может включать комбинации любых из перечисленных выше, например можно комбинировать повторы из 2, 3, 4, или 5 GS, GGS, GGGGS и/или GGGGGS линкеров. В некоторых вариантах осуществления такой линкер имеет длину 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 аминокислот.

[0487] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (представлено в виде однобуквенного аминокислотного кода): GGS (SEQ ID NO:244), GGGGS (SEQ ID NO: 125), GGGGGS (SEQ ID NO: 126) или GGSGGGGS (SEQ ID NO:89). В некоторых вариантах осуществления GS-линкер включает аминокислотную последовательность GGSGGS, т.е. (GGS)2 (SEQ ID NO: 1); GGSGGSGGS, т.е. (GGS)3 (SEQ ID NO: 2); GGSGGSGGSGGS, т.е. (GGS)4 (SEQ ID NO: 3); GGSGGSGGSGGSGGS, т.е. (GGS)5 (SEQ ID NO: 4); GGSGGGGS (SEQ ID NO:89); GGGGGSGGGGGSGGGGGS, т.е. (G5S)3 (SEQ ID NO: 127), GGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 129) и GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:128). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GG (SEQ ID NO:249). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GGS (SEQ ID NO:244). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GGGSGS (SEQ ID NO:90). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GGG (SEQ ID NO:87). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GGGG (SEQ ID NO:5). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GGSGGS (SEQ ID NO:1). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GGSGGGGS (SEQ ID NO:89). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GGGGGSGGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:127). В некоторых из любых из представленных выше примеров серин может быть заменен на аланин (например, (Gly4Ala) или (Gly3Ala)).

[0488] В некоторых вариантах осуществления линкер включает пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность Glyx-Xaa-Glyy-Xaa-Glyz (SEQ ID NO:130), где каждый Xaa независимо выбран из Аланина (Ala), Валина (Val), Лейцина (Leu), Изолейцина (Ile), Метионина (Met), Фенилаланина (Phe), Триптофана (Trp), Пролина (Pro), Глицина (Gly), Серина (Ser), Треонина (Thr), Цистеина (Cys), Тирозина (Tyr), Аспарагина (Asn), Глутамина (Gln), Лизина (Lys), Аргинина (Arg), Гистидина (His), Аспартата (Asp) и Глутамата (Glu), и где x, y и z каждый представляет собой целое число в диапазоне 1-5. В некоторых вариантах осуществления каждый Xaa независимо выбран из группы, состоящей из Ser, Ala и Thr. В конкретном варианте каждый из x, y и z равен 3 (с образованием, таким , пептидного линкера, имеющего аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:131), где каждый Xaa выбран, как указано выше.

[0489] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой обогащенный серином линкер, основанный на повторе (SSSSG)y (SEQ ID NO:132) мотива, где y имеет значение по меньшей мере 1, хотя y может иметь значение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

[0490] В некоторых случаях возможно будет желательно обеспечить некоторую жесткость пептидного линкера. Это можно осуществить путем включения пролиновых остатков в аминокислотную последовательность пептидного линкера. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления линкер включает по меньшей мере один пролиновый остаток в аминокислотной последовательности пептидного линкера. Например, пептидный линкер может иметь аминокислотную последовательность, где по меньшей

мере 25% (например, по меньшей мере 50% или по меньшей мере 75%) аминокислотных остатков являются пролиновыми остатками. В одном конкретном варианте осуществления пептидный линкер включает только пролиновые остатки.

[0491] В некоторых аспектах пептидный линкер включает по меньшей мере один цистеиновый остаток, например один цистеиновый остаток. Например, в некоторых вариантах осуществления линкер включает по меньшей мере один цистеиновый остаток и аминокислотные остатки, выбранные из группы, состоящей из Gly, Ser, Ala и Thr. В некоторых таких вариантах осуществления линкер включает глициновые остатки и цистеиновые остатки, например только глициновые остатки и цистеиновые остатки. Как правило, будет включен только один цистеиновый остаток на пептидный линкер. Один пример конкретного линкера, включающего цистеиновый остаток, включает пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность Glym-Cys-Glyn, где n и m каждый представляет собой целое число, имеющее значение 1-12, например 3-9, 4-8 или 4-7. В конкретном варианте такой пептидный линкер имеет аминокислотную последовательность GGGGG-C-GGGGG (SEQ ID NO: 133).

[0492] В некоторых вариантах осуществления линкер слитого белка представляет собой структурированный линкер. В конкретных вариантах осуществления структурированный линкер содержит последовательность (AP)n или (EAAAK)n (SEQ ID NO:134), где n имеет значение от 2 до 20, предпочтительно от 4 до 10, включая, но не ограничиваясь этим, AS-(AP)n-GT (SEQ ID NO:135) или AS-(EAAAK)n-GT (SEQ ID NO:136), где n имеет значение от 2 до 20, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15. В других вариантах осуществления линкер включает последовательности (GGGGA)n (SEQ ID NO:137), (PGGGS)n (SEQ ID NO:138), (AGGGS)n (SEQ ID NO:139) или GGS-(EGKSSGSGSESKST)n-GGS (SEQ ID NO:140, где n имеет значение от 2 до 20), (ADAAP)n (SEQ ID NO:313, где n имеет значение от 2 до 20), (ADAAP)n-G (SEQ ID NO:314, где n имеет значение от 2 до 20), (GEPQG)n (SEQ ID NO:315, где n имеет значение от 2 до 20), (GEPQG)n-G (SEQ ID NO:316, где n имеет значение от 2 до 20), (AGGEP)n (SEQ ID NO:317, где n имеет значение от 2 до 20), (AGGEP)n-G (SEQ ID NO:318, где n имеет значение от 2 до 20), (AGSEP)n (SEQ ID NO:319, где n имеет значение от 2 до 20), (AGSEP)n-G (SEQ ID NO:320, где n имеет значение от 2 до 20), (GGGEQ)n (SEQ ID NO:321, где n имеет значение от 2 до 20), (GGGEQ)n-G (SEQ ID NO:322, где n имеет значение от 2 до 20). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой SSSASASSA (SEQ ID NO:141), GSPGSPG (SEQ ID NO:142), ATTTGSSPGPT (SEQ ID NO:143), ADAAPADAAPG (SEQ ID NO:323), GEPQGGEPQGG (SEQ ID NO:324), AGGEPAGGEPG (SEQ ID NO:325), AGSEPAGSEPG (SEQ ID NO:326) или GGGEQGGGEQG (SEQ ID NO:327).

[0493] В некоторых вариантах осуществления такие линкеры, в силу их структуры, могут быть устойчивыми к протеолитическому расщеплению, предлагая, таким образом, преимущество при введении путем инъекции in vivo.

[0494] В некоторых вариантах осуществления линкер не является расщепляемым

линкером, который также называется нерасщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер не расщепляется протеазой. В некоторых вариантах осуществления линкер, который не является расщепляемым линкером или который не расщепляется протеазой, обычно является стабильным для доставки in vivo или рекомбинантного продуцирования. В некоторых аспектах линкер, который не расщепляется протеазой, включает линкер, который не содержит по меньшей мере одну пептидную связь, которая предпочтительно находится в пределах расщепляемой пептидной последовательности или сайта распознавания протеазой. В конкретных вариантах осуществления нерасщепляемый линкер не является субстратом-мишенью для протеазы, так что он не расщепляется протеазой предпочтительно или специфически по сравнению с линкером, который содержит сайт распознавания субстрата для той же протеазы.

[0495] В некоторых вариантах осуществления линкер не содержит сайта распознавания субстрата или сайта расщепления для конкретной протеазы, который представляет собой последовательность, распознаваемую активным сайтом протеазы, которая расщепляется протеазой. Обычно, например, для сериновой протеазы последовательность расщепления состоит из P1-P4 и P1'-P4' аминокислот в субстрате, где расщепление происходит после положения P1. Обычно длина последовательности расщепления для сериновой протеазы составляет шесть остатков, чтобы соответствовать расширенной субстрат-специфичности многих протеаз, но может быть длиннее или короче в зависимости от протеазы. Как правило, линкер не включает последовательность неустойчивой связи P1-P1', которая распознается протеазой. В некоторых аспектах нерасщепляемый линкер или линкер, который не содержит сайт распознавания субстрата, который специфически распознается для расщепления протеазой, представляет собой линкер, расщепление которого протеазой существенно меньше, чем расщепление целевого субстрата протеазой.

[0496] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых аспектах расщепляемый линкер представляет собой линкер, такой как любой из описанных выше, который дополнительно включает последовательность, которая является субстратом для протеазы благодаря присутствию по меньшей мере одной связи, которая может быть разрушена в физиологических условиях. В некоторых случаях расщепляемый линкер восприимчив или чувствителен к расщеплению в определенных условиях, существующих in vivo, например после воздействия внеклеточной протеазы, в том числе присутствующей в клеточной среде in vivo. В некоторых случаях протеаза может присутствовать в определенном физиологическом микроокружении, таком как микроокружение опухоли, тем самым ограничивая сайты, по которым может происходить расщепление.

[0497] Протеаза обычно проявляет специфичность или предпочтение в отношении расщепления определенного субстрата-мишени по сравнению с другим субстратом, не являющимся мишенью. Такую степень специфичности можно определить на основе константы скорости расщепления последовательности, например линкера, что является

мерой предпочтения протеазы в отношении ее субстрата и эффективности фермента. Любой метод определения скорости увеличения расщепления с течением времени в присутствии различных концентраций субстрата можно использовать для расчета константы специфичности. Например, субстрат связывают с флуорогенным фрагментом, который высвобождается при расщеплении протеазой. Определяя скорость расщепления при различных концентрациях протеазы, можно определить константу специфичности расщепления (k_{cat}/K_M) для конкретной протеазы по отношению к конкретному линкеру. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер представляет собой линкер, который способен специфически расщепляться протеазой со скоростью приблизительно по меньшей мере 1×10^4 $M^{-1}S^{-1}$, или по меньшей мере 5×10^4 $M^{-1}S^{-1}$, по меньшей мере 10×10^4 $M^{-1}S^{-1}$, по меньшей мере 10×0^5 $M^{-1}S^{-1}$ или более.

[0498] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает аминокислотную последовательность, которая может служить субстратом для протеазы, обычно внеклеточной протеазы. Например, расщепляемый линкер может включать последовательность расщепления, содержащую по меньшей мере одну пептидную связь, которая предпочтительно находится в расщепляемой протеазой пептидной последовательности. Подходящие протеазы включают, например, матриксные металлопротеиназы (MMP), цистеиновые протеазы, сериновые протеазы и активаторы плазмина, которые образуются или активируются усиленным образом при таких заболеваниях, как ревматоидный артрит или рак, что приводит к чрезмерной деградации тканей, воспалениям и метастазированию. В конкретных вариантах осуществления протеаза представляет собой протеазу, продуцируемую опухолью, активированной иммунной эффекторной клеткой (например, Т-клеткой или NK-клеткой) или клеткой в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой гранзим В, матриптазу или MMP, такую как MMP-2.

[0499] Расщепляемый линкер может быть выбран на основе протеазы, которая продуцируется опухолью, находящейся в непосредственной близости от клеток, экспрессирующих мишень, и/или продуцируется опухолью, локализованной в ткани совместно с желаемой мишенью мультиспецифических полипептидных конструкций. В литературе имеются сообщения о повышенных уровнях протеаз, имеющих известные субстраты, при ряде видов рака, например солидных опухолях. См., например, La Rocca et al. (2004) British J. of Cancer 90(7): 1414-1421.

[0500] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер, который соединяет CD3 и Fc домены CD3-затрудненной мультиспецифической полипептидной конструкции, расщепляется протеазой, продуцируемой иммунной эффекторной клеткой, которая активируется одним из компонентов. Например, мультиспецифические полипептидные конструкции, которые охватывают Fc-область IgG с активированной или усиленной эффекторной функцией, способны вызывать ADCC при взаимодействии с антигеном-мишенью. Центральное место в ADCC занимает высвобождение гранзима В и перфорина из эффекторных клеток, а именно NK-клеток и цитотоксических Т-клеток.

После высвобождения гранзим B проникает в клетку-мишень перфорин-зависимым образом, где он опосредует апоптоз. Важно отметить, что гранзим B активен во внеклеточном синапсе между эффекторной клеткой и клеткой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер, который соединяет VHH CD28 и Fc домен мультиспецифической полипептидной конструкции, расщепляется гранзимом B. Гранзим B высвобождается во время активации эффекторной клетки, опосредованной одним из компонентов мультиспецифической полипептидной конструкции. В некоторых вариантах осуществления гранзим B и другие протеазы могут продуцироваться иммунными эффекторными клетками, включая активированные T-клетки или NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления активация T-клеток посредством взаимодействия с CD3 при связывании TAA мультиспецифической полипептидной конструкцией может высвобождать такие протеазы, которые затем могут расщеплять специфический расщепляемый линкер, тем самым усиливая или повышая активность CD3-связывающей молекулы для связывания с CD3. В некоторых вариантах осуществления расщепление может усиливать или повышать активность, достигаемую мультиспецифической конструкцией, когда она связана с TAA в нерасщепленном состоянии.

[0501] Иллюстративные субстраты включают, но не ограничиваются этим, субстраты, расщепляемые одним или более из следующих ферментов или протеаз: ADAMS, ADAMTS, например ADAM8; ADAM9; ADAM10; ADAM12; ADAM15; ADAM17/TACE; ADAMDEC1; ADAMTS1; ADAMTS4; ADAMTS5; аспартат-протеазы, например BACE или Ренин; аспарагиновые катепсины, например Катепсин D или Катепсин E; Каспазы, например Каспаза 1, Каспаза 2, Каспаза 3, Каспаза 4, Каспаза 5, Каспаза 6, Каспаза 7, Каспаза 8, Каспаза 9, Каспаза 10 или Каспаза 14; цистеиновые катепсины, например Катепсин B, Катепсин C, Катепсин K, Катепсин L, Катепсин S, Катепсин V/L2, Катепсин X/Z/P; Цистеинпротеиназы, например Круципаин; Легумаин; Отубаин-2; KLK, например KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13 или KLK14; Металлопротеиназы, например Меприн; Неприлизин; PSMA; BMP-1; MMPs, например, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP19, MMP20, MMP23, MMP24, MMP26 или MMP27, серинпротеазы, например активированный белок C, Катепсин A, Катепсин G, Химаза, протеазы-факторы коагуляции (например, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa), Эластаза, гранзим B, Гуанидинобензоатаза, HtrA1, Эластаза Нейтрофилов Человека, Лактоферрин, Марапсин, NS3/4A, PACE4, Плазмин, PSA, tPA, Тромбин, Триптаза, uPA; Трансмембранные Серинпротеазы II типа (TTSP), например DESC1, DPP-4, FAP, гепсин, Матриптаза-2, Матриптаза, TMPRSS2, TMPRSS3 или TMPRSS4; и любая их комбинация.

[0502] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер расщепляется несколькими протеазами, например 2 или более протеазами, 3 или более протеазами, 4 или более протеазаами и т.д.

[0503] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер выбран для использования с определенной протеазой, например протеазой, которая, как известно,

продуцируется опухолью, которая находится в непосредственной близости от клеток, экспрессирующих мишень, и/или продуцируется опухолью, совместно локализованной с мишенью мультиспецифической полипептидной конструкции.

[0504] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит сайт распознавания субстрата или сайт расщепления для конкретной протеазы, который представляет собой последовательность, распознаваемую активным сайтом протеазы, которая расщепляется протеазой. Обычно, например, для сериновой протеазы последовательность расщепления состоит из аминокислот P1-P4 и P1'-P4' в субстрате, где расщепление происходит после положения P1. Обычно длина последовательности расщепления для сериновой протеазы составляет шесть остатков, чтобы соответствовать расширенной субстрат-специфичности многих протеаз, но может быть длиннее или короче в зависимости от протеазы. Как правило, расщепляемый линкер включает последовательность неустойчивой связи P1-P1', которая распознается протеазой. В некоторых аспектах расщепляемый линкер сконструирован для введения пептидной связи, способной расщепляться конкретной протеазой, например, путем введения последовательности сайта распознавания субстрата или последовательности расщепления протеазой.

[0505] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает комбинацию двух или более субстратных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления каждая субстратная последовательность расщепляется той же самой протеазой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две из субстратных последовательностей расщепляются разными протеазами. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает аминокислоту, которая представляет собой субстрат для гранзима B. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый гранзимом B линкер содержит аминокислотную последовательность, имеющую общую формулу P4 P3 P2 P1 ↓ P1’ (SEQ ID NO: 144), где P4 представляет собой аминокислоту I, L, Y, M, F, V или A; P3 представляет собой аминокислоту A, G, S, V, E, D, Q, N или Y; P2 представляет собой аминокислоту H, P, A, V, G, S или T; P1 представляет собой аминокислоту D или E; и P1’ представляет собой аминокислоту I, L, Y, M, F, V, T, S, G или A. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый гранзимом B линкер содержит аминокислотную последовательность, имеющую общую формулу P4 P3 P2 P1 ↓ P1’ (SEQ ID NO: 145), где P4 представляет собой аминокислоту I или L; P3 представляет собой аминокислоту E; P2 представляет собой аминокислоту P или A; P1 представляет собой аминокислоту D; и P1’ представляет собой аминокислоту I, V, T, S или G.

[0506] В некоторых вариантах осуществления субстрат для гранзима B включает аминокислотную последовательность LEAD (SEQ ID NO: 146), LEPD (SEQ ID NO: 147) или LEAE (SEQ ID NO:148). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает аминокислотную последовательность IEPDI (SEQ ID NO:149), LEPDG (SEQ ID NO:150), LEADT (SEQ ID NO:151), IEPDG (SEQ ID NO:152), IEPDV (SEQ ID NO:153), IEPDS (SEQ ID NO:154), IEPDT (SEQ ID NO:155), IEPDP (SEQ ID NO:251) или

LEADG (SEQ ID NO:144).

[0507] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает аминокислоту, которая представляет собой субстрат для матриптазы. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает последовательность P1QAR↓(A/V) (SEQ ID NO: 156), где P1 представляет собой любую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает последовательность RQAR(A/V) (SEQ ID NO: 157). В некоторых вариантах осуществления субстрат для матриптазы включает аминокислотную последовательность RQAR (SEQ ID NO: 158). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает аминокислотную последовательность RQARV (SEQ ID NO: 159).

[0508] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает аминокислоту, которая представляет собой субстрат для одной или более матриксных металлопротеаз (MMP). В некоторых вариантах осуществления MMP представляет собой MMP-2. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит общую формулу P3 P2 P1 ↓ P1' (SEQ ID NO: 160), где P3 представляет собой P, V или A; P2 представляет собой Q или D; P1 представляет собой или N; и P1' представляет собой L, I или M. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит общую формулу P3 P2 P1 ↓ P1' (SEQ ID NO: 161), где P3 представляет собой P; P2 представляет собой Q или D; P1 представляет собой или N; и P1' представляет собой L или I. В некоторых вариантах осуществления субстрат для MMP включает аминокислотную последовательность PAGL (SEQ ID NO: 162).

[0509] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает комбинацию аминокислотной последовательности, которая представляет собой субстрат для гранзима B, и аминокислотной последовательности, которая представляет собой субстрат для матриптазы. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает комбинацию аминокислотной последовательности LEAD (SEQ ID NO: 146) и аминокислотной последовательности RQAR (SEQ ID NO: 158).

[0510] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает комбинацию аминокислотной последовательности, которая представляет собой субстрат для гранзима B, и аминокислотной последовательности, которая представляет собой субстрат для MMP. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает комбинацию аминокислотной последовательности LEAD (SEQ ID NO: 146) и аминокислотной последовательности PAGL (SEQ ID NO: 162).

[0511] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает комбинацию аминокислотной последовательности, которая представляет собой субстрат для матриптазы, и аминокислотной последовательности, которая представляет собой субстрат для MMP. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает комбинацию аминокислотной последовательности RQAR (SEQ ID NO: 158) и аминокислотной последовательности PAGL (SEQ ID NO: 162).

[0512] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает

комбинацию аминокислотной последовательности, которая представляет собой субстрат для гранзима B, аминокислотной последовательности, которая представляет собой субстрат для матриптазы, и аминокислотной последовательности, которая представляет собой субстрат для MMP. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает комбинацию аминокислотной последовательности, которая представляет собой субстрат для гранзима B, и аминокислотной последовательности, которая представляет собой субстрат для MMP. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает комбинацию аминокислотной последовательности LEAD (SEQ ID NO: 146), аминокислотной последовательности RQAR (SEQ ID NO: 158) и аминокислотной последовательности PAGL (SEQ ID NO: 162).

[0513] Расщепляемый линкер может включать любые известные линкеры. Примеры расщепляемых линкеров описаны в Be'liveau et al. (2009) FEBS Journal, 276; опубликованных заявках США №№ US20160194399; US20150079088; US20170204139; US20160289324; US20160122425; US20150087810; US20170081397; патенте США № US9644016.

[0514] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из TGLEADGSPAGLGRQARVG (SEQ ID NO: 163); TGLEADGSRQARVGPAGLG (SEQ ID NO: 164); TGSPAGLEADGSRQARVGS (SEQ ID NO: 165); TGPAGLGLEADGSRQARVG (SEQ ID NO: 166); TGRQARVGLEADGSPAGLG (SEQ ID NO: 167); TGSRQARVGPAGLEADGS (SEQ ID NO: 168); и TGPAGLGSRQARVGLEADGS (SEQ ID NO:169); GPAGLGLEPDGSRQARVG (SEQ ID NO: 170); GGSGGGGIEPDIGGSGGS (SEQ ID NO: 171); GGSGGGGLEADTGGSGGS (SEQ ID NO: 172); GSIEPDIGS (SEQ ID NO: 173); GSLEADTGS (SEQ ID NO: 174); GGSGGGGIEPDGGGSGGS (SEQ ID NO: 175); GGSGGGGIEPDVGGSGGS (SEQ ID NO: 176); GGSGGGGIEPDSGGSGGS (SEQ ID NO: 177); GGSGGGGIEPDTGGSGGS (SEQ ID NO: 178); GGGSLEPDGSGS (SEQ ID NO: 179); и GPAGLGLEADGSRQARVG (SEQ ID NO: 180), GGEGGGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 181); GSSAGSEAGGSGQAGVGS (SEQ ID NO: 182); GGSGGGGLEAEGSGGGGS (SEQ ID NO: 183); GGSGGGGIEPDPGGSGGS(SEQ ID NO: 184); TGGSGGGGIEPDIGGSGGS (SEQ ID NO: 185).

D. Сконструированные клетки

[0515] В настоящей заявке представлены сконструированные клетки, экспрессирующие любой из представленных CD28-связывающих полипептидов. В некоторых вариантах осуществления клетки, такие как иммунные клетки, например T-клетки или NK клетки, сконструированы для продуцирования любого из представленных CD28-связывающих полипептидов. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки экспрессируют и способны или могут секретировать CD28-связывающие полипептиды из клеток в условиях, подходящих для секреции белка. В одном варианте осуществления клетка выбрана из группы, состоящей из T-клетки, природной киллерной (NK) клетки, цитотоксического T-лимфоцита (CTL), регуляторной

Т-клетки, гемопоэтических стволовых клеток и/или плюрипотентных эмбриональных/индуцированных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой лимфоцит, такой как опухоль-инфильтрующий лимфоцит (TIL), Т-клетка или NK-клетка. В некоторых случаях клетка представляет собой Т-клетку, такую как CD4 и/или CD8 Т-клетка. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки являются первичными клетками, полученными от субъекта, такого как пациент. В конкретных вариантах осуществления субъект представляет собой субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления клетки являются аутологичными клетками субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки, например Т-клетки, могут быть выделены у пациента (также называемые первичными клетками) для конструирования, например трансфекции или трансдукции, с нуклеиновокислотной конструкцией, кодирующей CD28-связывающий полипептид.

[0516] В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки включают, но не ограничиваются этим, Т-хелперные клетки, цитотоксические Т-клетки (альтернативно цитотоксический Т-лимфоцит, или CTL), природные киллерные Т-клетки, регуляторные Т-клетки, Т-клетки памяти, или гамма дельта Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки являются CD4+ или CD8+.

[0517] В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки экспрессируют CD28-связывающие полипептиды, которые секретируются из клетки. В некоторых вариантах осуществления такой CD28-связывающий полипептид кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CD28-связывающий полипептид под функциональным контролем сигнальной последовательности для секреции. В некоторых вариантах осуществления кодируемый CD28-связывающий полипептид секретируется при экспрессии из клетки. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой не-нативный сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид из иммуноглобулина (например, IgG тяжелой цепи или IgG-каппа легкой цепи), цитокина (такого как интерлейкин-2 (IL-2) или CD33), сывороточного белка альбумина (*например,* HSA или альбумин), сигнальной последовательности человеческого белка-предшественника азуроцидина, люциферазы, трипсиногена (*например,* химотрипсиногена или трипсиногена) или другой сигнальный пептид, способный эффективно секретировать белок из клетки.

[0518] В некоторых вариантах осуществления представленные сконструированные клетки также экспрессируют или сконструированы для экспрессии антигенсвязывающего рецептора, такого как рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, такая как сконструированная Т-клетка, распознает желаемый антиген, ассоциированный с раком. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий рецептор содержит антигенсвязывающий фрагмент, который

специфически связывается с опухоль-специфическим антигеном или опухоль-ассоциированным антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий рецептор представляет собой CAR (химерный антигенный рецептор), который содержит антигенсвязывающий домен (*например,* scFv), который специфически связывается с антигеном, таким как опухоль-специфический антиген или опухоль-ассоциированный антиген, при этом CAR содержит антигенсвязывающий домен (*например,* scFv), который специфически связывается с антигеном, таким как опухоль-специфический антиген или опухоль-ассоциированный антиген, а также содержит трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область (эндодомен), содержащую активирующий домен (например, CD3зета сигнальный домен), и в некоторых случаях костимулирующий домен способен индуцировать или опосредовать сигнал активации для Т-клетки после связывания антигена. В другом варианте осуществления сконструированная клетка обладает TCR, таким как рекомбинантный или сконструированный TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR может представлять собой нативный TCR. Специалистам в данной области должно быть понятно, что, как правило, нативные Т-клеточные рецепторы млекопитающих включают альфа и бета цепь (или гамма и дельта цепь), вовлеченную в антиген-специфическое распознавание и связывание. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой сконструированный TCR, который модифицирован. В некоторых вариантах осуществления TCR сконструированной Т-клетки специфически связывается с опухоль-ассоциированным или опухоль-специфическим антигеном, презентированным в виде пептида на молекуле главного комплекса гистосовместимости (MHC).

[0519] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающие полипептиды могут быть включены в сконструированные клетки, такие как сконструированные Т-клетки, различными способами, такими как способы, используемые для рекомбинантных клеток-хозяев. Различные способы для введения ДНК конструкции в клетки, такие как первичные клетки, например Т-клетки, известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления используют вирусную трансдукцию или электропорацию плазмидой. В типичных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CD28-связывающий полипептид, или вектор экспрессии, включает сигнальный пептид, который локализует CD28-связывающий полипептид для секреции. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую CD28-связывающий полипептид, субклонируют в вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор, который обеспечивает возможность экспрессии в клетке млекопитающего, являющейся клеткой-хозяином. Вектор экспрессии можно ввести в клетку-хозяин млекопитающего и, в условиях культивирования клетки-хозяина, CD28-связывающий полипептид экспрессируется на клетке или в клетке и в некоторых случаях секретируется.

[0520] Также в настоящей заявке представлены способы для профилактики и/или лечения заболевания или состояния у субъекта, такого как рак, которые включают введение субъекту сконструированных клеток, представленных в настоящей заявке. Как

правило, субъект нуждается в лечении заболевания или состояния, таком как фармацевтически активное количество клетки и/или фармацевтической композиции, представленной в настоящей заявке.

IV. ЭКСПРЕССИЯ И ПРОДУКЦИЯ ПОЛИПЕПТИДА

[0521] Представлены молекулы нуклеиновых кислот, включающие полинуклеотиды, которые кодируют любые из представленных sdAb и CD28-связывающих полипептидов, таких как слитые белки и мультиспецифические связывающие полипептиды. В некоторых вариантах осуществления представленные нуклеиновокислотные последовательности и, в частности, последовательности ДНК кодируют слитые белки, представленные в настоящей заявке. В любом из представленных выше вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты может также кодировать лидерную последовательность, которая направляет секрецию CD28-связывающего полипептида, при этом лидерная последовательность типично расщепляется таким образом, что она не присутствует в секретируемом полипептиде. Лидерная последовательность может представлять собой лидерную последовательность нативной тяжелой цепи (или VHH) или может представлять собой другую гетерологичную лидерную последовательность.

[0522] Молекулы нуклеиновых кислот можно конструировать с использованием методов рекомбинантной ДНК, традиционных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вектор экспрессии, который является подходящим для экспресси в выбранной клетке-хозяине.

[0523] Представлены векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, которые кодируют CD28-связывающие полипептиды, такие как слитый белок или мультиспецифический связывающий полипептид, описанные в настоящей заявке. Такие векторы включают, но не ограничиваются этим, ДНК-векторы, фаговые векторы, вирусные векторы, ретровирусные векторы и т.д. В некоторых вариантах осуществления выбран вектор, оптимизированный для экспрессии полипептидов в желаемом типе клеток, таких как CHO или полученные из CHO клетки, или в клетках NSO. Примеры таких векторов описаны, например, в Running Deer et al., Biotechnol. Prog. 20:880-889 (2004).

[0524] В частности, ДНК-вектор, кодирующий желаемые CD28-связывающие полипептиды, такие как слитый белок или мультиспецифический связывающий полипептид, можно использовать для облегчения способов получения CD28-связывающих полипептидов, описанных в настоящей заявке, и для получения значительных количеств. Последовательность ДНК может быть встроена в соответствующий вектор экспрессии, т.е. вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции встроенной кодирующей белок последовательности. Для экспрессии кодирующей белок последовательности можно использовать различные системы вектор-хозяин. К ним относятся клеточные системы млекопитающих, инфицированные вирусом (например, вирусом коровьей оспы, аденовирусом и т.д.); системы клеток насекомых, инфицированные вирусом (например, бакуловирусом); микроорганизмы, такие как

дрожжи, содержащие дрожжевые векторы, или бактерии, трансформированные бактериофаговой ДНК, плазмидной ДНК или космидной ДНК. В зависимости от используемой системы вектор-хозяин можно использовать любой из ряда подходящих элементов транскрипции и трансляции.

[0525] Изобретение также обеспечивает способы получения CD28-связывающих полипептидов, таких как слитый белок или мультиспецифический связывающий полипептид, путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии полипептида, при этом клетка включает выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CD28-связывающий полипептид, описанный в настоящей заявке, и/или векторы, которые включают эти выделенные последовательности нуклеиновых кислот.

[0526] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид, такой как слитый белок или мультиспецифический связывающий полипептид, может экспрессироваться в прокариотических клетках, таких как бактериальные клетки; или в эукариотических клетках, таких как грибковые клетки (такие как дрожжи), растительные клетки, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Такую экспрессию можно осуществить, например, в соответствии с процедурами, известными в данной области. Примеры эукариотических клеток, которые можно использовать для экспрессии полипептидов, включают, но не ограничиваются этим, клетки COS, включая клетки COS 7; клетки 293, включая клетки 293-6E; клетки CHO, включая CHO-S, DG44. Lec13 CHO клетки и клетки FUT8 CHO; клетки PER.C6® (Crucell); и клетки NSO. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающие полипептиды можно экспрессировать в дрожжах. См., например, публикацию США № US 2006/0270045 A1. В некоторых вариантах осуществления конкретная эукариотическая клетка-хозяин выбрана на основе ее способности производить желаемые посттрансляционные модификации полипептида. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки CHO продуцируют полипептиды с более высоким уровнем сиалилирования, чем тот же полипептид, продуцируемый в клетках 293.

[0527] Введение одной или более нуклеиновых кислот (например, векторов) в желаемую клетку-хозяин можно осуществить любым методом, включая, но не ограничиваясь этим, трансфекцию с фосфатом кальция, опосредованную DEAE-декстраном трансфекцию, опосредованную катионными липидами трансфекцию, электропорацию, трансдукцию, инфекцию и т.д. Неограничивающие иллюстративные способы описаны, например, в Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Нуклеиновые кислоты могут быть транзиентно или стабильно трансфицированы в желаемые клетки-хозяева любым подходящим способом.

[0528] Также представлены клетки-хозяева, содержащие любую из нуклеиновых кислот или векторов, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления представлена клетка-хозяин, которая экспрессирует CD28-связывающий полипептид, такой как слитый белок или мультиспецифический связывающий

полипептид, описанный в настоящей заявке. CD28-связывающие полипептиды, экспрессированные в клетках-хозяевах, могут быть очищены любым подходящим способом. Такие способы включают, но не ограничиваются этим, использование аффинных матриц или хроматографии гидрофобного взаимодействия. Подходящие аффинные лиганды включают CD80 или CD86 и агенты, которые связывают Fc-области. Например, для связывания Fc-области и очистки CD28-связывающего полипептида, содержащего Fc-область, можно использовать аффинную колонку с белком A, белком G, белком A/G или антителом. Гидрофобная интерактивная хроматография, например колонка с бутилом или фенилом, также может подходить для очистки некоторых полипептидов, таких как антитела. Ионообменная хроматография (например, анионообменная хроматография и/или катионообменная хроматография) также может подходить для очистки некоторых полипептидов, таких как антитела. Смешанная хроматография (например, обращеннофазовая/анионообменная, обращеннофазовая/катионообменная, гидрофильного взаимодействия/анионообменная, гидрофильного взаимодействия/катионообменная и т.д.) также может подходить для очистки некоторых полипептидов, таких как антитела. В данной области техники известно множество способов очистки полипептидов.

[0529] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид, такой как слитый белок или мультиспецифический связывающий полипептид, получают в бесклеточной системе. Неограничивающие примеры бесклеточных систем описаны, например, в Sitaraman et al., Methods Mol. Biol. 498: 229-44 (2009); Spirin, Trends Biotechnol. 22: 538-45 (2004); Endo et al., Biotechnol. Adv. 21: 695-713 (2003).

[0530] В некоторых вариантах осуществления представлены CD28-связывающие полипептиды, такие как слитые белки или мультиспецифические связывающие полипептиды, полученные способами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид получен в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид получен в бесклеточной системе. В некоторых вариантах осуществления анти-CD28 sdAb является очищенным. В некоторых вариантах осуществления слитый белок является очищенным. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид является очищенным. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий полипептид является очищенным. В некоторых вариантах осуществления представлена среда для культивирования клеток, включающая CD28-связывающий полипептид.

[0531] В некоторых вариантах осуществления представлены композиции, включающие антитела, полученные способами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления композиция включает CD28-связывающий полипептид, полученный в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления композиция включает CD28-связывающий полипептид, полученный в бесклеточной системе. В некоторых вариантах осуществления композиция включает очищенный CD28-связывающий полипептид, такой как слитый белок или мультиспецифический

связывающий полипептид.

V. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ

[0532] В настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, содержащие любые из анти-CD28 sdAb, CD28-связывающих полипептидов, слитых белков и/или мультиспецифических связывающих полипептидов, представленных в настоящей заявке, или экспрессирующие их сконструированные клетки. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающие полипептиды, такие как слитые белки и/или мультиспецифические связывающие полипептиды по изобретению (также указанные в настоящей заявке как “активные соединения”) и их производные, фрагменты, аналоги и гомологи, могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, экспрессирующие химерный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор, содержащие CD28-связывающий полипептид, представленный в настоящей заявке, могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения.

[0533] Такие композиции обычно содержат фармацевтически приемлемый носитель. Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т.п., совместимые с введением фармацевтического препарата. Подходящие носители описаны в последнем издании Remington’s Pharmaceutical Sciences, стандартном справочном тексте в данной области, который включен в настоящую заявку в качестве ссылки. Подходящие примеры таких носителей или разбавителей включают, но не ограничиваются этим, воду, физиологический раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% раствор человеческого сывороточного альбумина. Также можно использовать липосомы и неводные носители, такие как нелетучие масла. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда какие-либо обычные среды или агенты несовместимы с активным соединением, предусматривается их использование в композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

[0534] Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению формулируют таким образом, чтобы она была совместима с ее предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например внутривенное, внутрикожное, подкожное, внутриопухолевое, пероральное (например, ингаляционное), чрескожное (т.е. местное), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как

аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать при помощи кислот или оснований, таких как хлористоводородная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

[0535] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы (если являются водорастворимыми) или дисперсии и стерильные порошки для получения экстемпоральных стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, CREMOPHOR EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко ввести шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае диспергирования и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может достигаться с использованием различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях будет предпочтительнее включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированную абсорбцию инъекционных композиций можно обеспечить включением в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

[0536] Стерильные растворы для инъекций можно получить путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций методы получения включают сушку в вакууме и сушка вымораживанием, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из содержащего их ранее полученного стерильно отфильтрованного раствора.

[0537] Пероральные композиции обычно включают инертный разбавитель или

пищевой носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. Для перорального терапевтического введения активное соединение можно объединить с эксципиентами и использовать в форме таблеток, пастилок или капсул. Композиции для перорального применения также можно получить с использованием жидкого носителя для применения в виде средства для полоскания рта, при этом соединение в жидком носителе вводят в полость рта для промывки, отхаркивания или проглатывания. Фармацевтически совместимые связующие агенты и/или адъюванты могут быть включены как часть композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т.п. могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединения аналогичной природы: связующее, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиент, такой как крахмал или лактоза, разрыхлитель, такой как альгиновая кислота, Primogel или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или Sterites; вещество, способствующее скольжению, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновая отдушка.

[0538] Для введения путем ингаляции соединения доставляются в виде аэрозольного спрея из контейнера под давлением или дозатора, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или распылитель.

[0539] Системное введение также можно осуществлять трансмукозальным или трансдермальным способом. Для трансмукозального или трансдермального введения в композиции используются пенетранты, соответствующие барьеру, через который необходимо проникнуть. Такие пенетранты широко известны в данной области и включают, например, средства для трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Трансмукозальное введение можно осуществлять с использованием назальных спреев или суппозиториев. Для трансдермального введения активные соединения формулируют в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как это обычно известно в данной области.

[0540] Соединения также можно получить в форме суппозиториев (например, с обычными основами для суппозиториев, такими как масло какао и другие глицериды) или удерживаемых клизм для ректального введения.

[0541] В одном варианте осуществления получают композиции активных соединений с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, такие как композиции с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Способы получения таких композиций будут очевидны специалистам в данной области. Материалы также можно приобрести у Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомальные суспензии также можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получить в соответствии со способами, известными

специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811.

[0542] Особенно выгодно формулирование композиций для перорального или парентерального введения в виде стандартной дозированной формы для простоты введения и однородности дозировки. Стандартная дозированная форма, в контексте настоящей заявки, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в ассоциации с требуемым фармацевтическим носителем. Требования к стандартным дозированным формам по настоящему изобретению диктуются и напрямую зависят от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, а также от ограничений, характерных для области составления композиций таких активных соединений для лечения индивидуумов.

[0543] Фармацевтические композиции могут быть включены в набор, контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями по применению. Эти фармацевтические композиции могут быть включены в диагностические наборы с инструкциями по применению.

[0544] Фармацевтические композиции вводят в количестве, эффективном для лечения или профилактики конкретного показания. Терапевтически эффективное количество обычно зависит от массы тела субъекта, которого лечат, его или ее физического состояния или состояния здоровья, степени тяжести состояния, подлежащего лечению, или возраста субъекта, принимающего лечение. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно вводить в количестве от около 50 мкг/кг массы тела до около 50 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно вводить в количестве от около 100 мкг/кг массы тела до около 50 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно вводить в количестве от около 100 мкг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно вводить в количестве от около 0,5 мг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела на дозу.

[0545] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно вводить в количестве от около 10 до около 1000 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно вводить в количестве от около 20 мг до около 500 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно вводить в количестве от около 20 до около 300 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно вводить в количестве от около 20 мг до около 200 мг на дозу.

[0546] Фармацевтическую композицию можно вводить субъектам по мере необходимости. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу фармацевтической композиции вводят субъекту один или более раз. В различных

вариантах осуществления эффективную дозу фармацевтической композиции вводят субъекту один раз в месяц, реже одного раза в месяц, например раз в два месяца, раз в три месяца или раз в шесть месяцев. В других вариантах осуществления эффективную дозу фармацевтической композиции вводят более одного раза в месяц, например, раз в две недели, раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, ежедневно или более раз в день. Эффективную дозу фармацевтической композиции вводят субъекту по меньшей мере один раз. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу фармацевтической композиции можно вводить многократно, в том числе в течение по меньшей мере месяца, по меньшей мере шести месяцев или по меньшей мере года. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят субъекту по мере необходимости для облегчения одного или более симптомов состояния.

VI. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

[0547] CD28-связывающие полипептиды, такие как слитые белки и мультиспецифические связывающие полипептиды, или экспрессирующие их сконструированные клетки, описанные в настоящей заявке, применимы для различных терапевтических, диагностических и профилактических показаниях. Например, CD28-связывающие полипептиды или сконструированные клетки применимы для лечения различных заболеваний и расстройств у субъекта. Такие способы и применения включают терапевтические способы и применения, например, включающие введение молекул или сконструированных клеток или композиций, содержащих их, субъекту, страдающему заболеванием, состоянием или расстройством, таким как опухоль или рак. В некоторых вариантах осуществления сконструированную молекулу или клетку вводят в количестве, эффективном для лечения заболевания или расстройства. Применение включает использование молекул, содержащих CD28-связывающие полипептиды, такие как слитые белки и мультиспецифические связывающие полипептиды, или сконструированных клеток в таких способах и методах лечения, а также для получения лекарственного средства для осуществления таких терапевтических методов. В некоторых вариантах осуществления способы осуществляют путем введения CD28-связывающих полипептидов или сконструированных клеток или композиций, содержащих их, субъекту, имеющему, или у которого подозревается, заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления способы, таким образом, лечат заболевание, состояние или расстройство у субъекта.

[0548] В одном варианте осуществления в качестве терапевтических средств можно использовать CD28-связывающий полипептид, такой как слитый белок или мультиспецифический связывающий полипептид, или сконструированную клетку по настоящему изобретению. Такие средства обычно используют для диагностики, прогнозирования, мониторинга, лечения, облегчения и/или предотвращения заболевания или патологии у субъекта. Терапевтический режим осуществляется путем идентификации субъекта, например, пациента-человека или другого млекопитающего, страдающего (или подверженного риску развития) расстройства, с использованием стандартных методов.

Субъекту вводят CD28-связывающий полипептид или сконструированную клетку. CD28-связывающий полипептид или сконструированную клетку вводят субъекту, и обычно они оказывают эффект благодаря связыванию с мишенью(мишенями).

[0549] В некоторых вариантах осуществления представленная CD28 мультиспецифическая полипептидная конструкция или сконструированная клетка способны модулировать, например усиливать, иммунный ответ при введении субъекту, например, путем костимуляции Т-клеток для индуцирования противоопухолевой активности. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предложен способ модулирования иммунного ответа у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества представленной мультиспецифической конструкции, или сконструированной клетки, или их фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления способ модулирования иммунного ответа повышает или усиливает иммунный ответ у субъекта. Например, повышение или усиление ответа может быть усилением клеточно-опосредованного иммунитета. В некоторых примерах способ повышает активность Т-клеток, такую как активность цитолитических Т-клеток (CTL). В некоторых вариантах осуществления модулированный (например, усиленный) иммунный ответ направлен против опухоли или рака.

[0550] В некоторых вариантах осуществления введение CD28-связывающего полипептида, такого как слитый белок CD28-Fc или мультиспецифический связывающий полипептид, содержащий Fc-область, может активировать врожденные иммунные клетки посредством связывания FcγR через Fc-область мультиспецифической полипептидной конструкции. Введение таких мультиспецифических полипептидных конструкций может оказывать агонистическое действие, стимулировать, активировать и/или усиливать эффекторные функции клеток врожденного иммунитета, включая ADCC, высвобождение цитокинов, дегрануляцию и/или ADCP. В случае обусловленной мультиспецифической полипептидной конструкции введение таких мультиспецифических полипептидных конструкций может активировать Т-клетки при связывании опухоль-ассоциированного антигена на клетке-мишени (например, опухолевой клетке), тем самым позволяя анти-CD28-связывающей части связываться с CD28 на Т-клетках. В некоторых случаях введение мультиспецифических полипептидных конструкций может оказывать агонистическое действие, стимулировать, активировать и/или усиливать CD28-опосредованную активацию Т-клеток, цитотоксичность, высвобождение цитокинов и/или пролиферацию.

[0551] В некоторых вариантах осуществления представленные способы предназначены для лечения заболевания или состояния у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества любого из представленных CD28-связывающих полипептидов, таких как слитые белки и мультиспецифические связывающие полипептиды, или сконструированных клеток, или их фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак. Как правило, облегчение или лечение заболевания или расстройства

включает ослабление одного или более симптомов или медицинских проблем, связанных с заболеванием или расстройством. Например, в случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства может обеспечить одно из следующих или их комбинацию: уменьшить количество раковых клеток; уменьшить размер опухоли; ингибировать (т.е. до некоторой степени уменьшать и/или останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать метастазирование опухоли; ингибировать, в некоторой степени, рост опухоли; и/или облегчить до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком. В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению можно использовать для предотвращения возникновения или рецидива заболевания или расстройства у субъекта, например у человека или другого млекопитающего, такого как примат, не являющийся человеком, животного-компаньона (например, у кошки, собаки, лошади), сельскохозяйственного животного, рабочего животного или животного зоопарка. Термины «субъект» и «пациент» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо.

[0552] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающие полипептиды или сконструированные клетки, или их фармацевтические композиции, можно использовать для ингибирования роста раковых клеток млекопитающих (таких как раковые клетки человека). Способ лечения рака может включать введение эффективного количества любой из фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке, субъекту, больному раком. Эффективное количество фармацевтической композиции можно вводить для ингибирования, остановки или обратного развития рака. Раковые клетки человека можно лечить in vivo или ex vivo. При лечении ex vivo пациента-человека ткани или жидкости, содержащие раковые клетки, обрабатываются вне организма, а затем ткань или жидкости повторно вводятся пациенту. В некоторых вариантах осуществления рак лечат у пациента-человека in vivo путем введения пациенту терапевтической композиции.

[0553] Неограничивающие примеры заболеваний включают: все типы рака (молочной железы, легких, колоректального рака, предстательной железы, меланомы, рака головы и шеи, поджелудочной железы и т.д.), ревматоидный артрит, болезнь Крона, SLE, сердечно-сосудистые повреждения, ишемию и т.д. Например, показания будут включать лейкозы, в том числе Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз (T-ALL), лимфобластные заболевания, включая множественную миелому, и солидные опухоли, включая рах легких, колоректальный, предстательной железы, поджелудочной железы и молочной железы, включая трижды отрицательный рак молочной железы. Например, показания включают заболевания костей или метастазы при раке, независимо от происхождения первичной опухоли; рак надпочечников; рак молочной железы, включая в качестве неограничивающего примера базальноподобный рак молочной железы, ER/PR+ рак молочной железы, Her2+ рак молочной железы, трижды отрицательный рак молочной железы; колоректальный рак; рак эндометрия; рак желудка; рак головного мозга, такой как, в качестве неограничивающего примера, астроцитома, глиобластома; рак головы и

шеи, такой как рак пищевода; рак печени; рак легкого, такой как, в качестве неограничивающего примера, немелкоклеточный рак легкого; множественную миелому, рак яичников; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы; саркому, такую как остеосаркома; рак почки, такой как, в качестве неограничивающего примера, почечно-клеточная карцинома; рак кожи, такой как, в качестве неограничивающего примера, плоскоклеточный рак, базальноклеточная карцинома или меланома; и/или тестикулярный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак головного мозга, такой как астроцитома или глиобластома. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы, такой как базальноподобный рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак надпочечников. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак почки. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак печени. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой тестикулярный рак.

[0554] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающие полипептиды, такие как слитые белки и мультиспецифические связывающие полипептиды, или сконструированные клетки, или их фармацевтические композиции, применимы для лечения, облегчения симптома, облегчения и/или замедления прогрессирования рака или другого неопластического состояния. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак надпочечников, рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак молочной железы, рак матки/шейки матки, рак яичников, рак предстательной железы, тестикулярный рак, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак почки, рак головы и шеи, рак легких, рак желудка, герминогенный рак, рак костей, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи, новообразования центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, миелому, саркому и рак, связанный с вирусами. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой метастатический рак, рефрактерный рак или рецидивирующий рак.

[0555] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество CD28-связывающего полипептида, такого как слитый белок или мультиспецифическая полипептидная конструкция по настоящему изобретению, как правило, относится к количеству, необходимому для достижения терапевтической цели. Как правило, точное количество вводимых композиций по настоящему изобретению может определить врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, размере опухоли, распространенности инфекции или метастазов и состояния пациента (субъекта).

[0556] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза может составлять, в качестве неограничивающего примера, от около 0,01 мкг/кг массы тела до около 10 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления терапевтически

эффективная доза может составлять, в качестве неограничивающего примера, от около 0,01 мг/кг массы тела до около 5-10 мг/кг массы тела. Обычная частота дозирования может варьироваться, например, от двух раз в день до одного раза в неделю.

[0557] В некоторых вариантах осуществления вводят терапевтическое количество композиции сконструированных клеток по настоящему изобретению. Как правило, указывается, что фармацевтическую композицию, включающую сконструированные клетки, например Т-клетки, описанные в настоящей заявке, можно вводить при дозе от 10^4 до 10^9 клеток/кг массы тела, например от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целочисленные значения в этих пределах. Композиции сконструированных клеток, такие как композиции Т-клеток, также можно вводить несколько раз при этих дозах. Клетки можно вводить с использованием методов инфузии, которые широко известны в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al, New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988). Оптимальную дозу и схему лечения для конкретного пациента легко может определить специалист в области медицины путем отслеживания признаков заболевания у пациента и соответствующей корректировки лечения.

[0558] Эффективность лечения определяют в связи с любым известным способом диагностики или лечения конкретного расстройства. Методы скрининга CD28-связывающих полипептидов или содержащих их сконструированных клеток, которые обладают желаемой специфичностью, включают, но не ограничиваются этим, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и другие иммунологически опосредованные методы, известные в данной области. Известно множество способов определения того, в достаточной ли степени введение предложенных CD28-связывающих полипептидов или сконструированных клеток модулирует иммунологическую активность путем элиминации, секвестрирования или инактивации иммунных клеток, опосредующих или способных опосредовать нежелательный иммунный ответ; индуцирования, генерирования или включения иммунных клеток, которые опосредуют или способны опосредовать защитный иммунный ответ; изменения физических или функциональных свойств иммунных клеток; или комбинации этих эффектов. Примеры измерений модуляции иммунологической активности включают, но не ограничиваются этим, исследование присутствия или отсутствия популяций иммунных клеток (с использованием проточной цитометрии, иммуногистохимии, гистологии, электронной микроскопии, полимеразной цепной реакции (ПЦР)); измерение функциональной способности иммунных клеток, включая способность или устойчивость к пролиферации или делению в ответ на сигнал (например, с использованием анализов пролиферации Т-клеток и pepscan анализа, основанного на включении 3H-тимидина после стимуляции анти-CD3-антителом, антитела против Т-клеточного рецептора, анти-CD28 антитела, кальциевых ионофоров, PMA (форбол-12-миристат-13-ацетат) антигенпрезентирующих клеток, нагруженных пептидным или белковым антигеном, анализов пролиферации В-клеток); измерение способности убивать или лизировать другие клетки (например, анализы цитотоксических Т-клеток); измерение цитокинов, хемокинов, молекул

клеточной поверхности, антител и других продуктов клеток (например, с использованием метода проточной цитометрии, твердофазного иммуноферментного анализа, вестерн-блоттинга, анализа белковых микрочипов, анализа иммунопреципитации); измерение биохимических маркеров активации иммунных клеток или сигнальных путей в иммунных клетках (например, вестерн-блоттинг и иммунопреципитация, анализ фосфорилирования тирозина, серина или треонина, расщепление полипептидов и образование или диссоциация белковых комплексов; анализ белковых микрочипов; транскрипционное профилирование ДНК с использованием наборов ДНК или субтрактивной гибридизации); измерение гибели клеток посредством апоптоза, некроза или других механизмов (например, окрашивание аннексином V, TUNEL анализы, гель-электрофорез для измерения лэддеринга ДНК, гистология; анализы флуорогенных каспаз, вестерн-блот-анализ субстратов каспаз); измерение генов, белков и других молекул, продуцируемых иммунными клетками (например, нозерн-блоттинг, полимеразная цепная реакция, ДНК-микрочипы, белковые микрочипы, двумерный гель-электрофорез, вестерн-блот-анализ, твердофазный иммуноферментный анализ, проточная цитометрия); и измерение клинических симптомов или результатов, таких как улучшение аутоиммунных, нейродегенеративных и других заболеваний, связанных с собственными белками или собственными полипептидами (клинические баллы, требования к использованию дополнительных терапий, функциональный статус, визуализирующие исследования), например, путем измерения частоты рецидивов или тяжести заболевания.

[0559] Представленные CD28-связывающие полипептиды также могут быть полезны в различных диагностических и профилактических композициях. В одном варианте осуществления CD28-связывающий полипептид вводят пациентам с риском развития одного или более из указанных выше расстройств. Предрасположенность пациента или органа к одному или более расстройствам можно определить с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

[0560] В другом варианте осуществления изобретения CD28-связывающий полипептид или сконструированную клетку вводят людям, у которых диагностированы клинические признаки, связанные с одним или более из указанных выше расстройств. При постановке диагноза такое терапевтическое средство вводят для смягчения или устранения эффектов клинического показания.

Комбинированная терапия

[0561] CD28-связывающие полипептиды, такие как слитые белки и мультиспецифические связывающие полипептиды, или сконструированные клетки по настоящему изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с другими способами лечения, такими как другие противораковые средства. Их можно вводить до, по существу одновременно или после других способов лечения (т.е. одновременно или последовательно). В некоторых вариантах осуществления способ лечения, описанный в настоящей заявке, может дополнительно включать: лучевую терапию, химиотерапию, вакцинацию, таргетную терапию опухоли, CAR-T терапию, онколитическую вирусную

терапию, иммунотерапию рака, цитокиновую терапию, хирургическую резекцию, модификацию хроматина, абляцию, криотерапию, антисмысловой агент против опухолевой мишени, миРНК-агент против опухолевой мишени, микроРНК-агент против опухолевой мишени или противораковое/противоопухолевое средство, или биологическое средство, такое как антитело, цитокин или слияние внеклеточный домен рецептора-Fc.

[0562] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид, представленный в настоящей заявке, вводят одновременно с одним или более химиотерапевтическими средствами, CAR-T (Т-клетки с химерным антигенным рецептором) терапией, онколитической вирусной терапией, цитокиновой терапией и/или агентами, нацеленными на другие молекулы контрольных точек, таких как PD1, PD-L1, LAG3, TIM3, VISTA, gpNMB, B7H4, HHLA2, CD73, CTLA4, TIGIT и т.д.

[0563] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид или сконструированные клетки по настоящему изобретению используют в комбинации с другими противоопухолевыми средствами, такими как анти-HER-2 антитела, анти-CD20 антитела, антагонист рецептора идермального фактора роста (EGFR) (*например,* ингибитор тирозинкиназы), ингибитор HER1/EGFR (*например,* эрлотиниб (TARCEVA®), ингибиторы фактора роста тромбоцитов (*например,* GLEEVEC® (Иматиниб мезилат)), ингибитор COX-2 (*например,* целекоксиб), интерфероны, ингибиторы CTLA4 (*например,* анти-CTLA антитело ипилимумаб (YERVOY®)), ингибиторы PD-1 (*например,* анти-PD1 антитела, BMS-936558), ингибиторы PDL1 (*например,* анти-PDL1 антитела, MPDL3280A), ингибиторы PDL2 (*например,* анти-PDL2 антитела), цитокины, антагонисты (*например,* нейтрализующие антитела), которые связываются с одной или более из следующих мишеней ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-бета, BlyS, APRIL, BCMA, PD-1, PDL1, PDL2, CTLA4, или рецептор(рецепторы) VEGF, TRAIL/Apo2 и другие биоактивные и органические химические средства и т.д.

[0564] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид или сконструированные клетки, представленные в настоящей заявке, вводят одновременно с PD-1/PD-L1 терапией. Примеры PD-1/PD-L1 терапии включают ниволумаб (BMS); пидилизумаб (CureTech, CT-011), пембролизумаб (Merck); дурвалумаб (Medimmune/AstraZeneca); атезолизумаб (Genentech/Roche); авелумаб (Pfizer); AMP-224 (Amplimmune); BMS-936559; AMP-514 (Amplimmune); MDX-1105 (Merck); TSR-042 (Tesaro/AnaptysBio, ANB-011); STI-A1010 (Sorrento Therapeutics); STI-A1110 (Sorrento Therapeutics); и другие средства, которые направлены против белка 1 запрограммированной клеточной гибели (PD-1) или лиганда 1 запрограммированной клеточной гибели (PD-L1).

[0565] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид или сконструированные клетки по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с химиотерапевтическим средством. Примеры химиотерапевтических средств включают, но не ограничиваются этим, алкилирующие средства, такие как тиотепа и CYTOXAN® циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и

пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилоломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретамина оксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как ендииновые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма1I и калихеамицин омега11 (см., например, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); динемицин, включая динемицин A; бисфосфонаты, такие как клодронат, эсперамицин, а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые ендииновые антиобиотические хромофоры), аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабин, карминомицин, карцинофилин, хромомицин, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, АДРИАМИЦИН® доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин C, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; антиадренергические средства, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминолевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лосоксантрон; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK® полисахаридный комплекс (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-

трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно Т-2 токсин, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ара-С»); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, TAXOL® паклитаксел (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE®, не содержащий кремофора препарат паклитаксела, сконструированный с использованием альбумина (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), и TAXOTERE® доксетаксел (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France), хлоранбуцил, GEMZAR® гемцитабин, 6-тиогуанин, меркаптопурин, метотрексат, аналоги платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин, платину, этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; NAVELBINE® винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; иринотекан (Camptosar, CPT-11) (включая схему лечения иринотеканом с 5-FU и лейковорином); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; комбретастатин; лейковорин (VL); оксалиплатин, включая схему лечения оксалиплатином (FOLFOX); ингибиторы PKC-альфа, Raf, H-Ras, EGFR (например, эрлотиниб (TARCEVA®)) и VEGF-A, которые снижают пролиферацию клеток, и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных.

[0566] Дополнительные неограничивающие примеры химиотерапевтических средств включают антигормональные средства, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на рак, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (включая тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и FARESTON® торемифен; ингибиторы ароматазы, ингибирующие фермент ароматазу, регулирующий продукцию эстрогенов в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоглутетимид, MEGASE® мегестрола ацетат, AROMASIN® экземестан, формастан, фадрозол, RIVISOR® ворозол, FEMARA® летрозол и ARIMIDEX® анастрозол; и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; а также троксацитабин (1,3-диоксолановый цитозиновый нуклеозидный аналог); антисмысловые олигонуклеотиды, особенно те, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, участвующих в аберрантной клеточной пролиферации, таких как, например, PKC-альфа, Ralf и H-Ras; рибозимы, такие как ингибитор экспрессии VEGF (например, ANGIOZYME® рибозим) и ингибитор экспрессии HER2; вакцины, такие как генотерапевтические вакцины, например вакцина АЛЛОВЕКТИН®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; PROLEUKIN® (альдеслейкин) rIL-2; ингибитор топоизомеразы 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® агонист GnRH; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных.

[0567] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид и дополнительное средство сформулированы в виде одной терапевтической композиции, и

CD28-связывающий полипептид и дополнительное средство вводят одновременно. Альтернативно, CD28-связывающий полипептид или сконструированная клетка и дополнительное средство отделены друг от друга, например, каждый сформулирован в отдельную терапевтическую композицию, и CD28-связывающий полипептид или сконструированную клетку и дополнительное средство вводят одновременно, или CD28-связывающий полипептид или сконструированную клетку и дополнительное средство вводят в разные моменты времени во время курса лечения. Например, CD28-связывающий полипептид или сконструированную клетку вводят до введения дополнительного средства, CD28-связывающий полипептид или сконструированную клетку вводят после введения дополнительного средства, или CD28-связывающий полипептид или сконструированную клетку и дополнительное средство вводят чередующимся образом. CD28-связывающий полипептид и дополнительное средство можно вводить в разовых дозах или многократных дозах.

[0568] В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид или сконструированную клетку и дополнительное средство(средства) вводят одновременно. Например, CD28-связывающий полипептид и дополнительное средство(средства) могут быть сформулированы в одну композицию, или их можно вводить в виде двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления CD28-связывающий полипептид или сконструированную клетку и дополнительное средство(средства) вводят последовательно, или CD28-связывающий полипептид или сконструированную клетку и дополнительное средство вводят в разные моменты времени во время курса лечения.

VII. ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0569] Среди представленных вариантов осуществления:

1. CD28-связывающий полипептид, включающий по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197.

2. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 1, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает:

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ

ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ

ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; или

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197.

3. CD28-связывающий полипептид, включающий по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197.

4. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 3, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает:

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; или

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197.

5. CD28-связывающий полипептид, включающий по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где CD28 VHH домен включает:

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:186;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:187;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:188;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:213;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:214;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:215;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:216;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:217;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:218;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:219;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:220;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:221;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:222;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:223;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:224;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:225;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:226;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:227;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:228;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:229;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:230;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:231;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:232;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:233;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:234;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:235;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:236;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:237;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:238;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:239; или
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:280.

6. CD28-связывающий полипептид, включающий по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28 (CD28 VHH), где CD28 VHH домен включает:

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:186;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:187;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:188;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:213;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:214;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:215;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:216;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:217;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:218;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:219;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:221;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:222;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:223;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:224;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:225;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:226;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:227;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:228;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:229;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:230;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:231;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:232;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:233;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:234;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:235;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:236;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:237;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:238;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:239; или
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:280.

7. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-6, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280.

8. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-6, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280.

9. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 186, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:186, или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 186.

10. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов

осуществления 1-9, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191.

11. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 187, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:187, или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 187.

12. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8 и 11, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194.

13. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 188, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:188, или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 188.

14. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8 и 13, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197.

15. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, 13 и 14, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; или SEQ ID NO:

195, 212 и 197, соответственно.

16. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8 и 13, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197.

17. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, 13 и 16, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно.

18. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8 и 13-15, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-239 и 280.

19. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, 13-15 и 18, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239 и 280.

20. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, 13, 16 и 17, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280.

21. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, 13, 16, 17 и 20, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280.

22. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-21, где по меньшей мере одно sdAb представляет собой одно CD28 sdAb и/или CD28-связывающий полипептид является одновалентным для CD28.

23. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-21, где по меньшей мере одно sdAb представляет собой два, три или четыре CD28 sdAb, и/или CD28-связывающий полипептид является мультивалентным для CD28.

24. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-21 и 23, где по меньшей мере одно sdAb представляет собой два CD28 sdAb и/или CD28-связывающий полипептид является двухвалентным для CD28.

25. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24, где два CD28 sdAb являются одинаковыми CD28 sdAb.

26. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 25, где оба CD28 sdAb включают аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188.

27. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 25, где оба CD28 sdAb включают аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220.

28. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 25, где оба CD28 sdAb включают аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280.

29. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24, где два CD28 sdAb являются разными CD28 sdAb.

30. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 29, где одно из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, а другое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220.

31. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 29, где одно из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, а другое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280.

32. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 29, где одно из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220, а другое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280.

33. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-32, где CD28-связывающий полипептид включает Fc-область иммуноглобулина.

34. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 33, где Fc-область связана связывающим пептидом (LP) с по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb.

35. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 32 или вариантом осуществления 32, где по меньшей мере одно CD28 sdAb связано

связывающим пептидом (LP) с Fc-областью на N-конце Fc-области.

36. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 33-35, где LP представляет собой нерасщепляемый линкер.

37. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 33-36, где LP представляет собой пептид длиной примерно от 1 до 20 аминокислот.

38. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 33-37, где CD28-связывающий полипептид включает от N-конца к C-концу: (CD28 sdAb)-LP-Fc.

39. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 33-37, где CD28-связывающий полипептид включает от N-конца к C-концу: (CD28 sdAb)-LP-(CD28 sdAb)-LP-Fc.

40. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-39, который представляет собой димер.

41. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 38-40, где Fc-область представляет собой гомодимерную Fc-область.

42. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 38-41, где Fc-область включает последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 или 13, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 или 13.

43. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 38-42, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1.

44. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 38-43, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1, при этом необязательно Fc-область включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 8.

45. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 38-40, где Fc-область представляет собой гетеродимерную Fc-область.

46. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 38-45, где Fc-область демонстрирует эффекторную функцию.

47. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 38-45, где Fc-область включает полипептид, включающий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают эффекторную функцию и/или уменьшают связывание с эффекторной молекулой, выбранной из Fc-гамма рецептора или C1q.

48. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 47,

где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235.

49. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 47 или вариантом осуществления 48, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235, при этом необязательно Fc-область включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 9.

50. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-49, где CD28-связывающий полипептид включает один или более связывающих доменов, которые связываются с целевым антигеном, отличным от CD28.

51. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 50, где один или более связывающих доменов представляют собой одно или более однодоменных антител (sdAb), которые связываются с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA).

52. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-51, где CD28-связывающий полипептид включает фрагмент, который связывается с белком A.

53. CD28-связывающий полипептид, включающий от N-конца к C-концу:

один или более антигенсвязывающих доменов, включающих однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA);

по меньшей мере один CD28-связывающий домен, включающий sdAb, которое связывается с CD28; и

Fc-область.

54. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 51-54, где по меньшей мере одно из одного или более TAA sdAb соединено связывающим пептидом (LP) с по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb.

55. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 51-54, где CD28-связывающий полипептид включает от N-конца к C-концу: (TAA sdAb)-LP-(CD28 sdAb)-LP-Fc.

56. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 50-54, который представляет собой димер.

57. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 50-55, где Fc-область представляет собой гомодимерную Fc-область.

58. CD28-связывающий полипептид, включающий от N-конца к C-концу:

один или более антигенсвязывающих доменов, включающих однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA);

по меньшей мере один CD28-связывающий домен, который включает sdAb,

которое связывается с CD28; и

Fc-область,

где CD28-связывающий полипептид представляет собой димер, включающий гомодимерную Fc-область.

59. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 50-59, где Fc-область включает последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 или 13, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 или 13.

60. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 50-60, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1.

61. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 50-60, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1, при этом необязательно Fc-область включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8 или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 8.

62. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 50-55 и 57, где Fc-область представляет собой гетеродимерную Fc-область.

63. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 50-62, где Fc-область демонстрирует эффекторную функцию.

64. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 50-62, где Fc-область включает полипептид, включающий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают эффекторную функцию и/или уменьшают связывание с эффекторной молекулой, выбранной из Fc-гамма рецептора или C1q.

65. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 64, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235.

66. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 64 или вариантом осуществления 65, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235, при этом необязательно Fc-область включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 9.

67. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 51-66, где TAA выбран из группы, состоящей из: 1-92-LFA-3, 5T4, интегрина альфа-4, интегрина альфа-V, интегрина альфа4бета1, интегрина альфа4бета7,

AGR2, анти-Lewis-Y, рецептора апелина J, APRIL, B7-H3, B7-H4, BAFF, BTLA, комплемента C5, C-242, CA9, CA19-9, (Lewis a), карбоангидразы 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD137, CD138, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), КЛАУДИН-3, КЛАУДИН-4, cMet, коллагена, Cripto, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, рецептора эндотелина B (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, F белка RSV, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT-3, рецептора фолата альфа (FRальфа), GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, рецепторов GP IIb/IIIa, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HVEM, гиалуронидазы, ICOS, IFNальфа, IFNбета, IFNгамма, IgE, рецептора IgE (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12Rбета1, IL13, IL13R, IL13Ra2, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, рецептора акцессорного белка IL1 (IL1RAP), инсулинового рецептора, Jagged лигандов, Jagged 1, Jagged 2, KISS1-R, LAG-3, LIF-R, Lewis X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, мезотелина, MRP4, MUC1, муцина-16 (MUC16, CA-125), Na/K АТФазы, NGF, никастрина, рецепторов Notch, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFRальфа, PDGFRбета, PD-1, PD-L1, PD-L2, фосфатидил-серина, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, Siglec15, сфингозин 1 фосфата, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGFбета, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNFальфа, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, трансферрина, рецептора трансферрина, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2 и WISP-3.

68. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 51-67, где одно или более TAA sdAb представляет собой одно TAA sdAb и/или CD28-связывающий полипептид является одновалентным для TAA.

69. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 51-67, где одно или более TAA sdAb представляют собой два, три или четыре TAA sdAb, и/или CD28-связывающий полипептид является мультивалентным для одного или более TAA.

70. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 51-67 и 69, где одно или более TAA sdAb представляют собой два TAA sdAb и/или CD28-связывающий полипептид является двухвалентным для TAA.

71. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 70, где два TAA sdAb являются одинаковыми TAA sdAb.

72. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 70,

где два TAA sdAb являются разными TAA sdAb, которые связываются с одним и тем же TAA, необязательно которые связываются с разными эпитопами одного и того же TAA.

73. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 70, где два TAA sdAb являются разными TAA sdAb, которые связываются с разными TAA.

74. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 33-73, где CD28-связывающий полипептид включает связывающий пептид (LP) между по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb и Fc-областью.

75. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 33-74, где CD28-связывающий полипептид включает связывающий пептид (LP) между по меньшей мере одним из одного или более TAA sdAb и Fc-областью.

76. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 74 или вариантом осуществления 75, где LP представляет собой нерасщепляемый линкер.

77. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 74-76, где LP представляет собой пептид длиной примерно от 1 до 20 аминокислот.

78. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 74-77, где LP представляет собой или включает последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:1-7, 89, 90, 123-129, 244 или 249.

79. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 51-78, где по меньшей мере одно CD28 sdAb не способно, или по существу не способно, связываться или взаимодействовать с CD28, пока по меньшей мере одно из одного или более TAA sdAb не будет связано со своим TAA.

80. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 51-78, где по меньшей мере одно CD28 sdAb не способно, или по существу не способно, связываться или взаимодействовать с CD28, пока каждое из одного или более TAA sdAb не будет связано со своим TAA.

81. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-80, где CD-28 связывающий полипептид не включает CD3-связывающую область.

82. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 50-81, где CD28-связывающий полипептид включает CD3-связывающую область.

83. CD28-связывающий полипептид, включающий по меньшей мере одно CD28 sdAb и CD3-связывающую область.

84. CD28 связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 83, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную

последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197.

85. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 83 или вариантом осуществления 84, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает:

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; или

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197.

86. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 83, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает определяющую комплементарность

область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197.

87. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 83 или вариантом осуществления 86, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает:

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197; или

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197.

88. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-85, где по меньшей мере одно CD28 sdAb (CD288 VHH) включает:

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:186;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:187;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:188;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:213;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:214;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:215;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:216;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:217;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:218;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:219;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:220;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:221;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:222;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:223;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:224;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:225;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:226;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:227;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:228;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:229;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:230;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:231;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:232;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:233;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:234;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:235;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:236;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:237;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:238;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:239; или
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:280.

89. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83, 86 и 87, где по меньшей мере одно CD28 sdAb (CD28 VHH) включает:
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:186;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:187;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:188;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:213;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:214;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:215;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:216;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:217;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:218;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:219;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:221;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:222;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:223;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:224;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:225;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:226;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:227;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:228;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:229;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:230;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:231;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:232;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:233;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:234;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:235;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:236;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:237;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:238;
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:239; или
CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в VHH, представленном в SEQ ID NO:280.

90. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-85 и 88, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280.

91. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83, 86, 88 и 89, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186,

187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 и 280.

92. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-91, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 186, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:186, или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 186.

93. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-92, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191.

94. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-91, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 187, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:187, или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 187.

95. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-91 и 94, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194.

96. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-91, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 188, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:188, или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 188.

97. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-91 и вариантом осуществления 96, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197.

98. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов

осуществления 83-91, 96 и 97, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно.

99. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-91 и 96, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 и 212; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197.

100. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-91, 96 и 99, где где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно.

101. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-91 и 96-98, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-239 и 280.

102. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-91, 96-98 и 101, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239 и 280.

103. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-91, 96, 99 и 100, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность

последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280.

104. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-91, 96, 99, 100 и 103, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239 и 280.

105. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 82-104, где CD3-связывающая область связывается с CD3 (CD3ε).

106. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 82-105, где CD3-связывающая область представляет собой анти-CD3 антитело или анти-связывающий фрагмент.

107. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 106, где анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL).

108. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 82-107, где CD3-связывающая область является одновалентной.

109. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 82-108, где CD3-связывающая область представляет собой вариабельный фрагмент (Fv), включающий вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL).

110. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 82-108, где анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент не является одноцепочечным антителом, как вариант, не является одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv).

111. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 82-110, где CD28-связывающий полипептид включает Fc-область иммуноглобулина.

112. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 111, где CD28-связывающий полипептид представляет собой димер.

113. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 111 или вариантом осуществления 112, где Fc представляет собой гетеродимерную Fc, и VH и VL, которые составляют анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, связаны с противоположными полипептидами гетеродимерной Fc.

114. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 82-113, где CD3-связывающая область не способна, или по существу не способна, связываться или взаимодействовать с CD3, пока по меньшей мере одно из одного или более TAA sdAb не будет связано с TAA.

115. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 82-114, где CD3-связывающая область не способна, или по существу не способна, связываться или взаимодействовать с CD3, пока по меньшей мере одно из по

меньшей мере одного CD28 sdAb не будет связано с CD28.

116. Полинуклеотид(полинуклеотиды), кодирующий CD28-связывающую полипептидную конструкцию в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-115.

117. Полинуклеотид, включающий первую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую первый полипептид CD28-связывающего полипептида в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-115, и вторую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую второй полипептид мультиспецифической конструкции, где первая и вторая нуклеиновокислотные последовательности разделены внутренним сайтом входа в рибосому (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает пропуск рибосомы.

118. Полинуклеотид в соответствии с вариантом осуществления 117, где первая нуклеиновокислотная последовательность и вторая нуклеиновокислотная последовательность функционально связаны с одним и тем же промотором.

119. Полинуклеотид в соответствии с вариантом осуществления 118, где нуклеиновая кислота, кодирующая саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает пропуск рибосомы, выбрана из T2A, P2A, E2A и F2A.

120. Вектор, включающий полинуклеотид в соответствии с любым из вариантов осуществления 116-119.

121. Вектор в соответствии с вариантом осуществления 120, который представляет собой вектор экспрессии.

122. Вектор в соответствии с вариантом осуществления 120 или вариантом осуществления 121, который представляет собой вирусный вектор или эукариотический вектор, при этом необязательно эукариотический вектор представляет собой вектор млекопитающего.

123. Клетка, включающая полинуклеотид или полинуклеотиды в соответствии с любым из вариантов осуществления 116-119 или вектор или векторы в соответствии с любым из вариантов осуществления 120-122.

124. Клетка в соответствии с вариантом осуществления 123, где клетка представляет собой лимфоцит.

125. Клетка в соответствии с вариантом осуществления 123 или вариантом осуществления 124, где клетка представляет собой Т-клетку или природную киллерную (NK) клетку.

126. Способ получения полипептида, включающий введение в клетку полинуклеотида или полинуклеотидов в соответствии с любым из вариантов осуществления 116-119, или вектора или векторов в соответствии с любым из вариантов осуществления 120-122 и культивирование клетки в условиях для получения мультиспецифической полипептидной конструкции.

127. Способ в соответствии с вариантом осуществления 126, дополнительно включающий выделение и очистку полипептида из клетки.

128. Полипептид, полученный способом в соответствии с вариантом осуществления 126 или вариантом осуществления 127.

129. Фармацевтическая композиция, включающая CD28-связывающую полипептидную конструкцию в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-115.

130. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 129, включающая фармацевтически приемлемый носитель.

131. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 129 или вариантом осуществления 130, которая является стерильной.

132. Способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, CD28-связывающей полипептидной конструкции в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-115 или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления 129-131.

133. Способ в соответствии с вариантом осуществления 132, где иммунный ответ повышается против опухоли или рака.

134. Способ в соответствии с вариантом осуществления 132 или вариантом осуществления 133, где способ лечит заболевание или состояние у субъекта.

135. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества CD28-связывающей полипептидной конструкции в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-115 или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления 129-131.

136. Способ в соответствии с вариантом осуществления 134 или вариантом осуществления 135, где заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак.

137. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 132-136, где указанный субъект представляет собой человека.

[0570] Среди представленных вариантов осуществления также:

1. CD28-связывающий полипептид, включающий по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194, 197, 396, 397 и 398.

2. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 1, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает:

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:386, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

3. CD28-связывающий полипептид, включающий по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197, 396, 397 и 398.

4. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 3, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает:

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

5. CD28-связывающий полипептид, включающий по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере один CD28 sdAb (CD28 VHH) домен включает:

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:220; CDR1, CDR2 и CDR3,

содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:239; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:280; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:342; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:343; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:347; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351; CDR1, CDR2 и CDR3,

содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:353; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:354; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:356; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:360; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:362; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:370; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:373; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:377; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381; CDR1, CDR2 и CDR3,

содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:384; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

6. CD28-связывающий полипептид, включающий по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере один CD28 sdAb (CD28 VHH) домен включает:

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:234;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:239; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:280; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:342; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:343; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:347; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:353; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:354; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:356; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:360; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:362; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:370; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:373; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:377; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:384; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

7. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-6, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381,

382, 383, 384 и 385.

8. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-6, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385.

9. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 186, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO: 186, и/или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 186.

10. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-9, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 189; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 190; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 191.

11. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 187, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO: 187, и/или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 187.

12. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8 и 11, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 192; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 193; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 194.

13. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную

последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 188, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO: 188, и/или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 188.

14. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8 и 13, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:197, 396, 397 и 398.

15. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, 13 и 14, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 386 и 197, соответственно;SEQ ID NO: 201, 387 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 390 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 391 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 392 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 393 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 394 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 395 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 195, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 397, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 206 и 398, соответственно.

16. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8 и 13, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:197, 396, 397 и 398.

17. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, 13 и 16, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 386 и 197, соответственно;SEQ ID NO: 201, 387 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 390 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 391 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 392 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 393 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 394 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 395 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 195, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 397, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 206 и 398, соответственно.

18. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8 и 13-15, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385.

19. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, 13-15 и 18, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385.

20. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, 13, 16 и 17, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385.

21. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, 13, 16, 17 и 20, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385.

22. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-21, где по меньшей мере одно CD28 sdAb представляет собой одно CD28 sdAb и/или CD28-связывающий полипептид является одновалентным для CD28.

23. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-21, где по меньшей мере одно CD28 sdAb представляют собой два, три или четыре CD28 sdAb, и/или CD28-связывающий полипептид является мультивалентным для CD28.

24. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-21 и 23, где по меньшей мере одно CD28 sdAb представляют собой два CD28 sdAb и/или CD28-связывающий полипептид является двухвалентным для CD28.

25. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24, где два CD28 sdAb являются одинаковыми CD28 sdAb.

26. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 25, где каждое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188.

27. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 25, где каждое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220.

28. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 25, где каждое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280.

29. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24, где два CD28 sdAb являются разными CD28 sdAb.

30. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 29, где одно из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, а другое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220.

31. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 29, где одно из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, а другое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280.

32. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 29, где одно из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220, а другое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280.

33. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-32, где CD28-связывающий полипептид включает фрагмент, который связывается с белком A.

34. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-33, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную модификацию, которая уменьшает связывание с белком A.

35. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 34, где аминокислотная модификация представляет собой G65D, в соответствии с Kabat, в каркасной области 3 (FR3).

36. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc, включающий CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-35 и Fc-область иммуноглобулина.

37. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с вариантом осуществления 36, где Fc-область связана связывающим пептидом (LP) с по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb.

38. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с вариантом осуществления 36 или вариантом осуществления 37, где по меньшей мере одно CD28 sdAb связано связывающим пептидом (LP) с Fc-областью на N-конце Fc-области.

39. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с вариантом осуществления 37 или вариантом осуществления 38, где LP представляет собой нерасщепляемый линкер.

40. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 37-39, где LP представляет собой пептид длиной примерно от 1 до 20 аминокислот.

41. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 38-40, где CD28-связывающий полипептид включает от N-конца к C-концу: (CD28 sdAb)-LP-Fc.

42. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 37-40, где CD28-связывающий полипептид включает от N-конца к C-

концу: (CD28 sdAb)-LP-(CD28 sdAb)-LP-Fc.

43. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-42, который представляет собой димер.

44. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-43, где Fc-область представляет собой гомодимерную Fc-область.

45. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-44, где Fc-область включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13.

46. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-45, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1.

47. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-46, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1, при этом необязательно Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 8.

48. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-43, где Fc-область представляет собой гетеродимерную Fc-область.

49. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-48, где Fc-область демонстрирует эффекторную функцию.

50. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-48, где Fc-область включает полипептид, включающий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают эффекторную функцию и/или уменьшают связывание с эффекторной молекулой, выбранной из Fc-гамма рецептора и C1q.

51. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с вариантом осуществления 50, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235.

52. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с вариантом осуществления 50 или вариантом осуществления 51, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235, при этом необязательно Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 9.

53. Гомодимерный Fc-слитый белок, включающий две идентичные копии слитого белка анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 33-49.

54. Гетеродимерный слитый белок, включающий два из слитых белков анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 33-49.

55. Мультиспецифический связывающий полипептид, включающий слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-52 и один или более связывающих доменов (BD), которые связываются с целевым антигеном, отличным от CD28.

56. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 55, где один или более BD связываются с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA).

57. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 55, где один или более BD связываются с маркером Т-клеточной поверхности, который представляет собой маркер активации Т-клеток или маркер истощения Т-клеток.

58. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 55, где один или более BD связываются с маркером клеточной поверхности, который представляет собой маркер микроокружения опухоли.

59. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-58, где один или более BD, необязательно каждый из одного или более BD, представляет собой однодоменное антитело (sdAb).

60. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-59, где мультиспецифический связывающий полипептид представляет собой Fc-слитый белок, где по меньшей мере один из одного или более BD и/или по меньшей мере одно CD28 sdAb связаны с Fc-областью иммуноглобулина.

61. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 60, где Fc-слитый белок включает от N-конца к C-концу:

один или более BD;

по меньшей мере один CD28-связывающий домен, включающий sdAb, которое связывается с CD28; и

Fc-область.

62. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-61, где по меньшей мере один из одного или более BD соединен связывающим пептидом (LP) с по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb.

63. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-62, включающий от N-конца к C-концу: (BD)-LP-(CD28 sdAb)-LP-Fc.

64. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-63, который представляет собой димер.

65. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-64, где Fc-область представляет собой гомодимерную Fc-

область.

66 Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-65, где Fc-область включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13.

67. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-66, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1.

68. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-67, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1, при этом необязательно Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 8.

69. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-64 и 66-68, где Fc-область представляет собой гетеродимерную Fc-область.

70. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-69, где Fc-область демонстрирует эффекторную функцию.

71. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-69, где Fc-область включает полипептид, включающий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают эффекторную функцию и/или уменьшают связывание с эффекторной молекулой, выбранной из Fc-гамма рецептора и C1q.

72. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 71, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235.

73. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 71 или вариантом осуществления 72, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235, при этом необязательно Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 9.

74. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-73, где антиген, с которым связывается BD, выбран из группы, состоящей из: 1-92-LFA-3, 2B4, 5T4, интегрина альфа-4, интегрина альфа-V, интегрина альфа4бета1, интегрина альфа4бета7, альфа-SMA, AGR2, анти-Lewis-Y,

рецептора апелина J, APRIL, B7-H3, B7-H4, BAFF, BTLA, комплемента C5, C-242, CA9, CA19-9, (Lewis a), карбоангидразы 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD69, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD107a, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD137, CD138, CD160, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), КЛАУДИН-3, КЛАУДИН-4, cMet, коллагена, Cripto, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, рецептора эндотелина B (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, F белка RSV, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT-3, рецептора фолата альфа (FRальфа), FSP-1, GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, рецепторов GP IIb/IIIa, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HLA-DR, HVEM, гиалуронидазы, ICOS, IFNальфа, IFNбета, IFNгамма, IgE, рецептора IgE (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12Rбета1, IL13, IL13R, IL13Ra2, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, рецептора акцессорного белка IL1 (IL1RAP), инсулинового рецептора, Jagged лигандов, Jagged 1, Jagged 2, KISS1-R, KLRG1, LAG-3, LIF-R, Lewis X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, мезотелина, MRP4, MUC1, муцина-16 (MUC16, CA-125), Na/K АТФазы, NGF, никастрина, рецепторов Notch, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFRальфа, PDGFRбета, PD-1, PD-L1, PD-L2, фосфатидил-серина, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, Siglec15, сфингозин 1 фосфата, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGFбета, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNFальфа, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, трансферрина, рецептора трансферрина, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2 и WISP-3.

75. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-74, где один или более BD представляет собой один BD и/или мультиспецифический связывающий полипептид является одновалентным для антигена.

76. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-74, где один или более BD представляют собой два, три или четыре BD, и/или мультиспецифический связывающий полипептид является мультивалентным для одного или более антигенов.

77. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-74 и 76, где один или более BD представляют собой два BD и/или мультиспецифический связывающий полипептид является двухвалентным для одного или более антигенов.

78. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с вариантом

осуществления 77, где два BD являются однодоменными антителами (sdAb) и два sdAb являются одинаковыми sdAb.

79. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 77, где два BD являются однодоменными антителами (sdAb) и эти два sdAb являются разными sdAb, которые связываются с одним и тем же антигеном, необязательно которые связываются с разными эпитопами одного и того же антигена.

80. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 77, где два BD являются однодоменными антителами (sdAb) и эти два sdAb являются разными sdAb, которые связываются с разными антигенами.

81. Гомодимерный мультиспецифический Fc-слитый белок, включающий две идентичные копии мультиспецифического связывающего полипептида в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-80.

82. Гетеродимерный мультиспецифический Fc-слитый белок, включающий два из мультиспецифических связывающих полипептидов в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-80.

83. Мультиспецифический Fc-слитый белок в соответствии с вариантом осуществления 81 или вариантом осуществления 82, включающий связывающий пептид (LP) между по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb и Fc-областью.

84. Мультиспецифический Fc-слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 81-83, где CD28-связывающий полипептид включает связывающий пептид (LP) между по меньшей мере одним из одного или более BD и Fc-областью.

85. Мультиспецифический Fc-слитый белок в соответствии с вариантом осуществления 83 или вариантом осуществления 84, где LP представляет собой нерасщепляемый линкер.

86. Мультиспецифический Fc-слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-85, где LP представляет собой пептид длиной примерно от 1 до 20 аминокислот.

87. Мультиспецифический Fc-слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 83-86, где LP представляет собой или включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-7, 89, 90, 123-129, 244 и 249.

88. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-80 или мультиспецифический Fc-слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 81-87, где по меньшей мере одно CD28 sdAb не способно, или по существу не способно, связываться или взаимодействовать с CD28, пока по меньшей мере один из одного или более BD не будет связан со своим антигеном.

89. Мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-80 или мультиспецифический Fc-слитый белок в

соответствии с любым из вариантов осуществления 81-87, где по меньшей мере одно CD28 sdAb не способно, или по существу не способно, связываться или взаимодействовать с CD28, пока каждый из одного или более BD не будет связан со своим антигеном.

90. Анти-CD28 однодоменное антитело (sdAb), включающее: определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194, 197, 396, 397 и 398.

91. Анти-CD28 sdAb в соответствии с вариантом осуществления 90, включающее:

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

92. Анти-CD28 однодоменное антитело (sdAb), включающее: определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194, 197, 396, 397 и 398.

93. Анти-CD28 sdAb в соответствии с вариантом осуществления 92, где анти-CD28 sdAb включает:

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:194;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

94. Анти-CD28 однодоменное антитело (sdAb), включающее:

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной

последовательности, представленной в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:220; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:239; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:280; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной

последовательности, представленной в SEQ ID NO:342; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:343; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:347;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:353; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:354; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:356; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:360; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:362; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:370; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:373; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:377; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:384; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

95. Анти-CD28 однодоменное антитело (sdAb), включающее:

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:225;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:239; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:280; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:342; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:343; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:347; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:353; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:354; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:356;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:360; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:362; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:370; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:373; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:377; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:384; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

96. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-95,

где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385.

97. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-95, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385.

98. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-97, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 186, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:186 и/или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 186.

99. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-98, где анти-CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191.

100. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-97, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 187, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:187 и/или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность

последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 187.

101. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-97 и 100, где анти-CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194.

102. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-97, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 188, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:188 и/или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 188.

103. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-97 и 102, где анти-CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:197, 396, 397 и 398.

104. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-97, 102 и 103, где анти-CD28 sdAb включает CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 386 и 197, соответственно;SEQ ID NO: 201, 387 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 390 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 391 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 396, соответственно; SEQ ID

NO: 201, 392 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 393 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 394 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 395 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 195, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 397, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 206 и 398, соответственно.

105. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-97 и 102, где анти-CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:197, 396, 397 и 398.

106. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-07, 102 и 105, где анти-CD28 sdAb включает CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 386 и 197, соответственно;SEQ ID NO: 201, 387 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 390 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 391 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 392 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 393 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 394 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 395 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 195, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 397, соответственно; или SEQ

ID NO: 195, 206 и 398, соответственно.

107. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-97 и 102-104, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385.

108. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-97, 102-104 и 107, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385.

109. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-97, 102, 105 и 106, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385.

110. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-97, 102, 105, 106 и 109, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385.

111. Анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-110, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную модификацию, которая уменьшает связывание с белком A.

112. Анти-CD28 sdAb в соответствии с вариантом осуществления 111, где аминокислотная модификация представляет собой G65D, в соответствии с Kabat, в каркасной области 3 (FR3).

113. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-35; слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-54 и 81-89; мультиспецифический связывающий белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-80 и 88-89; или анти-CD28 однодоменное антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-112, которое не включает CD3-связывающую область.

114. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-35; слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-54 и 81-89; мультиспецифический связывающий белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-80 и 88-89; или анти-CD28 однодоменное антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-112, которое включает CD3-связывающую область.

115. Мультиспецифическая конструкция, включающая по меньшей мере одно анти-CD28 однодоменное антитело (sdAb) в соответствии с любым из вариантов

осуществления 90-112, один или более связывающих доменов (BD), которые связываются с антигеном, отличным от CD28, и CD3-связывающую область.

116. Мультиспецифическая конструкция в соответствии с вариантом осуществления 115, где BD связывается с TAA.

117. Мультиспецифическая конструкция в соответствии с вариантом осуществления 115 или вариантом осуществления 116, где BD представляет собой однодоменное антитело (sdAb).

118. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 114; слитый белок в соответствии с вариантом осуществления 114; мультиспецифический связывающий белок в соответствии с вариантом осуществления 114; анти-CD28 однодоменное антитело в соответствии с вариантом осуществления 114; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления 115-117, где CD3-связывающая область связывается с CD3 (CD3ε).

119. CD28-связывающий полипептид в соответствии с вариантом осуществления 114 или вариантом осуществления 118; слитый белок в соответствии с вариантом осуществления 114 или вариантом осуществления 118; мультиспецифический связывающий белок в соответствии с вариантом осуществления 114 или вариантом осуществления 118; анти-CD28 однодоменное антитело в соответствии с вариантом осуществления 114 или вариантом осуществления 118; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления 115-118, где CD3-связывающая область представляет собой анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

120. CD28-связывающий полипептид, слитый белок, мультиспецифический связывающий белок, анти-CD28 однодоменное антитело или мультиспецифическая конструкция в соответствии с вариантом осуществления 1 варианта осуществления 120, где анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL).

121. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-120; слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-120; мультиспецифический связывающий белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-120; анти-CD28 однодоменное антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-120; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления 115-120, где CD3-связывающая область является одновалентной.

122. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-121; слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-121; мультиспецифический связывающий белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-121; анти-CD28 однодоменное антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-121; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления

115-121, где CD3-связывающая область представляет собой вариабельный фрагмент (Fv), включающий вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL).

123. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-121; слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-121; мультиспецифический связывающий белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-121; анти-CD28 однодоменное антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-121; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления 115-121, где анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент не является одноцепочечным антителом, как вариант, не является одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv).

124. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-123; слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-123; мультиспецифический связывающий белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-123; анти-CD28 однодоменное антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-123; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления 115-123, где CD28-связывающий полипептид включает Fc-область иммуноглобулина.

125. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с вариантом осуществления 124, где Fc-область включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13.

126. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с вариантом осуществления 124 или вариантом осуществления 125, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1.

127. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления 124-126, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1, при этом необязательно Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 8.

128. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая

конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления 124-127, где Fc-область представляет собой гетеродимерную Fc-область.

129. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления 124-128, где Fc-область демонстрирует эффекторную функцию.

130. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления 124-128, где Fc-область включает полипептид, включающий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают эффекторную функцию и/или уменьшают связывание с эффекторной молекулой, выбранной из Fc-гамма рецептора и C1q.

131. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с вариантом осуществления 130, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235.

132. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с вариантом осуществления 130 или вариантом осуществления 131, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235, при этом необязательно Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 9.

133. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления 124-132, где CD28-связывающий полипептид представляет собой димер.

134. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления 124-133, где Fc представляет собой гетеродимерную Fc, и VH и VL, которые составляют анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, связаны с противоположными полипептидами гетеродимерной Fc.

135. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-134; слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-134; мультиспецифический связывающий белок в соответствии

с любым из вариантов осуществления 114 и 118-134; анти-CD28 однодоменное антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-134; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления 115-134, где CD3-связывающая область не способна, или по существу не способна, связываться или взаимодействовать с CD3, пока по меньшей мере один из одного или более BD не будет связан со своим антигеном.

136. CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-135; слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-135; мультиспецифический связывающий белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-135; анти-CD28 однодоменное антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 114 и 118-135; или мультиспецифическая конструкция в соответствии с любым из вариантов осуществления 115-135, где CD3-связывающая область не способна, или по существу не способна, связываться или взаимодействовать с CD3, пока по меньшей мере одно из по меньшей мере одного CD28 sdAb не будет связано с CD28.

137. Полинуклеотид(полинуклеотиды), кодирующий: CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-35 и 113-136; слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-42, 45-47, 49-52 и 113-136; мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-63, 66-68, 70-80, 88-89 и 113-136; или анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-136.

138. Полинуклеотид, включающий первую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую первый полипептид CD28-связывающего полипептида в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-35 и 113-136; слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-55, 81-89 и 113-136; или мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-80, 88-89 и 113-136, и вторую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую второй полипептид, где первая и вторая нуклеиновокислотные последовательности разделены внутренним сайтом входа в рибосому (IRES), или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает пропуск рибосомы.

139. Полинуклеотид в соответствии с вариантом осуществления 138, где первая нуклеиновокислотная последовательность и вторая нуклеиновокислотная последовательность функционально связаны с одним и тем же промотором.

140. Полинуклеотид в соответствии с вариантом осуществления 138 или вариантом осуществления 139, где нуклеиновая кислота, кодирующая саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает пропуск рибосомы, выбрана из T2A, P2A, E2A и F2A.

141. Вектор, включающий полинуклеотид в соответствии с любым из вариантов осуществления 137-140.

142. Вектор в соответствии с вариантом осуществления 141, который представляет

собой вектор экспрессии.

143. Вектор в соответствии с вариантом осуществления 141 или вариантом осуществления 142, который представляет собой вирусный вектор или эукариотический вектор, при этом необязательно эукариотический вектор представляет собой вектор млекопитающего.

144. Клетка, включающая полинуклеотид или полинуклеотиды в соответствии с любым из вариантов осуществления 137-140 или вектор или векторы в соответствии с любым из вариантов осуществления 141-143.

145. Клетка в соответствии с вариантом осуществления 144, где клетка представляет собой лимфоцит.

146. Клетка в соответствии с вариантом осуществления 144 или вариантом осуществления 145, где клетка представляет собой Т-клетку или природную киллерную (NK) клетку.

147. Способ получения полипептида, включающий введение в клетку полинуклеотида или полинуклеотидов в соответствии с любым из вариантов осуществления 137-140, или вектора или векторов в соответствии с любым из вариантов осуществления 141-143 и культивирование клетки в условиях для продуцирования полипептида.

148. Способ в соответствии с вариантом осуществления 147, дополнительно включающий выделение и очистку полипептида из клетки.

149. Полипептид, полученный способом в соответствии с вариантом осуществления 147 или вариантом осуществления 148.

150. Фармацевтическая композиция, включающая CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-35 и 113-136; слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-55, 81-89 и 113-136; мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-80, 88-89 и 113-136; или анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-136.

151. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 150, включающая фармацевтически приемлемый носитель.

152. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 150 или вариантом осуществления 151, которая является стерильной.

153. Способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, CD28-связывающего полипептида в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-35 и 113-136; слитого белка в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-55, 81-89 и 113-136; мультиспецифического связывающего полипептида в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-80, 88-89 и 113-136; анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-136; или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления 150-152.

154. Способ в соответствии с вариантом осуществления 153, где иммунный ответ повышается против опухоли или рака.

155. Способ в соответствии с вариантом осуществления 153 или вариантом осуществления 154, где способ лечит заболевание или состояние у субъекта.

156. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества CD28-связывающего полипептида в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-35 и 113-136; слитого белка в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-55, 81-89 и 113-136; мультиспецифического связывающего полипептида в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-80, 88-89 и 113-136; анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-136; или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления 150-152.

157. Применение CD28-связывающего полипептида в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-35 и 113-136; слитого белка в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-55, 81-89 и 113-136; мультиспецифического связывающего полипептида в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-80, 88-89 и 113-136; анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-136; или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления 150-152.

158. Композиция, включающая CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-35 и 113-136; слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-55, 81-89 и 113-136; мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-80, 88-89 и 113-136; или анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-136; или фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 150-152 для применения лечении заболевания или состояния у субъекта.

159. Композиция, включающая CD28-связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-35 и 113-136; слитый белок в соответствии с любым из вариантов осуществления 36-55, 81-89 и 113-136; мультиспецифический связывающий полипептид в соответствии с любым из вариантов осуществления 55-80, 88-89 и 113-136; или анти-CD28 sdAb в соответствии с любым из вариантов осуществления 90-136; или фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 150-152 для применения для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния у субъекта.

160. Способ в соответствии с вариантом осуществления 155 или вариантом осуществления 156, применение в соответствии с вариантом осуществления 157 или композиция в соответствии с вариантом осуществления 158 или вариантом осуществления 159, где заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак.

161. Способ в соответствии с вариантом осуществления 155 или вариантом осуществления 156, применение в соответствии с вариантом осуществления 157 или

композиция в соответствии с вариантом осуществления 158 или вариантом осуществления 159, где субъект представляет собой человека.

VIII. ПРИМЕРЫ

[0571] Следующие примеры включены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1: Получение CD28 sdAbs

[0572] Однодоменное антитело, нацеленное на человеческий CD28, получали путем иммунизации лам и альпаков. Лам и альпаков иммунизировали рекомбинантным вариантом внеклеточного домена человеческого CD28 (ECD; аминокислоты 19-152 человеческого CD28, представленного в SEQ ID NO:86, например, UniProt No. P10747), который представлен ниже:

NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGN YSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQNLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSN GTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP

[0573] После появления титров специфических анти-CD28 антител мононуклеарные клетки периферической крови ламы/альпака (PBMC) выделяли из 500 мл крови иммунизированного животного, а общую мРНК выделяли с использованием набора Qiagen RNeasy® Maxi Kit и затем преобразовывали в первую цепь кДНК с использованием обратной транскриптазы Thermo SuperScript™ IV и праймирования олиго-dT. Иллюстративную последовательность однодоменного антитела (sdAb; также называется VHH) специфически амплифицировали при помощи ПЦР с использованием кДНК в качестве матрицы и клонировали в вектор дрожжевого поверхностного дисплея в виде слитого белка sdAb-Fc-AGA2. Fc представлял собой Fc IgG1 человека (hFc; представлен в SEQ ID NO:8) или, в некоторых случаях, его вариант со сниженной эффекторной функцией (Fc xELL; представлен в SEQ ID NO:9).

[0574] Дрожжевые библиотеки, экспонирующие sdAb, были обогащены с использованием рекомбинантных форм CD28 посредством выделения с использованием магнитных шариков с последующей сортировкой клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Отсортированные дрожжи высевали на чашки, изолированные колонии собирали в 96-луночные блоки и выращивали в среде, которая переключала экспрессию с экспонированного на поверхности sdAb-Fc на секрецию в среду. Супернатанты из 96-луночных культур секреции в дрожжах наносили на CD28-положительные и отрицательные клетки. Клетки промывали, обрабатывали флуорофор-меченным вторичным антителом к Fc человека и анализировали с использованием проточной цитометрии в 96-луночном формате.

[0575] Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую sdAb, которая связывалась с CD28-положительными клетками, но не с CD28-отрицательными клетками, клонировали в рамке считывания с областью, кодирующей Fc человека, в вектор экспрессии млекопитающих и экспрессировали путем транзиентной трансфекции в клетках HEK293 freestyle (293FS) или клетках CHO с использованием полиэтиленимина.

Через 3-7 дней собирали супернатант, секретируемый рекомбинантный белок очищали хроматографией на белке А и рассчитывали концентрацию по поглощению при 280 нм и коэффициенту экстинкции.

[0576] Методом скрининга было идентифицировано несколько sdAb. На основании дополнительных скрининговых анализов были идентифицированы выбранные клоны, которые не стимулировали или не были агонистами CD28 в моноспецифических форматах, двухвалентных для CD28 (см., например, Пример 5A). Примеры идентифицированных sdAb представлены в **Таблице E1**.

Таблица E1

CD28 sdAb

Название клона	**CDR1**	**SEQ ID NO**	**CDR2**	**SEQ ID NO**	**CDR3**	**SEQ ID NO**	**VHH SEQ ID NO**
1G7	RTIGLISLMG	189	TIIASGRTN	190	NAETAP WSRRGF	191	186
2F11	GISFNVVDMD	192	GITRGGAT Y	193	RWPSRY QNY	194	187
1C9	GRMFSNYAMG	195	AINYRRDS AD	196	TYAGW ASSRRD DYNY	197	188

Пример 2: Определение связывания sdAb с CD28-экспрессирующими клетками методом проточной цитометрии

[0577] Специфичность, относительную аффинность и перекрестную реактивность у cynomolgus идентифицированных и очищенных CD28 sdAb (включая те, которые выбраны и описаны в Таблице E1), сформатированных с человеческим IgG1 (hFc; например SEQ ID NO:8), оценивали методом проточной цитометрии с использованием клеток, экспрессирующих CD28. HEK293FS, транзиентно трансфицированные полноразмерным человеческим CD28 или CD28 cynomolgus, использовали в качестве CD28-положительных клеток. Нетрансфицированные HEK293FS клетки использовали в качестве CD28-отрицательных клеток. Клетки высевали в 96-луночные круглодонные планшеты при 3×10^3 клеток/лунка в FACS буфере. Титрование иллюстративных образованных sdAb-hFc осуществляли на клетках и аналитические планшеты инкубировали в течение 30 минут при 4°C. Клетки промывали два раза FACS буфером и затем ресуспендировали в разбавленном Alexa Fluor 647-конъюгированном античеловеческом вторичном IgG антителе (1:2000 в FACS буфере). Аналитические планшеты инкубировали в течение 30 минут при 4°C и затем клетки промывали два раза FACS буфером и ресуспендировали в FACS буфере для анализа с использованием Intellicyt iQue®.

[0578] Фиг. 1A-1C представляют результаты для иллюстративных образованных CD28 sdAb-hFc. Все испытанные sdAb показали специфическое связывание с CD28-экспрессирующими клетками и перекрестную реактивность с CD28 cynomolgus.

[0579] Иллюстративное CD28 sdAb 1C9 также было сформатировано с вариантом человеческого IgG1 Fc, имеющим пониженную эффекторную функцию (Fc xELL; например, SEQ ID NO:9), и испытано на связывание с клеточной линией Jurkat T-лимфоцитов человека и первичными Т-клетками, полученными из PBMC. Как показано на Фиг. 1D-E, 1C9-xELL связывал клетки, которые эндогенно экспрессировали CD28 с однозначной наномолярной аффинностью.

Пример 3: Гуманизация иллюстративных CD28 sdAb верблюдовых

[0580] Иллюстративное CD28 sdAb 1C9 верблюдовых (SEQ ID NO:188) было гуманизировано с использованием человеческого VH3-23 зародышевой линии в качестве каркаса. Происходящие от верблюдовых остатки, которые способствуют растворимости, специфичности, стабильности и/или аффинности, оставались немодифицированными. Кроме того, все гуманизированные варианты содержали модификацию Leu11Glu (L11E) и карбокси-концевые модификации Ser112Lys (S112K) и Ser113Pro (S113P), поскольку известно, что они препятствуют или уменьшают распознавание предсуществующих античеловеческих sdAb антител (ASDA), направленных на sdAbs (как описано в US20160207981). В некоторых случаях гуманизированные варианты содержали G73D аминокислотную мутацию (например, 1C9v8D).

[0581] Таблица E2 представляет иллюстративные гуманизированные варианты CD28 sdAb 1C9.

Таблица E2

Гуманизированные варианты CD28 sdAb

Название клона	**CDR1**	**SEQ ID NO**	**CDR2**	**SEQ ID NO**	**CDR3**	**SEQ ID NO**	**VHH SEQ ID NO**
Гуманизированные варианты 1C9							
hz1C9v1	GRMFSNYAMG	195	AINYRRDSAD	196	TYAGWASSRRDDYNY	197	213
hz1C9v2	GRMFSNYAMG	195	AINYRRDSAD	196	TYAGWASSRRDDYNY	197	214
hz1C9v3	GRMFSNYAMG	195	AINYRRDSAD	196	TYAGWASSRRDDYNY	197	215
hz1C9v4	GRMFSNYAMG	195	AINYRRDSAD	196	TYAGWASSRRDDYNY	197	216
hz1C9v5	GRIFSNY	198	AINYRR	196	TYAGWASS	197	217

	AMG		DSAD		RRDDYNY		
hz1C9v6	GRLFSN YAMG	199	AINYRR DSAD	196	TYAGWASS RRDDYNY	197	218
hz1C9v7	GRMFSN YAMG	195	AINYRR ESAD	202	TYAGWASS RRDDYNY	197	219
hz1C9v7.1	GFTFSN YAMG	201	AINYRR ESAD	202	TYAGWASS RRDDYNY	197	358
hz1C9v7.2	GFTFSN YAMG	201	AINYRR ESAD	202	TYAGWASS RRDDYDY	396	359
hz1C9v7.3	GFTFSN YAMG	201	AINYRR ESAD	202	TYAGWASS RRDDYNY	197	360
hz1C9v7.5	GFTFSN YAMG	201	AINYGR ESAD	386	TYAGWASS RRDDYNY	197	361
hz1C9v7.6	GFTFSN YAMG	201	AINYRG ESAD	387	TYAGWASS RRDDYNY	197	362
hz1C9v7.7	GFTFSN YAMG	201	AINYRR ESAD	202	TYAGWASS GRDDYNY	397	363
hz1C9v7.8	GFTFSN YAMG	201	AINYRR ESAD	202	TYAGWASS RGDDYNY	398	364
hz1C9v7.9	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	365
hz1C9v7.10	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYDY	396	366
hz1C9v7.11	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	367
hz1C9v7.12	GFTFSN YAMG	201	AINYGR DDAD	388	TYAGWASS RRDDYNY	197	368
hz1C9v7.13	GFTFSN YAMG	201	AINYRG DDAD	389	TYAGWASS RRDDYNY	197	369
hz1C9v7.14	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS GRDDYNY	397	370
hz1C9v7.15	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RGDDYNY	398	371
hz1C9v7.16	GFTFSN	201	AINYRR	203	TYAGWASS	197	372

	YAMG		DAAD		RRDDYNY		
hz1C9v7.17	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DAAD	203	TYAGWASS RRDDYDY	396	373
hz1C9v7.18	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DAAD	203	TYAGWASS RRDDYNY	197	374
hz1C9v7.19	GFTFSN YAMG	201	AINYGR DAAD	390	TYAGWASS RRDDYNY	197	375
hz1C9v7.20	GFTFSN YAMG	201	AINYRG DAAD	391	TYAGWASS RRDDYNY	197	376
hz1C9v7.21	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DAAD	203	TYAGWASS GRDDYNY	397	377
hz1C9v7.22	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DAAD	203	TYAGWASS RGDDYNY	398	378
hz1C9v7.23	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DTAD	204	TYAGWASS RRDDYNY	197	379
hz1C9v7.24	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DTAD	204	TYAGWASS RRDDYDY	396	380
hz1C9v7.25	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DTAD	204	TYAGWASS RRDDYNY	197	381
hz1C9v7.26	GFTFSN YAMG	201	AINYGR DTAD	392	TYAGWASS RRDDYNY	197	382
hz1C9v7.27	GFTFSN YAMG	201	AINYRG DTAD	393	TYAGWASS RRDDYNY	197	383
hz1C9v7.28	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DTAD	204	TYAGWASS GRDDYNY	397	384
hz1C9v7.29	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DTAD	204	TYAGWASS RGDDYNY	398	385
hz1C9v8	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DAAD	203	TYAGWASS RRDDYNY	197	220
hz1C9v8D	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DAAD	203	TYAGWASS RRDDYNY	197	280
hz1C9v9	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DTAD	204	TYAGWASS RRDDYNY	197	221
hz1C9v10	GRTFSN	200	AINYRR	196	TYAGWASS	197	222

	YAMG		DSAD		RRDDYNY		
hz1C9v11	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DSAD	196	TYAGWASS RRDDYNY	197	223
hz1C9v11.1	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DSAD	196	TYAGWASS RRDDYNY	197	351
hz1C9v11.2	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DSAD	196	TYAGWASS RRDDYDY	396	352
hz1C9v11.3	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DSAD	196	TYAGWASS RRDDYNY	197	353
hz1C9v11.4	GFTFSN YAMG	201	AINYGR DSAD	394	TYAGWASS RRDDYNY	197	354
hz1C9v11.5	GFTFSN YAMG	201	AINYRG DSAD	395	TYAGWASS RRDDYNY	197	355
hz1C9v11.6	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DSAD	196	TYAGWASS GRDDYNY	397	356
hz1C9v11.7	GFTFSN YAMG	201	AINYRR DSAD	196	TYAGWASS RGDDYNY	398	357
hz1C9v12	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DVAD	205	TYAGWASS RRDDYNY	197	224
hz1C9v13	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	225
hz1C9v13.1	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	342
hz1C9v13.2	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYDY	396	343
hz1C9v13.3	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	344
hz1C9v13.4	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	345
hz1C9v13.5	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYDY	396	346
hz1C9v13.6	GRMFSN YAMG	195	AINYGR DDAD	388	TYAGWASS RRDDYNY	197	347
hz1C9v13.7	GRMFSN	195	AINYRG	389	TYAGWASS	197	348

	YAMG		DDAD		RRDDYNY		
hz1C9v13.8	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS GRDDYNY	397	349
hz1C9v13.9	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RGDDYNY	398	350
hz1C9v14	GRMFSN YAMG	195	AINYRRS DAD	207	TYAGWASS RRDDYNY	197	226
hz1C9v15	GRMFSN YAMG	195	AINYRR TCAD	208	TYAGWASS RRDDYNY	197	227
hz1C9v16	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	228
hz1C9v17	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	229
hz1C9v18	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAA	209	TYAGWASS RRDDYNY	197	230
hz1C9v19	GRMFSN YAMG	195	AINYRRS SAD	210	TYAGWASS RRDDYNY	197	231
hz1C9v20	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDTD	211	TYAGWASS RRDDYNY	197	232
hz1C9v21	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DEAD	212	TYAGWASS RRDDYNY	197	233
hz1C9v22	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	234
hz1C9v23	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	235
hz1C9v24	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	236
hz1C9v25	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	237
hz1C9v26	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	238
hz1C9v27	GRMFSN YAMG	195	AINYRR DDAD	206	TYAGWASS RRDDYNY	197	239

[0582] Гуманизированные варианты CD28 sdAb 1C9 испытывали на их способность

связывать CD28-экспрессирующие клетки, и связывание сравнивали с исходным 1C9 sdAb. Связывание CD28-sdAb-Fc слитых белков оценивали методом проточной цитометрии с использованием не экспрессирующей CD28 клеточной линии (293FS), 293FS клеток, транзиентно трансфицированных полноразмерным CD28 человека (hCD28-293FS) или cynomolgus (cyCD28-293FS), CD28+ Jurkat клеточной линии или первичных человеческих Т-клеток, выделенных из цельной крови здорового донора. Серию титрований слитого белка инкубировали с различными клеточными линиями (3×10^3 клеток/лунка в 96-луночных круглодонных планшетах) в течение 30 минут при 4°C в FACS буфере (PBS 1% BSA, 0,1% NaN3 pH 7,4) в 96-луночных планшетах. После двух промывок FACS буфером клетки ресуспендировали в разбавленном Alexa Fluor 647-конъюгированном античеловеческом вторичном IgG антителе (1:2000 в FACS буфере) и клетки инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После двух дополнительных промывок в FACS буфере осуществляли детекцию связанного антитела методом проточной цитометрии (Intellicyt iQue®).

[0583] Фиг. 2A-2I представляют результаты для гуманизированных вариантов иллюстративного CD28 sdAb 1C9. Все испытанные гуманизированные варианты связывались как с человеческим CD28, так и с CD28 cynomolgus.

Пример 4: Получение и испытание CD28-нацеленных конструкций

[0584] Были получены иллюстративные CD28-связывающие конструкции, содержащие иллюстративное CD28 sdAb, описанное выше, например 1C9 (SEQ ID NO:188), 1C9v8 (SEQ ID NO:220) или 1C9v8D (SEQ ID NO:280). В некоторых случаях были получены различные конструкции, которые были моноспецифическими в отношении CD28. В других случаях конструкции были сконструированы как мультиспецифические и дополнительно содержали по меньшей мере один домен, связывающий опухоль-ассоциированный антиген (TAA) TAA. Например, по меньшей мере один TAA-связывающий домен может связывать PDL1 (например, CDR1, CDR2, CDR3, представленные в SEQ ID NO:100, 101 и 102, соответственно; например представленный в SEQ ID NO:99) или 5T4 (например, CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 241, 242 и 243, соответственно; или 246, 247 и 248, соответственно, например представленный в SEQ ID NO:240 или 245, соответственно). Мультиспецифические конструкции, как правило, содержали линкер, разделяющий CD28 sdAb и TAA-связывающий домен (например, sdAb). В этих конструкциях полипептидная цепь, как правило, включала, в следующем порядке от N-конца к C-концу, одно или более TAA sdAb, линкер и одно или более CD28 sdAb. В некоторых случаях конструкции были образованы с иллюстративным линкером GGSGGS (SEQ ID NO:1), GGSGGGGS (SEQ ID NO:89) или GGGSGS (SEQ ID NO:90). В качестве контролей также были образованы моноспецифические конструкции, содержащие только TAA sdAb.

[0585] Кроме того, были образованы конструкции, которые были либо одновалентными, либо двухвалентными для CD28. Также среди биспецифических конструкций, которые содержали по меньшей мере одно TAA sdAb, были образованы

конструкции, являющиеся двухвалентными для TAA.

[0586] В некоторых случаях были получены мультивалентные форматы, содержащие Fc домен, приводя, таким образом, к образованию димеров, включающих либо гомодимерный, либо гетеродимерный Fc домен. Fc домен был сконструирован как вариант, имеющий пониженную эффекторную функцию (xELL).

[0587] Иллюстративные полученные конструкции представлены в **Таблице E3**. Для получения иллюстративных конструкций были получены полинуклеотиды, кодирующие полипептидную цепь, и клонированы в плазмиду для экспрессии. Плазмиду, кодирующую полипептидную цепь(цепи), транзиентно трансфицировали в клетки млекопитающего (либо HEK293, либо CHO) с использованием полиэтиленимина. Для конструкций с гетеродимерными Fc доменами отдельные плазмиды, кодирующие каждую цепь гетеродимерного CD28-связывающего белка, транзиентно трансфицировали в эквимолярных количествах в клетки млекопитающих (либо HEK293, либо CHO) с использованием полиэтиленимина. Супернатант собирали через 3-7 дней и секретированный рекомбинантный белок очищали хроматографией с белком A, а затем препаративной эксклюзионной хроматографией (SEC) или проточной хроматографией гидрофобного взаимодействия (HIC). Гетеродимерный белок селективно очищали благодаря мутации, предусмотренной в одной цепи гетеродимерного Fc в положении I253R или H435R (обычно впадина-Fc) так, чтобы он не связывался с белком A. Второй этап хроматографии на SEC (AKTA со смолой Superdex-200) или FT-HIC (AKTA с бутил/фенилсефарозой) использовали для удаления нежелательных перекрестно-спаренных видов, содержащих два гетеродимерных Fc, которые были более гидрофобны и в два раза превышали ожидаемую молекулярную массу. Способ позволял получать гетеродимерные мультиспецифические полипептидные конструкции, содержащие правильно спаренные виды гетеродимеров. Очищенный гетеродимерный CD28-связывающий белок был стабилен и не накапливал перекрестно-спаренные виды при длительной инкубации при 4°C или повышенной концентрации белка.

[0588] В некоторых случаях иллюстративные конструкции без Fc доменов (например, cx8390 и cx8394) были сконструированы таким образом, чтобы они содержали домен, который связывается с белком A (PA), для облегчения очистки.

[0589] Полученные конструкции из числа тех, которые показаны на Фиг. 3A и 3B и в **Таблице E3**.

Таблица E3

CD28-нацеленные конструкции

Конструкция	**Цепь**	**N-концевой sdAb** TAA (SEQ ID NO)	**Линкер** (SEQ ID NO)	**CD28 sdAb** (SEQ ID NO)	**Fc** (SEQ ID NO)

cx8394 (моноспецифическая)	1	PA	GGGSGS (90)	1C9v8D (280)	-
cx8390 (биспецифическая)	1	5T4, 5T4, PA (240, 245)	GGGSGS (90)	1C9v8D (280)	-
cx8370 (биспецифическая)	1	PDL1 (99)	GGSGGS (1)	1C9 (188)	xELL (9)
	2	PDL1 (99)	GGSGGS (1)	1C9 (188)	xELL (9)
cx694 (биспецифическая)	1	PDL1 (99)	GGSGGGGS (89)	1C9 (188)	xELL (9)
	2	PDL1 (99)	GGSGGGGS (89)	1C9 (188)	xELL (9)
cx984 (моноспецифическая)	1	-	-	1C9 (188)	xELL (9)
	2	-	-	1C9 (188)	xELL (9)
cx698 (моноспецифическая)	1	-	-	1C9, 1C9 (188, 188)	xELL knob (109)
	2	-	-	1C9, 1C9 (188, 188)	xELL hole (110)
cx1204 (моноспецифическая)	1	PDL1 (99)	-	-	xELL (9)
	2	PDL1 (99)	-	-	xELL (9)

[0590] Иллюстративные полученные конструкции испытывали на их способность связываться с клетками, экспрессирующими CD28, PDL1 и/или 5T4. Связывание иллюстративных полученных конструкций оценивали, по существу как описано в Примере 3, за исключением того, что сравнивали с использованием CD28-293FS клеток, транзиентно трансфицированных PDL1 (PDL1-293FS), 5T4+/CD28- клеточной линии (T47D), 5T4-/PDL1-/CD28+ клеточной линии (Jurkat) или 5T4-/PDL1-/CD28- клеточной линии (Raji).

[0591] Фиг. 3C-3H представляют результаты иллюстративных полученных CD28-нацеленных конструкций. Как показано на Фиг. **3C**, каждая из иллюстративных

конструкций, сконструированных для связывания PDL1 в двухвалентном формате (cx694, cx8370 и cx1204), связывалась с клетками, экспрессирующими PDL1, дозозависимым образом. Как показано на Фиг. **3D**, иллюстративные конструкции, моноспецифические в отношении CD28, cx984 и cx698, связывались с CD28-экспрессирующими клетками Jurkat, тогда как иллюстративные конструкции, биспецифические в отношении CD28 и PDL1 (cx694 и cx8370), были не способны связываться с CD28-экспрессирующими клетками в отсутствие PDL1. Как показано на Фиг. **3F**, иллюстративная конструкция, сформатированная в двухвалентном 5T4-связывающем формате (cx8390), связывалась с T47D клетками, тогда как конструкция, сформатированная без 5T4 sdAbs (cx8394), была не способна связывать T47D клетки. Ни одна из конструкций не могла связывать Jurkat клетки, что согласуется с наблюдением, что связывание CD28 sdAb в cx8390 обусловлено связыванием 5T4 sdAb с 5T4 (Фиг. **3G**). Ни одна из иллюстративных конструкций не была способна связывать Raji клетки, которые служили в качестве отрицательного контроля (Фиг. **3E и 3H**).

Пример 5: Активация клеток, продуцирующих репортерную люциферазу под управлением IL-2 промотора, CD28-нацеленными конструкциями

A. CD28-нацеленные моноспецифические конструкции

[0592] CD28 агонизм, проявляемый моноспецифическими CD28-нацеленными конструкциями, оценивали с использованием репортерной клеточной линии на основе Jurkat (Promega™), сконструированной для продукции люциферазы, управляемой промотором IL-2. Активация CD3 на репортерных клетках приводит к продукции люциферазы, которая может быть усилена одновременным CD28 агонизмом.

[0593] CD28 sdAb, идентифицированные как 1G7 и 1C9 в Примере 1, а также дополнительные иллюстративные CD28 sdAb (1C12, 1F10, 2F12) форматировали как двухвалентные CD28 моноспецифические конструкции с Fc-доменом IgG1 человека. Репортерные клетки CD3 (IL-2) высевали в лунки 96-луночного планшета при 10^5 клеток/лунка. Репрезентативные двухвалентные sdAb-hFc конструкции либо инкубировали с антителом к человеческому Fc в молярном соотношении 1:3 в течение 10 минут при комнатной температуре, либо инкубировали отдельно в тех же условиях. Затем бивалентные конструкции титровали на репортерных клетках вместе с анти-CD3-активирующим клоном OKT3 при фиксированной концентрации 1 мкг/мл. Аналитические планшеты инкубировали в течение 6 часов при 37°C, а затем уравновешивали до комнатной температуры. Во все лунки добавляли реагент Bio-Glo™ и измеряли люминесценцию с использованием SpectraMax® L.

[0594] Как показано на Фиг. 4A, бивалентные форматы sdAb 1C12 и 1F10, но не 2F12, 1G7 и 1C9, были способны усиливать активацию репортера при помощи OKT3 и, следовательно, проявлять агонизм в отношении CD28. В то время как однодоменные антитела 2F12, 1G7 и 1C9 не проявляют агонизм в отношении CD28 при форматировании в виде двухвалентного sdAb-IgG1, при поперечном сшивании с использованием анти-Fc-антитела (XL) для получения конструкций с валентностью более высокого порядка все

три клона были способны усиливать активацию репортера посредством OKT3, при этом поперечно сшитый 1C9 проявлял наибольшую активацию (Фиг. 4B). Эти результаты привели к отбору клонов sdAb 1G7, 2F11 и 1C9, как описано в Примере 1.

B. CD28-нацеленные биспецифические конструкции

[0595] Агонизм в отношении CD28 биспецифических конструкций, нацеленных на CD28 и опухоль-ассоциированный антиген (TAA), как описано в Примере 4, оценивали с использованием репортерной клеточной линии на основе Jurkat (Promega™), сконструированной для продукции люциферазы, управляемой промотором IL-2. Активация CD3 на репортерных клетках приводит к продукции люциферазы, которая может быть усилена одновременным агонизмом в отношении CD28.

[0596] Для оценки PDL1-зависимого агонизма в отношении CD28, проявляемого иллюстративной биспецифической конструкцией PDL1xCD28 в бивалентном формате, репортерные клетки CD3 (IL-2) Jurkat высевали в лунки 96-луночного планшета при 5×10^4 клеток/лунка, с или без равного количества клеток PDL1-CHO-K1 (Promega™). Последняя клеточная линия была сконструирована так, чтобы экспрессировать не только PDL1, но и белок клеточной поверхности, который активирует Т-клеточный рецептор (TCR) антиген-зависимым образом. Таким образом, совместное культивирование клеток PDL1-CHO-K1 и репортерных клеток CD3 (IL-2) Jurkat приводило к низкому уровню активации репортерных клеток, который может быть усилен добавлением CD28-агонистического антитела. Добавляли иллюстративные конструкции и аналитические планшеты инкубировали в течение 6 часов при 37°C, а затем уравновешивали до комнатной температуры. Во все лунки добавляли реагент Bio-Glo™ и измеряли люминесценцию с использованием SpectraMax® L.

[0597] Как показано на Фиг. 4C, биспецифический белок PDL1xCD28 (cx694) проявлял агонизм в отношении CD28 на репортерной клеточной линии CD3 (IL-2) Jurkat PDL1-зависимым образом, о чем свидетельствует усиление активации репортерных клеток в присутствии, но не в отсутствие PDL1+ клеток. Моноспецифические конструкции, индивидуально нацеленные на PDL1 (cx1204) или CD28 (cx698), не увеличивали активацию репортерных клеток по сравнению с необработанным контролем.

[0598] Для оценки 5T4-зависимого агонизма в отношении CD28, проявляемого иллюстративной биспецифической конструкцией 5T4xCD28, как описано в Примере 4, репортерные клетки CD3 (IL-2) высевали в лунки 96-луночного планшета при 10^5 клеток/лунка, с или без 5T4-положительных T47D клеток. Иллюстративные конструкции и анти-CD3 активирующий клон OKT3 добавляли при конечных концентрациях 100 нМ и 1 мкг/мл, соответственно. Аналитические планшеты инкубировали в течение 6 часов при 37°C, а затем уравновешивали до комнатной температуры. Во все лунки добавляли реагент Bio-Glo™ и измеряли люминесценцию с использованием SpectraMax® L.

[0599] Как показано на Фиг. 4D, биспецифическая конструкция 5T4xCD28 (cx8390) проявляла агонизм в отношении CD28 на репортерной клеточной линии CD3 (IL-2) Jurkat 5T4-зависимым образом, о чем свидетельствует усиление активации репортерных клеток

в присутствии, но не в отсутствие 5T4+ клеток. Моноспецифический белок, нацеленный на CD28 (cx8394), не увеличивал активацию репортерных клеток по сравнению с необработанным контролем.

Пример 6: Оценка функциональной активности PDL1xCD28 биспецифической конструкции

A. Т-клеточно-опосредованная цитотоксичность

[0600] Мишень-зависимую цитотоксичность иллюстративной биспецифической конструкции PDL1xCD28 (cx694) оценивали с использованием клеток A549 и нетрансфицированных клеток HEK293FS в качестве PDL1+ и PDL1- клеток-мишеней соответственно. Клетки-мишени флуоресцентно метили CytoID красным и высевали в лунки 96-луночного плоскодонного планшета при $1{,}5\times10^3$ клеток/лунка в среде для анализа (RPMI, дополненной 10% FBS и 1% антибиотика-антимикотика). Клетки оставляли для осаждения при комнатной температуре для равномерного распределения и инкубировали в течение 24 часов при 37°C для адгезии перед добавлением других компонентов анализа. Титрование иллюстративной биспецифической конструкции и первичных Т-клеток, отрицательно обогащенных из PBMC, затем добавляли в аналитические планшеты вместе с зеленым каспаза-3/7 реагентом, который флуоресцентно метил ядерную ДНК клеток, подвергающихся апоптозу. Моноспецифические конструкции, нацеленные либо на CD28 (cx698), либо на PDL1 (cx1204), также оценивали в качестве контроля. Аналитические планшеты периодически визуализировали в течение 5 дней с использованием IncuCyte®. Гибель клеток-мишеней определяли путем измерения общей площади перекрывающихся красных/зеленых объектов. После конечной временной точки визуализации суспензию клеток и супернатанты собирали для анализа маркеров активации и продукции цитокинов, соответственно. Оставшиеся прикрепленные клетки (жизнеспособные мишени) осторожно промывали PBS, а затем анализировали с использованием CellTiter-Glo® 2.0, реагента на основе люциферазы, который приводит к биолюминесценции в присутствии АТФ (жизнеспособные клетки).

[0601] Как показано на Фиг. 5A и 5B, иллюстративная биспецифическая конструкция PDL1xCD28 cx694 индуцировала Т-клеточно-опосредованную активацию каспазы-3/7 в PDL1+ A549 клетках, но не в PDL1- 293FS клетках, в то время как моноспецифические конструкции, нацеленные только на PDL1 или CD28 (cx1204 и cx698 соответственно), не индуцировали активацию каспазы-3/7 в любом типе клеток. Как показано на Фиг. 5C и 5D, мишень-зависимая активация каспазы, индуцированная иллюстративной биспецифической конструкцией PDL1xCD28, коррелирует с мишень-зависимой Т-клеточно-опосредованной цитотоксичностью (как было оценено по выживаемости клеток).

B. Активация Т-клеток

[0602] Для оценки Т-клеточной активации клетки из анализов Т-клеточно-опосредованной цитотоксичности собирали и центрифугировали при 400 g в течение пяти

минут и супернатанты сливали. Клетки ресуспендировали в буфере FACS, содержащем live/dead краситель и флуорофор-конъюгированные антитела к CD4 человека, к CD8 человека, к CD25 человека, к CD69 человека и/или к CD71 человека. Клетки анализировали с использованием Novocyte, и активацию CD4+ или CD8+ Т-клеток определяли путем измерения уровней экспрессии CD25, CD69 или CD71 или процента CD25+, CD69+ или CD71+ клеток.

[0603] Фиг. 6A, 6B и 6C представляют результаты экспрессии CD25, CD69 и CD71, соответственно, CD4+ Т-клетками после культивирования Т-клеток с PDL1+ (A549) или PDL1- (293FS)клетками в присутствии 125 нМ PDL1xCD28 биспецифической конструкции (cx694) или моноспецифической конструкции, индивидуально нацеленной на PDL1 (cx1204) или CD28 (cx698). Фиг. 6D представляет результаты CD69 экспрессии CD8+ Т-клетками после культивирования Т-клеток с PDL1+ (A549) или PDL1- (293FS) клетками в присутствии биспецифической конструкции PDL1xCD28 (cx694) или моноспецифических конструкций, индивидуально нацеленных на PDL1 (cx1204) или CD28 (cx698). Результаты показывают, что иллюстративная биспецифическая конструкция PDL1xCD28 индуцировала PDL1-зависимую активацию как CD4+, так и CD8+ Т-клеток, о чем свидетельствует повышенная экспрессия CD25, CD69 и CD71 на CD4+ Т-клетках (Фиг. 6A-6C) и CD69 на CD8+ Т-клетках (Фиг. 6D).

C. Продукция цитокинов Т-клетками (ELISA)

[0604] Анализ Т-клеточно-опосредованной цитотоксичности осуществляли по существу так, как описано выше, супернатант собирали и анализировали на содержание IFNγ сэндвич-методом ELISA (BioLegend®, USA). Для анализа ELISA следовали инструкциям изготовителя и строили стандартную кривую, из которой интерполировали значения концентрации цитокинов в образцах супернатантов. Образцам со значениями поглощения ниже нижнего предела обнаружения присваивали концентрацию цитокина, равную половине самой низкой стандартной концентрации. Как показано на Фиг. 6E, иллюстративная биспецифическая конструкция PDL1xCD28 (cx694) не вызывала продукцию IFNγ Т-клетками, совместно культивируемыми либо с PDL1+, либо с PDL1- клетками. cx5185 представляет собой конструкцию, нацеленную на CD3, которая использовалась в качестве положительного контроля и была единственной испытанной конструкцией, которая приводила к значениям IFNγ выше нижнего предела количественного определения (LLOQ). Вместе с данными цитотоксичности это показывает, что иллюстративная биспецифическая конструкция PDL1xCD28 обладает способностью индуцировать Т-клеточно-опосредованный киллинг PDL1+ клеток, не приводя к продукции обнаруживаемого IFNγ.

D. Продукция цитокинов Т-клетками (Immunospot)

[0605] Ко-стимуляцию Т-клеток иллюстративными биспецифическими конструкциями PDL1xCD28 оценивали как в анализе стимуляции пептидного пула цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр и вируса гриппа (CEF), так и в анализе аутологичной реакции смешанных лимфоцитов (aMLR).

Анализ стимуляции пептидного пула CEF

[0606] Ко-стимуляцию Т-клеток иллюстративной биспецифической конструкцией PDL1xCD28, cx8370, оценивали путем измерения продукции IFNγ клетками PBMC, обработанными пептидным пулом CEF, который содержит эпитопы цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр и вируса гриппа, в комбинации с титрованием биспецифической конструкции. Продукцию IFNγ измеряли с использованием анализатора Immunospot.

[0607] PBMC, выделенные из цельной крови нормального донора-человека, высевали в лунки 96-луночного планшета, покрытые IFNγ захватывающим антителом. Добавляли пептидный пул CEF и титрование биспецифической конструкции или моноспецифических конструкций, индивидуально нацеленных на PDL1 (cx1204) или CD28 (cx984). Аналитический планшет инкубировали в течение 24 часов при 37°C, промывали и добавляли анти-IFNγ детекторное антитело. Аналитический планшет инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, промывали и затем добавляли флуоресцентное третичное детекторное антитело. Планшет инкубировали в течение часа при комнатной температуре, промывали и затем инкубировали в течение дополнительного часа при комнатной температуре, чтобы высушить мембрану. Мембрану визуализировали и определяли количество IFNγ пятен с использованием анализатора Immunospot.

[0608] Как показано на Фиг. 7A, добавление иллюстративной PDL1xCD28 биспецифической конструкции cx8370 к обработанным CEF пептидным пулом PBMC приводило к костимуляции, о чем свидетельствует дозозависимая продукция IFNγ. Индивидуальное нацеливание на PDL1 или CD28 моноспецифическими конструкциями cx1204 и cx984, соответственно, не влияло на уровень продукции IFNγ обработанными PBMC.

Анализ аутологичных смешанных лимфоцитов (aMLR)

[0609] Костимуляцию Т-клеток иллюстративной PDL1xCD28 биспецифической конструкцией, cx694, оценивали путем измерения продукции TNFα обработанными совместными культурами обогащенных Т-клеток и аутологичных незрелых дендритных клеток (iDC). Продукцию TNFα измеряли с использованием анализатора Immunospot.

[0610] Т-клетки были отрицательно обогащены из PBMC, выделенных из лейкаферезной массы нормального донора-человека (STEMCELL Technologies). Незрелые дендритные клетки получали путем выделения моноцитов из PBMC с использованием протокола, основанного на адгезии с последующей обработкой рекомбинантным GM-CSF (500 Ед/мл) и IL-4 (250 Ед/мл) в течение 6-7 дней. Т-клетки высевали в лунки 96-луночного планшета, покрытого TNFα захватывающим антителом, при 3×10^5 клеток/лунка. Аутологичные iDC добавляли при $1{,}5\times10^4$ клеток/лунка для соотношения iDC:Т-клетки 1:20. Иллюстративные моно- и биспецифические конструкции (10 нМ) и рекомбинантный IL-7 (5 нг/мл) добавляли к совместным культурам и аналитический планшет инкубировали при 37°C в течение 4 дней. Мембрану промывали и осуществляли инкубацию с вторичными и третичными детекторными антителами в соответствии с

инструкциями изготовителя (Immunospot®). Мембрану визуализировали и определяли количество TNFα пятен с использованием анализатора Immunospot®.

[0611] Как показано на Фиг. 7B и 7C, добавление иллюстративной PDL1xCD28 биспецифической конструкции cx694 к аутологичным смешанным культурам лимфоцитов приводило к костимуляции, о чем свидетельствует продукция TNFα. Индивидуальное нацеливание на PDL1 или CD28 с использованием моноспецифических антител cx1204 и cx698, соответственно, не влияло на уровень цитокинов, продуцируемых при совместном культивировании первичных клеток.

Пример 7: Прогностический анализ на CRS in vivo

[0612] TGN1412 представляет собой нацеленное на CD28 суперагонистическое антитело, которое индуцировало тяжелый и быстрый синдром высвобождения цитокинов (CRS) у здоровых добровольцев в клинических испытаниях в 2006 г. (см., например, Attarwala, J. Young Pharm. (2010) 2(3):332-36). Этот ответ не был предсказан в доклинических экспериментах in vitro с PBMC, культивируемыми в нормальных физиологических условиях. Последующая разработка метода привела к анализу, в котором продукцию цитокинов измеряли при помощи PBMC, предварительно культивированных при высокой плотности, что лучше имитирует условия в тканях in vivo. В этих модифицированных условиях TGN1412 индуцирует устойчивую продукцию TNFα CD4+ Т-клетками. Этот анализ стал стандартом для испытания потенциальной токсичности активирующих Т-клетки антител.

[0613] PBMC, выделенные из лейкаферезной массы нормального донора (STEMCELL Technologies), культивировали в среде XVIVO™-15 при высокой плотности (10^7 клеток/мл) в течение 2 дней при 37°C. Клетки собирали, промывали, ресуспендировали в свежей среде для анализа и высевали в лунки 96-луночного планшета, покрытые иллюстративными полученными моно- и биспецифическими конструкциями при 10 мкг/мл (2×10^5 клеток/лунка). Аналитический планшет инкубировали в течение 2 часов при 37°C, во все лунки добавляли ингибитор транспорта белка, а затем планшет инкубировали еще 4 часа при 37°C. Клетки промывали PBS, окрашивали красителем для оценки жизнеспособности клеток, обрабатывали FcR-блокирующим реагентом, а затем окрашивали флуорофор-конъюгированными антителами к CD3, CD4, CD8, CD56 и CD16 человека. Аналитический планшет инкубировали в течение 20 минут при 4°C, затем клетки промывали и ресуспендировали в буфере для фиксации/пермеабилизации и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. Клетки промывали промывочным буфером для пермеабилизации и ресуспендировали в буфере для пермеабилизации, содержащем флуорофор-конъюгированное анти-TNFα антитело. Аналитический планшет инкубировали в течение ночи при 4°C, а затем клетки промывали и ресуспендировали в буфере FACS для анализа с использованием проточного цитометра Quanteon.

[0614] Как показано на Фиг. 8A и 8B, как иммобилизованное анти-CD3 антитело, так и анти-CD28 суперагонистическое антитело TGN1412 индуцировали продукцию TNFα в CD4+ Т-клетках из PBMC, предварительно культивированных при высокой плотности,

как и ожидалось. В отличие от TGN1412, иллюстративное моноспецифическое двухвалентное CD28 sdAb cx984 не индуцировало продукцию TNFα в этой клеточной популяции на уровне, превышающем уровень необработанного контрольного образца. Аналогичным образом, ни одна из PDL1xCD28 биспецифических конструкций (cx694 и cx8370), каждая из которых является бивалентной для PDL1 и CD28, не индуцировала продукцию TNFα в этой клеточной популяции на уровнях выше, чем в необработанном контрольном образце. Не желая быть связанными какой-либо теорией, результаты показывают, что созданные в качестве примера двухвалентные моно- и биспецифические CD28-нацеленные конструкции не индуцируют стабильной продукции TNFα CD4+ T-клетками, что может указывать на сниженный риск CRS in vivo.

[0615] Настоящее изобретение не предназначено для ограничения объема конкретными раскрытыми вариантами осуществления, которые предоставлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из приведенного описания и идей изобретения. Такие варианты могут применяться на практике без отклонения от истинного объема и сути изобретения, и предполагается, что они входят в объем настоящего изобретения.

Последовательности

#	**ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ**	**Примечание**
1	GGSGGS	(GGS)2 линкер
2	GGSGGSGGS	(GGS)3 линкер
3	GGSGGSGGSGGS	(GGS)4 линкер
4	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGS)5 линкер
5	GGGG	глициновый линкер
6	GGGGG	глициновый линкер
7	GGGGGG	глициновый линкер
8	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	IgG1 Fc человека
9	PAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG	Fc xELL

	QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
10	PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	IgG2 Fc человека
11	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST FRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNRFTQK SLSLSPGK	IgG3 Fc человека
12	PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	IgG4 Fc человека
13	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	IgG4 Fc человека

14	EPKSSDKTHTCPPC	модифицированный IgG1 шарнир
15	DKTHTCPPC	усеченный IgG1 шарнир
16	ESKYGPPCPPC	модифицированный IgG4 шарнир
17	GQGTLVTVKPGG	карбокси-концевая последовательность
18	GQGTLVTVEPGG	карбокси-концевая последовательность
19	QVQLVQSGGG VVQPGRSLRL SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKGLEWIGY INPSRGYTNY NQKVKDRFTI SRDNSKNTAF LQMDSLRPED TGVYFCARYY DDHYCLDYWG QGTPVTVSS	OKT3 VH
20	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASSSVS YMNWYQQTPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTDY TFTISSLQPE DIATYYCQQW SSNPFTFGQG TKLQIT	OKT3 VL
21	QVQLVQSGGG VVQPGRSLRL SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKGLEWIGY INPSRGYTNY NQKVKDRFTI SRDNSKNTAF LQMDSLRPED TGVYFCARYY DDHYSLDYWG QGTPVTVSS	гуманизированная VH OKT3
22	DVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGQGLEWIGY INPSRGYTNY ADSVKGRFTI TTDKSTSTAY MELSSLRSED TATYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTVTVSS	гуманизированная VH OKT3
23	QVQLVQSGAE LKKPGASVKV SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGQCLEWMGY INPSRGYTNY NQKFKDKATL TADKSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARYY DDHYSLDYWG QGTLVTVSS	гуманизированная VH OKT3
24	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEIN	OKT3 гуманизированн VL

25	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSVS YMNWYQQKPG KAPKRWIYDT SKVASGVPAR FSGSGSGTDY SLTINSLEAE DAATYYCQQW SSNPLTFGGG TKVEIK	гуманизированная VL OKT3
26	DIQLTQSPSI LSASVGDRVT ITCRASSSVS YMNWYQQKPG KAPKRWIYDT SKVASGVPYR FSGSGSGTEY TLTISSMQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGCG TKVEIKRT	гуманизированная VL OKT3
27	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSA	анти-CD3 Hv
28	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAA LTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	анти-CD3 Lv
29	TYAMN	анти-CD3 VH CDR1
30	RIRSKYNNYATYYADSVKD	анти-CD3 VH CDR2
31	HGNFGNSYVSWFAY	анти-CD3 VH CDR3
32	RSSTGAVTTSNYAN	анти-CD3 VL CDR1
33	GTNKRAP	анти-CD3 VL CDR2
34	ALWYSNLWV	анти-CD3 VL CDR3
35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH1
36	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNS YVSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH2
37	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH3
38	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNW	анти-CD3 VH4

	VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	
39	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH5
40	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH6
41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSW VRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH7
42	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS YISYWAYWGQGTLVTVS	анти-CD3 VH8
43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTTVTVSS	анти-CD3 VH9
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSYFAYWGQGTTVTVSS	анти-CD3 VH10
45	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH11
46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY	анти-CD3 VH12

	VSWFAYWGQGTLVTVKP	
47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVKP	анти-CD3 VH13
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGCGTLVTVKP	анти-CD3 VH14
49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH15
50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH16
51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH17
52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH18
53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTIS RDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH19
54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTIS RDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH20
55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW	анти-CD3 VH21

	VRQAPGKCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	
56	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNS YVSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH22
57	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH23
58	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH24
59	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH25
60	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH26
61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSW VRQAPGKCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH27
62	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS YISYWAYWGQGTLVTVS	анти-CD3 VH28
63	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY	анти-CD3 VH29

	VSWFAYWGQGTTVTVSS	
64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSYFAYWGQGTTVTVSS	анти-CD3 VH30
65	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	анти-CD3 VH31
66	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAA LTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	анти-CD3 VL1
67	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGCGTKLEI K	анти-CD3 VL2
68	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKA ALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	анти-CD3 VL3
69	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAA LTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	анти-CD3 VL4
70	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAA LTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	анти-CD3 VL5
71	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAA LTITGAQADDESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	анти-CD3 VL6
72	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLT VL	анти-CD3 VL7
73	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNW VQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA	анти-CD3 VL8

	LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	
74	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLEI K	анти-CD3 VL9
75	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGCGTKLEI K	анти-CD3 VL10
76	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGQCFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGEGTKLEI K	анти-CD3 VL11
77	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAA LTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	анти-CD3 VL12
78	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLEI K	анти-CD3 VL13
79	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKA ALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	анти-CD3 VL14
80	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAA LTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	анти-CD3 VL15
81	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAA LTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	анти-CD3 VL16
82	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAA LTITGAQADDESDYYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	анти-CD3 VL17
83	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGK	анти-CD3 VL18

	AALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGCGTKLTV L	
84	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNW VQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGCGTKLTVL	анти-CD3 VL19
85	QVQLQESGGG LVQAGGSLRL SCAASGRTFS NYHMGWFRQA PGKERELVAA ISGSGGSTYY TDSVKGRFTI SRNNAKNTMS LQMSNLKPED TGVYYCTTPT EKGSSIDYWG QGTQVTVSSG RYPYDVPDY	анти-CD3 VHH
86	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVN LSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYS QQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQNLYVNQTDI YFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFP GPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRS RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	Каноническая последовательность CD28 (например, UniProt No. P10747)
87	GGG	линкер
88	NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASL HKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKL GNESVTFYLQNLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEK SNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP	CD28 ECD (aa 19-152 человеческого CD28, например, UniProt No. P10747)
89	GGSGGGGS	линкер
90	GGGSGS	линкер
91	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	CD3зета сигнальный домен
92	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL	4-1BB-происходящий костимулирующий домен
93	SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AYRS	CD28-происходящий костимулирующий домен

94	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28-происходящий костимулирующий домен 2
95	FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28-происходящий костимулирующий домен 3
96	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFASDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	CD8-происходящий шарнир и трансмембранный домен
97	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLLSLVIT	CD8-происходящий шарнир и трансмембранный домен
98	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	CD8 шарнир и трансмембранный домен
99	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGGIFAIKPISWYRQAPGKQREWVSTTTSSGATNYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCNVFEYWGQGTLVTVKP	PDL1 sdAb
100	GGIFAIKPIS	CDR1 PDL1
101	TTTSSGATN	CDR2 PDL1
102	FEY	CDR3 PDL1
103	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPT	Выступ Fc
104	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL	Впадина Fc

	PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPT	
105	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPT	Выступ Fc
106	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPT	Впадина Fc
107	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	Выступ Fc
108	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	Впадина Fc
109	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI	Выступ Fc

	EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	
110	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	Впадина Fc
111	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQK SLSLSPT	Впадина Fc
112	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLS LSPT	Впадина Fc
113	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQK SLSLSPG	Впадина Fc
114	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI	Впадина Fc

	EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLS LSPG	
115	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNHYTQK SLSLSPT	Выступ Fc
116	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLS LSPT	Выступ Fc
117	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNHYTQK SLSLSPG	Выступ Fc
118	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLS LSPG	Выступ Fc
119	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP	Впадина Fc

	APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRYTQKS LSLSPT	
120	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRYTQKSLS LSPT	Впадина Fc
121	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRYTQKS LSLSPG	Впадина Fc
122	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRYTQKSLS LSPG	Впадина Fc
123	(GGGGS)n, где n имеет значение от 1 до 5	Линкер
124	(GGGGGS)n, где n имеет значение от 1 до 4	Линкер
125	GGGGS	Линкер
126	GGGGGS	Линкер
127	GGGGGSGGGGGSGGGGGS	Линкер
128	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер
129	GGSGGGGSGGGGSGGGGS	Линкер
130	Glyx-Xaa-Glyy-Xaa-Glyz Xaa независимо выбран из A, V, L, I, M, F, W, P, G, S, T,	Линкер

	C, Y, N, Q, K, R, H, D или E x, y и z каждый представляет собой целое число в диапазоне 1-5	
131	Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly Xaa независимо выбран из A, V, L, I, M, F, W, P, G, S, T, C, Y, N, Q, K, R, H, D или E	Линкер
132	(SSSSG)n n=1-9	Линкер
133	GGGGG-C-GGGGG	Линкер
134	(EAAAK)n	Линкер
135	AS-(AP)n-GT n=2-20	Линкер
136	AS-(EAAAK)n-GT n=2-20	Линкер
137	(GGGGA)n n=2-20	Линкер
138	(PGGGS)n n=2-20	Линкер
139	(AGGGS)n n=2-20	Линкер
140	GGS-(EGKSSGSGSESKST)n-GGS n=2-20	Линкер
141	SSSASASSA	Линкер
142	GSPGSPG	Линкер
143	ATTTGSSPGPT	Линкер
144	X1 X2 X3 X4 X5 (P4 P3 P2 P1 ↓ P1’) X1= I, L, Y, M, F, V или A; (P4=I, L, Y, M, F, V или A) X2=A, G, S, V, E, D, Q, N, или Y; (P3=A, G, S, V, E, D, Q, N или Y) X3=H, P, A, V, G, S, или T; (P2=H, P, A, V, G, S или T) X4=D или E; (P1=D или E) X5=I, L, Y, M, F, V, T, S, G или A (P1’=I, L, Y, M, F, V, T, S, G или A)	Линкер, консенсусная
145	X1 E X3 D X5 (P4 P3 P2 P1 ↓ P1’)	Линкер,

	X1=I или L; (P4=I или L) (P3=E) X3=P или A; (P2=P или A) X5=I, V, T, S или G (P1'=I, V, T, S, или G)	консенсусная
146	LEAD	субстрат для гранзима B
147	LEPD	Линкер
148	LEAE	Линкер
149	lEPDI	Линкер
150	LEPDG	Линкер
151	LEADT	Линкер
152	lEPDG	Линкер
153	lEPDV	Линкер
154	lEPDS	Линкер
155	lEPDT	Линкер
156	X1QARX5 (P1QAR↓(A/V)) X1=любая аминокислота; (P1 представляет собой любую аминокислоту) X5=A или V	Линкер, консенсусная
157	RQARX5 (RQAR(A/V)) X5=A или V	Линкер
158	RQAR	субстрат для матриптазы
159	RQARV	линкер
160	X1X2 X3 X4 (P3 P2 P1 ↓ P1') X1=P, V или A; (P3=P, V или A) X2=Q или D; (P2=Q или D) X3=A или N; (P1=A или N) X4=L, I или M (P1'=L, I или M)	Линкер, консенсусная
161	PX2X3X4 (P3 P2 P1 ↓ P1') (P3=P) X2=Q или D; (P2=Q или D) X3=A или N; (P1 представляет собой или N) X4=L или I (P1' представляет собой L или I)	Линкер, консенсусная

162	PAGL	Субстрат для MMP
163	TGLEADGSPAGLGRQARVG	Линкер
164	TGLEADGSRQARVGPAGLG	Линкер
165	TGSPAGLEADGSRQARVGS	Линкер
166	TGPAGLGLEADGSRQARVG	Линкер
167	TGRQARVGLEADGSPAGLG	Линкер
168	TGSRQARVGPAGLEADGS	Линкер
169	TGPAGLGSRQARVGLEADGS	Линкер
170	GPAGLGLEPDGSRQARVG	Линкер
171	GGSGGGGIEPDIGGSGGS	Линкер
172	GGSGGGGLEADTGGSGGS	Линкер
173	GSIEPDIGS	Линкер
174	GSLEADTGS	Линкер
175	GGSGGGGIEPDGGGSGGS	Линкер
176	GGSGGGGIEPDVGGSGGS	Линкер
177	GGSGGGGIEPDSGGSGGS	Линкер
178	GGSGGGGIEPDTGGSGGS	Линкер
179	GGGSLEPDGSGS	Линкер
180	GPAGLGLEADGSRQARVG	Линкер
181	GGEGGGGSGGSGGGS	Линкер
182	GSSAGSEAGGSGQAGVGS	Линкер
183	GGSGGGGLEAEGSGGGGS	Линкер
184	GGSGGGGIEPDPGGSGGS	Линкер
185	TGGSGGGGIEPDIGGSGGS	Линкер
186	EVQLVQSGGALVQAGGSLRLSCVAPRTIGLISLMGWY RQAPGKQRELVATIIASGRTNYAESVKDRFTISRDNAE NKVYLQVNSLKPEDTAVYYCRVNAETAPWSRRGFW GQGTQVTVKP	1G7 CD28 sdAb
187	QVQLQQSGGGLVQAGGSLRLSCVASGISFNVVDMDW HRQAPGKERELVAGITRGGATYYADSVKGRFTISRDN AKNSAYLQLANLKPEDTAVYYCNARWPSRYQNYWG QGTQVTVKP	2F11 CD28 sdAb
188	EVQLVQSGGGLVQTGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDSADYADSVKGRFTISR	1C9 CD28 sdAb

	DNAKNTVYLEMNSLKPEDTAIYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTQVTVKP	
189	RTIGLISLMG	CDR1 (1G7)
190	TIIASGRTN	CDR2 (1G7)
191	NAETAPWSRRGF	CDR3 (1G7)
192	GISFNVVDMD	CDR1 (2F11)
193	GITRGGATY	CDR2 (2F11)
194	RWPSRYQNY	CDR3 (2F11)
195	GRMFSNYAMG	CDR1 (1C9, v1-v4, v7-v9, v12-v27)
196	AINYRRDSAD	CDR2 (1C9, v1-v6, v10, v11)
197	TYAGWASSRRDDYNY	CDR3 (1C9, v1-v27)
198	GRIFSNYAMG	CDR1 (1C9v5)
199	GRLFSNYAMG	CDR1 (1C9v6)
200	GRTFSNYAMG	CDR1 (1C9v10)
201	GFTFSNYAMG	CDR1 (1C9v11)
202	AINYRRESAD	CDR2 (1C9v7)
203	AINYRRDAAD	CDR2 (1C9v8)
204	AINYRRDTAD	CDR2 (1C9v9)
205	AINYRRDVAD	CDR2 (1C9v12)
206	AINYRRDDAD	CDR2 (1C9v13, 16, 17, 22-27)
207	AINYRRSDAD	CDR2 (1C9v14)
208	AINYRRTCAD	CDR2 (1C9v15)
209	AINYRRDDAA	CDR2 (1C9v18)
210	AINYRRSSAD	CDR2 (1C9v19)
211	AINYRRDDTD	CDR2 (1C9v20)
212	AINYRRDEAD	CDR2 (1C9v21)
213	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKGREFVSAINYRRDSADYAESVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v1 CD28 sdAb
214	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG	1C9v2 CD28 sdAb

	WFRQAPGKEREFVSAINYRRDSADYAESVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	
215	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVSAINYRRDSADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v3 CD28 sdAb
216	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDSADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v4 CD28 sdAb
217	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRIFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDSADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v5 CD28 sdAb
218	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRLFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDSADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v6 CD28 sdAb
219	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRESADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7 CD28 sdAb
220	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDAADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v8 CD28 sdAb
221	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDTADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v9 CD28 sdAb
222	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDSADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR	1C9v10 CD28 sdAb

	DDYNYWGQGTLVTVKP	
223	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDSADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v11 CD28 sdAb
224	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDVADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v12 CD28 sdAb
225	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v13 CD28 sdAb
226	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRSDADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v14 CD28 sdAb
227	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRTCADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v15 CD28 sdAb
228	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKGREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASS RRDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v16 CD28 sdAb
229	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKGREFVAAINYRRDDADYAESVKDRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASS RRDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v17 CD28 sdAb
230	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDAAYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v18 CD28 sdAb
231	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG	1C9v19 CD28 sdAb

	WFRQAPGKEREFVAAINYRRSSADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	
232	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDTDYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v20 CD28 sdAb
233	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDEADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v21 CD28 sdAb
234	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREWVAAINYRRDDADYAESVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASS RRDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v22 CD28 sdAb
235	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WVRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASS RRDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v23 CD28 sdAb
236	EVQLVESGGGEVQTGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v24 CD28 sdAb
237	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLEMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v25 CD28 sdAb
238	EVQLVESGGGEVQTGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLEMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v26 CD28 sdAb
239	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCGFTYAGWASSRR	1C9v27 CD28 sdAb

	DDYNYWGQGTLVTVKP	
240	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSKTMAW FRQAPGKEREFVAAVRWIGGATRYTESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTD YSDWGQGTLVTVKP	5T4 sdAb
241	GRPFSSKTMA	CDR1 5T4 sdAb
242	AVRWIGGATR	CDR2 5T4 sdAb
243	GQAWGTKFTDYSD	CDR3 5T4 sdAb
244	GGS(GGS)n, где n имеет значение от 0 до 10	Линкер
245	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSYAMGW FRQAPGKERETVAAVSRNAGSSYYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSET YTEKHDYTYWGQGTLVTVKP	5T4 sdAb
246	GRPFSSYAMG	CDR1 5T4 sdAb
247	AVSRNAGSSY	CDR2 5T4 sdAb
248	WGQGTLVTVKP	CDR3 5T4 sdAb
249	GG	линкер
250	PGGGG	линкер
251	IEPDP	Линкер
252	GFTFNTYAMN	анти-CD3 VH CDR1
253	QLQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDNYAIGWF RQAPGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRNNA KGTVYLLMNSLKPEDTAVYYCATELVPACTYSNGRG PLDGMDYWGKGTQVTVKP	FRальфа sdAb
254	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSIDATAWY RQAPGKQRELVAIITSSGSTNYPESVKGRFTISRDNAK NTVYLQMSSLRAEDTAVYYCNAITRYGGSTYDFWGQ GTLVTVKP	FRальфа sdAb
255	EVQPGGSLRLSCAASETFGVVFTLGWYRQAPGKGRE FVARVTGTDTVDYAESVKGRFTISSDFARNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCNTGAYWGQGTLVTVKP	FRальфа sdAb
256	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRQWDYDV	5T4 Fd

	RAMNYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSC	
257	DIVMTQSHIFMSTSVGDRVSITCKASQDVDTAVAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRLTGVPDRFTGSGSGTDFTL TISNVQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	5T4 LC
258	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYXCVRQWDYDV RAMNYWGQGTSVTVSS X=C или Y	анти-5T4 VH
259	DIVMTQSHIFMSTSVGDRVSITCKASQDVDTAVAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRLTGVPDRFTGSGSGTDFTL TISNVQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGG GTKLEIK	анти-5T4 VL
260	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFILDYYAIGWF RQAPGKEREGVLCIDASDDITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCATPIGLSSSCLLEYD YDYWGQGTLVTVKP	cMET sdAb
261	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHW VRQAPGKGLEWVAYISSDSSAIYYADTVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGRENIYYGSRL DYWGQGTTVTVSSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQS PSFLSASVGDRVTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGKA PKALIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQYNNYPFTFGQGTKLEIK	B7H3 scFv
262	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSSNVMMW VRQAPGKGLEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRD NAKNTLYLQMSSLRPEDTAVYYCATSGPVRGWGPRS QGTLVTVKP	B7H3 sdAb
263	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWF	B7H3 sdAb

	RQAPGKQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNTLRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYW GQGTLVTVKP	
264	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYHMSWF RQAPGKQRELVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNTLRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYW GQGTLVTVKP	B7H3 sdAb
265	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYHMSWF RQAPGKQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNTLRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYW GQGTLVTVKP	B7H3sdAb
266	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAPSERTFSTYTMGWF RQAPGKEREFVAVVNWGGGSKYYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYYD TRQYTYWGQGTLVTVKP	B7H3 sdAb
267	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHW VRQAPGKGLEWVAYISSDSSAIYYADTVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGRENIYYGSRL DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC	B7H3 Fd
268	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVDTNVAWYQ QKPGKAPKALIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	B7H3 LC
269	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR IFPGDGDTDY NGKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV FDGYWLVYWG QGTLVTVSS	CD20 VH
270	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDF	CD20 VL

	TLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP YTFGGGTKVEIKRTV	
271	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINW VRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVY WGQGTLVTVSGSGGGGSGGGGTGGGGSDIVMTQTPL SLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQ SPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIK	CD20 scFv
272	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIR QPPGKGLEWIGYVYYSGTTNYNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPG ERVTLSCRASQRVNNNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YDRSPLTFGGGTKLEIK	DLL3 scFv
273	QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGYVYYSGTTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCASIAVTGFYFDYWGQ GTLVTVSSGG GGSGGGGSGG GGSEIVLTQS PGTLSLSPGERVTLSCRASQ RVNNNYLAWY QQRPGQAPRL LIYGASSRAT GIPDRFSGSG SGTDFTLTIS RLEPEDFAVY YCQQYDRSPL TFGGGTKLEI K	DLL3 scFv
274	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWY RQAPGKQRELVAGFTGDTNTIYAESVKGRFTISRDNA KNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFY WGQGTLVTVKP	DLL3 sdAb
275	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIITSDKSMGWV RQAPGKQRNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDNA KNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYARDFENEYWGQGT LVTVKP	DLL3 sdAb
276	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNW VKQAPGKGLKWMAWINTYTGEPTYADDFKGRFAFS	DLL3 Fd

	LETSASTASLQIINLKNEDTATYFCARIGDSSPSDYWG QGTTLTVSSSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SC	
277	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVVWYQ QKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFAGSGYGTDFSFTI STVQAEDLAVYFCQQDYTSPWTFGGGTKLEIRRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	DLL3 LC
278	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSFNYYWS WIRHHPGKGLEWIGYIYYSGSTYSNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCARGYNWNYFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	gpNMB Fd
279	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDNNLVWYQ QKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	gpNMB LC
280	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDAADYAESVKDRFTISR DNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v8D CD28 sdAb
281	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGCGTKLTV L	анти-CD3 VL (CON)
282	EIITSDKSMG	CDR1
283	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI	CD3-VH33

	SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	
284	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE EYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC DVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	Fc-Het-1
285	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	Fc-Het-2
286	RIRSKYNNYATY	анти-CD3 VH CDR2
287	HGNFGDSYVSWFAY	CD3-VH7, VH33 CDR3
288	ALWYSNHWV	CD3-VL2, VL21 CDR3
289	VLWYSNRWV	CD3-VL8 CDR3
290	GSIFRINVMG	CDRH1 (C05)
291	RIFSGGSPN	CDRH2 (C05)
292	LIASRAAPGLKYDY	CDRH3 (C05)
293	ISIFSINRMG	CDRH1 (E08)
294	AMTSGGSTN	CDRH2 (E08)
295	ASRRELY	CDRH3 (E08)
296	GAIFSKTEVG	CDRH1 (B11)
297	TISAGDRTN	CDRH2 (B11)
298	RRGDTIL	CDRH3 (B11)
299	GIIFREYAMG	CDRH1 (B10)
300	VISKTGTTI	CDRH2 (B10)
301	TRGQLDY	CDRH3 (B10)

302	GFTFSTYAMN	CD3 VH33 CDR1
303	RIRSKYNNYATY	CD3 VH33 CDR2
304	GSSTGAVTTSNYAN	CD3 VL21 CDR1
305	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLG GAYWGQGTLVTVSS	Анти-CD3 VH 312557
306	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKCLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLG GAYWGQGTLVTVSS	Анти-CD3 VH 312557 G44C
307	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQGTKVEIK	Анти-CD3 VL 312557
308	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGCGTKVEIK	Анти-CD3 VL 312557Q100C
309	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYSMHW VRQAPGKGLEWVSGISWNSGSKDYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKYGSGYGKFY HYGLDVWGQGTTVTVSS	CD3-VH-G
310	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYSMHW VRQAPGKCLEWVSGISWNSGSKDYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKYGSGYGKFY HYGLDVWGQGTTVTVSS	CD3-VH-G
311	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK	V_{K1}-39Jκ5
312	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGCGTRLEIK	V_{K1}-39Jκ5Q100C
313	(ADAAP)n n=2-20	линкер
314	(ADAAP)n-G	линкер

	n=2-20	
315	(GEPQG)n n=2-20	линкер
316	(GEPQG)n-G n=2-20	линкер
317	(AGGEP)n n=2-20	линкер
318	(AGGEP)n-G n=2-20	линкер
319	(AGSEP)n n=2-20	линкер
320	(AGSEP)n-G n=2-20	линкер
321	(GGGEQ)n n=2-20	линкер
322	(GGGEQ)n-G n=2-20	линкер
323	ADAAPADAAPG	линкер
324	GEPQGGEPQGG	линкер
325	AGGEPAGGEPG	линкер
326	AGSEPAGSEPG	линкер
327	GGGEQGGGEQG	линкер
328	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSP	Выступ Fc
329	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS	Впадина Fc

	FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSP	
330	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSP	Выступ Fc
331	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSP	Впадина Fc
332	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQK SLSLSP	Впадина Fc
333	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLS LSP	Впадина Fc
334	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS	Выступ Fc

	FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNHYTQK SLSLSP	
335	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLS LSP	Выступ Fc
336	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRYTQKS LSLSP	Впадина Fc
337	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRYTQKSLS LSP	Впадина Fc
338	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTV L	CD3-VL20
339	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGCGTKLTV L	CD3-VL21
340	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSY VSWFAYWGQGTLVTVSS	CD3-VH32

341	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADTVKGRFTI SRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSY VSWFAYWGQGTLVTV	CD3-VH34
342	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v13.1 CD28 sdAb
343	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYDYWGQGTLVTVKP	1C9v13.2 CD28 sdAb
344	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKDRFTISR DNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v13.3 CD28 sdAb
345	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKDRFTISR DNAKNTVYLQMSSLRAEDTAIYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v13.4 CD28 sdAb
346	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMSSLRAEDTAIYYCGFTYAGWASSRR DDYDYWGQGTLVTVKP	1C9v13.5 CD28 sdAb
347	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYGRDDADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v13.6 CD28 sdAb
348	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRGDDADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR RDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v13.7 CD28 sdAb
349	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISR	1C9v13.8 CD28 sdAb

	DNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSG RDDYNYWGQGTLVTVKP	
350	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMG WFRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISR DNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSR GDDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v13.9 CD28 sdAb
351	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDSADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v11.1 CD28 sdAb
352	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDSADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYDYWGQGTLVTVKP	1C9v11.2 CD28 sdAb
353	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDSADYAESVKDRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v11.3 CD28 sdAb
354	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYGRDSADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v11.4 CD28 sdAb
355	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRGDSADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v11.5 CD28 sdAb
356	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDSADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSGR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v11.6 CD28 sdAb
357	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDSADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRG DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v11.7 CD28 sdAb

358	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRESADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.1 CD28 sdAb
359	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRESADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYDYWGQGTLVTVKP	1C9v7.2 CD28 sdAb
360	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRESADYAESVKDRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.3 CD28 sdAb
361	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYGRESADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.5 CD28 sdAb
362	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRGESADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.6 CD28 sdAb
363	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRESADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSGR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.7 CD28 sdAb
364	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRESADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRG DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.8 CD28 sdAb
365	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.9 CD28 sdAb
366	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISRD	1C9v7.10 CD28 sdAb

	NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYDYWGQGTLVTVKP	
367	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKDRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.11 CD28 sdAb
368	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYGRDDADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.12 CD28 sdAb
369	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRGDDADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.13 CD28 sdAb
370	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSGR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.14 CD28 sdAb
371	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDDADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRG DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.15 CD28 sdAb
372	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDAADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.16 CD28 sdAb
373	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDAADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYDYWGQGTLVTVKP	1C9v7.17 CD28 sdAb
374	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDAADYAESVKDRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.18 CD28 sdAb

375	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYGRDAADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.19 CD28 sdAb
376	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRGDAADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.20 CD28 sdAb
377	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDAADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSGR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.21 CD28 sdAb
378	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDAADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRG DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.22 CD28 sdAb
379	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDTADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.23 CD28 sdAb
380	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDTADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYDYWGQGTLVTVKP	1C9v7.24 CD28 sdAb
381	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDTADYAESVKDRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.25 CD28 sdAb
382	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYGRDTADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.26 CD28 sdAb
383	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRGDTADYAESVKGRFTISRD	1C9v7.27 CD28 sdAb

	NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRR DDYNYWGQGTLVTVKP	
384	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDTADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSGR DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.28 CD28 sdAb
385	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGW FRQAPGKEREFVAAINYRRDTADYAESVKGRFTISRD NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRG DDYNYWGQGTLVTVKP	1C9v7.29 CD28 sdAb
386	AINYGRESAD	CDR2 (1C9v7.5)
387	AINYRGESAD	CDR2 (1C9v7.6)
388	AINYGRDDAD	CDR2 (1C9v7.12; 1C9v13.6)
389	AINYRGDDAD	CDR2 (1C9v7.13; 1C9v13.7)
390	AINYGRDAAD	CDR2 (1C9v7.19)
391	AINYRGDAAD	CDR2 (1C9v7.20)
392	AINYGRDTAD	CDR2 (1C9v7.26)
393	AINYRGDTAD	CDR2 (C9v7.27)
394	AINYGRDSAD	CDR2 (1C9v11.4)
395	AINYRGDSAD	CDR2 (1C9v11.5)
396	TYAGWASSRRDDYDY	CDR3 (1C9v7.2, 10, 17, 24; 1C9v11.2; 1C9v13.2, 5)
397	TYAGWASSGRDDYNY	CDR3 (1C9v7.7, 14, 21, 28; 1C9v11.6; 1C9v13.8)
398	TYAGWASSRGDDYNY	CDR3 (1C9v7.8, 15, 22, 29; 1C9v11.7; 1C9v13.9)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. CD28-связывающий полипептид, включающий по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 190, 193, 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194, 197, 396, 397 и 398.

2. CD28-связывающий полипептид по п. 1, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает:

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

3. CD28-связывающий полипептид, включающий по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194 и 197, 396, 397 и 398.

4. CD28-связывающий полипептид по п. 3, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает:

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:194;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

5. CD28-связывающий полипептид, включающий по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере один CD28 sdAb (CD28 VHH) домен включает:

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:220; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:239;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:280; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:342; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:343; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:347; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:353; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:354; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:356; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:360; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:362; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:370;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:373; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:377; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:384; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

6. CD28-связывающий полипептид, включающий по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое связывается с CD28, где по меньшей мере один CD28 sdAb (CD28 VHH) домен включает:

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:239; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:280; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:342; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:343; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:347; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:353; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO:354; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:356; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:360; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:362; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:370; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:373; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:377; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO:384; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

7. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-6, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385.

8. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-6, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385.

9. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-8, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 186, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO: 186, и/или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 186.

10. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-9, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 189; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 190; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 191.

11. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-8, где по меньшей мере

одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 187, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO: 187, и/или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 187.

12. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-8 и 11, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 192; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 193; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 194.

13. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-8, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 188, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO: 188, и/или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 188.

14. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-8 и 13, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 197, 396, 397 и 398.

15. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-8, 13 и 14, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 386 и 197, соответственно;SEQ ID NO: 201, 387 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201,

390 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 391 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 392 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 393 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 394 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 395 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 195, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 397, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 206 и 398, соответственно.

16. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-8 и 13, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 197, 396, 397 и 398.

17. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-8, 13 и 16, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 386 и 197, соответственно;SEQ ID NO: 201, 387 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 390 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 391 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 392 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 393 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 394 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 395 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201,

196 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 195, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 397, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 206 и 398, соответственно.

18. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-8 и 13-15, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385.

19. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-8, 13-15 и 18, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385.

20. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-8, 13, 16 и 17, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385.

21. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-7, 13, 16, 17 и 20, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385.

22. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-21, где по меньшей мере одно CD28 sdAb представляет собой одно CD28 sdAb и/или CD28-связывающий полипептид является одновалентным для CD28.

23. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-21, где по меньшей мере одно CD28 sdAb представляют собой два, три или четыре CD28 sdAb, и/или CD28-связывающий полипептид является мультивалентным для CD28.

24. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-21 и 23, где по меньшей мере одно CD28 sdAb представляют собой два CD28 sdAb и/или CD28-связывающий полипептид является двухвалентным для CD28.

25. CD28-связывающий полипептид по п. 24, где два CD28 sdAb являются одинаковыми CD28 sdAb.

26. CD28-связывающий полипептид по п. 24 или п. 25, где каждое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188.

27. CD28-связывающий полипептид по п. 24 или п. 25, где каждое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220.

28. CD28-связывающий полипептид по п. 24 или п. 25, где каждое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280.

29. CD28-связывающий полипептид по п. 24, где два CD28 sdAb являются разными CD28 sdAb.

30. CD28-связывающий полипептид по п. 24 или п. 29, где одно из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, а другое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220.

31. CD28-связывающий полипептид по п. 24 или п. 29, где одно из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, а другое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280.

32. CD28-связывающий полипептид по п. 24 или п. 29, где одно из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:220, а другое из двух CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:280.

33. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-32, где CD28-связывающий полипептид включает фрагмент, который связывается с белком A.

34. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-33, где по меньшей мере одно CD28 sdAb включает аминокислотную модификацию, которая уменьшает связывание с белком A.

35. CD28-связывающий полипептид по п. 34, где аминокислотная модификация представляет собой G65D, в соответствии с Kabat, в каркасной области 3 (FR3).

36. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc, включающий CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-35 и Fc-область иммуноглобулина.

37. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по п. 36, где Fc-область связана связывающим пептидом (LP) с по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb.

38. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по п. 36 или п. 37, где по меньшей мере одно CD28 sdAb связано связывающим пептидом (LP) с Fc-областью на N-конце Fc-области.

39. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по п. 37 или п. 38, где LP представляет собой нерасщепляемый линкер.

40. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по любому из пп. 37-39, где LP представляет собой пептид длиной примерно от 1 до 20 аминокислот.

41. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по любому из пп. 38-40, где CD28-связывающий полипептид включает от N-конца к C-концу: (CD28 sdAb)-LP-Fc.

42. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по любому из пп. 37-40, где CD28-связывающий полипептид включает от N-конца к C-концу: (CD28 sdAb)-LP-(CD28 sdAb)-LP-Fc.

43. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по любому из пп. 1-42, который представляет собой димер.

44. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по любому из пп. 36-43, где Fc-область

представляет собой гомодимерную Fc-область.

45. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по любому из пп. 36-44, где Fc-область включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13.

46. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по любому из пп. 36-45, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1.

47. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по любому из пп. 36-46, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1, при этом необязательно Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 8.

48. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по любому из пп. 36-43, где Fc-область представляет собой гетеродимерную Fc-область.

49. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по любому из пп. 36-48, где Fc-область демонстрирует эффекторную функцию.

50. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по любому из пп. 36-48, где Fc-область включает полипептид, включающий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают эффекторную функцию и/или уменьшают связывание с эффекторной молекулой, выбранной из Fc-гамма рецептора и C1q.

51. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по п. 50, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235.

52. Слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по п. 50 или п. 51, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235, при этом необязательно Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 9.

53. Гомодимерный Fc-слитый белок, включающий две идентичные копии слитого белка анти-CD28 sdAb-Fc по любому из пп. 33-49.

54. Гетеродимерный слитый белок, включающий два из анти-CD28 sdAb-Fc слитых белков по любому из пп. 33-49.

55. Мультиспецифический связывающий полипептид, включающий слитый белок анти-CD28 sdAb-Fc по любому из пп. 36-52 и один или более связывающих доменов (BD), которые связываются с целевым антигеном, отличным от CD28.

56. Мультиспецифический -связывающий полипептид по п. 55, где один или более

BD связываются с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA).

57. Мультиспецифический связывающий полипептид по п. 55, где один или более BD связываются с маркером Т-клеточной поверхности, который представляет собой маркер активации Т-клеток или маркер истощения Т-клеток.

58. Мультиспецифический связывающий полипептид по п. 55, где один или более BD связываются с маркером клеточной поверхности, который представляет собой маркер микроокружения опухоли.

59. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-58, где один или более BD, необязательно каждый из одного или более BD, представляет собой однодоменное антитело (sdAb).

60. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-59, где мультиспецифический связывающий полипептид представляет собой Fc-слитый белок, где по меньшей мере один из одного или более BD и/или по меньшей мере одно CD28 sdAb связаны с Fc-областью иммуноглобулина.

61. Мультиспецифический связывающий полипептид по п. 60, где Fc-слитый белок включает от N-конца к С-концу:

один или более BD;

по меньшей мере один CD28-связывающий домен, включающий sdAb, которое связывается с CD28; и

Fc-область.

62. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-61, где по меньшей мере один из одного или более BD соединен связывающим пептидом (LP) с по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb.

63. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-62, включающий от N-конца к С-концу: (BD)-LP-(CD28 sdAb)-LP-Fc.

64. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 55-63, который представляет собой димер.

65. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-64, где Fc-область представляет собой гомодимерную Fc-область.

66. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-65, где Fc-область включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13.

67. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-66, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1.

68. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-67, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1, при этом необязательно Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или

последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 8.

69. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-64 и 66-68, где Fc-область представляет собой гетеродимерную Fc-область.

70. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-69, где Fc-область демонстрирует эффекторную функцию.

71. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-69, где Fc-область включает полипептид, включающий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают эффекторную функцию и/или уменьшают связывание с эффекторной молекулой, выбранной из Fc-гамма рецептора и C1q.

72. Мультиспецифический связывающий полипептид по п. 71, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235.

73. Мультиспецифический связывающий полипептид по п. 71 или п. 72, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235, при этом необязательно Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 9.

74. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-73, где антиген, с которым связывается BD, выбран из группы, состоящей из: 1-92-LFA-3, 2B4, 5T4, интегрина альфа-4, интегрина альфа-V, интегрина альфа4бета1, интегрина альфа4бета7, альфа-SMA, AGR2, анти-Lewis-Y, рецептора апелина J, APRIL, B7-H3, B7-H4, BAFF, BTLA, комплемента C5, C-242, CA9, CA19-9, (Lewis a), карбоангидразы 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD69, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD107a, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD137, CD138, CD160, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), КЛАУДИН-3, КЛАУДИН-4, cMet, коллагена, Cripto, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, рецептора эндотелина B (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, F белка RSV, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT-3, рецептора фолата альфа (FRальфа), FSP-1, GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, рецепторов GP IIb/IIIa, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HLA-DR, HVEM, гиалуронидазы, ICOS, IFNальфа, IFNбета, IFNгамма, IgE, рецептора IgE (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12Rбета1, IL13, IL13R, IL13Ra2, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R,

IL4, IL4R, IL6, IL6R, рецептора акцессорного белка IL1 (IL1RAP), инсулинового рецептора, Jagged лигандов, Jagged 1, Jagged 2, KISS1-R, KLRG1, LAG-3, LIF-R, Lewis X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, мезотелина, MRP4, MUC1, муцина-16 (MUC16, CA-125), Na/K АТФазы, NGF, никастрина, рецепторов Notch, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFRальфа, PDGFRбета, PD-1, PD-L1, PD-L2, фосфатидил-серина, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, Siglec15, сфингозин 1 фосфата, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGFбета, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNFальфа, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, трансферрина, рецептора трансферрина, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2 и WISP-3.

75. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-74, где один или более BD представляет собой один BD и/или мультиспецифический связывающий полипептид является одновалентным для антигена.

76. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-74, где один или более BD представляют собой два, три или четыре BD, и/или мультиспецифический связывающий полипептид является мультивалентным для одного или более антигенов.

77. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-74 и 76, где один или более BD представляют собой два BD и/или мультиспецифический связывающий полипептид является двухвалентным для одного или более антигенов.

78. Мультиспецифический связывающий полипептид по п. 77, где два BD являются однодоменными антителами (sdAb) и эти два sdAb являются одинаковыми sdAb.

79. Мультиспецифический связывающий полипептид по п. 77, где два BD являются однодоменными антителами (sdAb) и эти два sdAb являются разными sdAb, которые связываются с одним и тем же антигеном, необязательно, которые связываются с разными эпитопами одного и того же антигена.

80. Мультиспецифический связывающий полипептид по п. 77, где два BD являются однодоменными антителами (sdAb) и эти два sdAb являются разными sdAb, которые связываются с разными антигенами.

81. Гомодимерный мультиспецифический Fc-слитый белок, включающий две идентичные копии мультиспецифического связывающего полипептида по любому из пп. 55-80.

82. Гетеродимерный мультиспецифический Fc-слитый белок, включающий два из мультиспецифических связывающих полипептидов по любому из пп. 55-80.

83. Мультиспецифический Fc-слитый белок по п. 81 или п. 82, включающий связывающий пептид (LP) между по меньшей мере одним из по меньшей мере одного CD28 sdAb и Fc-областью.

84. Мультиспецифический Fc-слитый белок по любому из пп. 81-83, где CD28-связывающий полипептид включает связывающий пептид (LP) между по меньшей мере

одним из одного или более BD и Fc-областью.

85. Мультиспецифический Fc-слитый белок по п. 83 или п. 84, где LP представляет собой нерасщепляемый линкер.

86. Мультиспецифический Fc-слитый белок по любому из пп. 83-85, где LP представляет собой пептид длиной примерно от 1 до 20 аминокислот.

87. Мультиспецифический Fc-слитый белок по любому из пп. 83-86, где LP представляет собой или включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-7, 89, 90, 123-129, 244 и 249.

88. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-80 или мультиспецифический Fc-слитый белок по любому из пп. 81-87, где по меньшей мере одно CD28 sdAb не способно, или по существу не способно, связываться или взаимодействовать с CD28, пока по меньшей мере один из одного или более BD не будет связан со своим антигеном.

89. Мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-80 или мультиспецифический Fc-слитый белок по любому из пп. 81-87, где по меньшей мере одно CD28 sdAb не способно, или по существу не способно, связываться или взаимодействовать с CD28, пока каждый из одного или более BD не будет связан со своим антигеном.

90. Анти-CD28 однодоменное антитело (sdAb), включающее: определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194, 197, 396, 397 и 398.

91. Анти-CD28 sdAb по п. 90, включающее:

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:393, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

92. Анти-CD28 однодоменное антитело (sdAb), включающее: определяющую комплементарность область 1 (CDR1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:189, 192, 195, 198, 199, 200 и 201; определяющую комплементарность область 2 (CDR2), включающую

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:190, 193, 196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и определяющую комплементарность область 3 (CDR3), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 194, 197, 396, 397 и 398.

93. Анти-CD28 sdAb по п. 92, где анти-CD28 sdAb включает:

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:198, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:199, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:200, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:205, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:207, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:208, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:209, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:210, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:211, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:212, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:386, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:387, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:202, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:390, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:391, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:203, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:392, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:393, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:204, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:394, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:395, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:201, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:196, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:396;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:388, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:389, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:197;

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:397; или

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:195, CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:206, и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:398.

94. Анти-CD28 однодоменное антитело (sdAb), включающее:

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:215; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:220; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:239; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:280; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:342; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:343; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:347; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:353; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:354; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:356; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:360; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO:362; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:370; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:373; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:377; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:384; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

95. Анти-CD28 однодоменное антитело (sdAb), включающее:

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:186; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:187; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:188; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:213; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:214; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:215;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:216; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:217; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:218; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:219; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:221; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:222; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:223; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:224; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:225; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:226; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:227; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:228; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:229; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:230; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:231; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:232; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:233; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:234; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:235; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:236; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:237; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:238; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:239; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:280; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:342; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:343; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:344; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:345; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:346; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:347;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:348; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:349; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:350; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:351; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:352; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:353; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:354; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:355; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:356; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:357; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:358; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:359; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:360; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:361; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:362; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:363; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:364; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:365; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:366; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:367; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:368; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:369; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:370; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:371; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:372; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:373; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:374; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:375; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:376; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:377;

CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:378; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:379; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:380; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:381; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:382; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:383; CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:384; или CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:385.

96. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-95, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385.

97. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-95, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:186, 187, 188, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 280, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 и 385.

98. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-97, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 186, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:186 и/или (iii) последовательность аминокислот,

которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 186.

99. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-98, где анти-CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:189; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:190; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:191.

100. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-97, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 187, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:187 и/или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 187.

101. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-97 и 100, где анти-CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:192; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:193; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:194.

102. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-97, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в (i) SEQ ID NO: 188, (ii) гуманизированный вариант SEQ ID NO:188 и/или (iii) последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 188.

103. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-97 и 102, где анти- CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:197, 396, 397 и 398.

104. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-97, 102 и 103, где анти-CD28 sdAb включает CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197,

соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 386 и 197, соответственно;SEQ ID NO: 201, 387 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 390 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 391 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 392 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 393 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 394 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 395 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 195, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 397, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 206 и 398, соответственно.

105. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-97 и 102, где анти- CD28 sdAb включает CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:195, 198, 199, 200 и 201; CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:196, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 и 395; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:197, 396, 397 и 398.

106. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-07, 102 и 105, где анти-CD28 sdAb включает CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 195, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 198, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 199, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 200, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 205 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 207 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 208 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 209 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 210 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 211 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 212 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 386 и 197, соответственно;SEQ ID NO: 201, 387 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 202 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 389 и 197,

соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 206 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 390 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 391 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 203 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 392 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 393 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 204 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 201, 394 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 395 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 397, соответственно; SEQ ID NO: 201, 196 и 398, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 396, соответственно; SEQ ID NO: 195, 388 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 389 и 197, соответственно; SEQ ID NO: 195, 206 и 397, соответственно; или SEQ ID NO: 195, 206 и 398, соответственно.

107. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-97 и 102-104, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385.

108. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-97, 102-104 и 107, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-239, 280 и 342-385.

109. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-97, 102, 105 и 106, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385.

110. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-97, 102, 105, 106 и 109, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:213-219, 221-239, 280 и 342-385.

111. Анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-110, где анти-CD28 sdAb включает аминокислотную модификацию, которая уменьшает связывание с белком A.

112. Анти-CD28 sdAb по п. 111, где аминокислотная модификация представляет собой G65D, в соответствии с Kabat, в каркасной области 3 (FR3).

113. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-35; слитый белок по любому из пп. 36-54 и 81-89; мультиспецифический связывающий белок по любому из пп. 55-80 и 88-89; или анти-CD28 однодоменное антитело по любому из пп. 90-112, которое не включает CD3-связывающую область.

114. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-35; слитый белок по

любому из пп. 36-54 и 81-89; мультиспецифический связывающий белок по любому из пп. 55-80 и 88-89; или анти-CD28 однодоменное антитело по любому из пп. 90-112, которое включает CD3-связывающую область.

115. Мультиспецифическая конструкция, включающая по меньшей мере одно анти-CD28 однодоменное антитело (sdAb) по любому из пп. 90-112, один или более связывающих доменов (BD), которые связываются с антигеном, отличным от CD28, и CD3-связывающую область.

116. Мультиспецифическая конструкция по п. 115, где BD связывается с TAA.

117. Мультиспецифическая конструкция по п. 115 или п. 116, где BD представляет собой однодоменное антитело (sdAb).

118. CD28-связывающий полипептид по п. 114; слитый белок по п. 114; мультиспецифический связывающий белок по п. 114; анти-CD28 однодоменное антитело по п. 114; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 115-117, где CD3-связывающая область связывается с CD3 (CD3ε).

119. CD28-связывающий полипептид по п. 114 или п. 118; слитый белок по п. 114 или п. 118; мультиспецифический связывающий белок по п. 114 или п. 118; анти-CD28 однодоменное антитело по п. 114 или п. 118; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 115-118, где CD3-связывающая область представляет собой анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

120. CD28-связывающий полипептид, слитый белок, мультиспецифический связывающий белок, анти-CD28 однодоменное антитело или мультиспецифическая конструкция по п. 1по п. 120, где анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL).

121. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 114 и 118-120; слитый белок по любому из пп. 114 и 118-120; мультиспецифический связывающий белок по любому из пп. 114 и 118-120; анти-CD28 однодоменное антитело по любому из пп. 114 и 118-120; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 115-120, где CD3-связывающая область является одновалентной.

122. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 114 и 118-121; слитый белок по любому из пп. 114 и 118-121; мультиспецифический связывающий белок по любому из пп. 114 и 118-121; анти-CD28 однодоменное антитело по любому из пп. 114 и 118-121; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 115-121, где CD3-связывающая область представляет собой вариабельный фрагмент (Fv), включающий вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL).

123. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 114 и 118-121; слитый белок по любому из пп. 114 и 118-121; мультиспецифический связывающий белок по любому из пп. 114 и 118-121; анти-CD28 однодоменное антитело по любому из пп. 114 и 118-121; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 115-121, где анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент не является одноцепочечным антителом, как

вариант, не является одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv).

124. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 114 и 118-123; слитый белок по любому из пп. 114 и 118-123; мультиспецифический связывающий белок по любому из пп. 114 и 118-123; анти-CD28 однодоменное антитело по любому из пп. 114 и 118-123; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 115-123, где CD28-связывающий полипептид включает Fc-область иммуноглобулина.

125. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция по п. 124, где Fc-область включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с любой из SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 и 13.

126. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция по п. 124 или п. 125, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1.

127. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 124-126, где Fc-область представляет собой человеческий IgG1, при этом необязательно Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 8.

128. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 124-127, где Fc-область представляет собой гетеродимерную Fc-область.

129. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 124-128, где Fc-область демонстрирует эффекторную функцию.

130. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 124-128, где Fc-область включает полипептид, включающий одну или более аминокислотных модификаций, которые уменьшают эффекторную функцию и/или уменьшают связывание с эффекторной молекулой, выбранной из Fc-гамма рецептора и C1q.

131. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция по п. 130, где одна или более аминокислотных модификаций представляют

собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235.

132. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция по п. 130 или п. 131, где одна или более аминокислотных модификаций представляют собой делецию одного или более из Glu233, Leu234 или Leu235, при этом необязательно Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 9.

133. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 124-132, где CD28-связывающий полипептид представляет собой димер.

134. CD28-связывающий полипептид; слитый белок; мультиспецифический связывающий белок; анти-CD28 однодоменное антитело; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 124-133, где Fc представляет собой гетеродимерную Fc, а VH и VL, которые составляют анти-CD3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, связаны с противоположными полипептидами гетеродимерной Fc.

135. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 114 и 118-134; слитый белок по любому из пп. 114 и 118-134; мультиспецифический связывающий белок по любому из пп. 114 и 118-134; анти-CD28 однодоменное антитело по любому из пп. 114 и 118-134; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 115-134, где CD3-связывающая область не способна, или по существу не способна, связываться или взаимодействовать с CD3, пока по меньшей мере один из одного или более BD не будет связан со своим антигеном.

136. CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 114 и 118-135; слитый белок по любому из пп. 114 и 118-135; мультиспецифический связывающий белок по любому из пп. 114 и 118-135; анти-CD28 однодоменное антитело по любому из пп. 114 и 118-135; или мультиспецифическая конструкция по любому из пп. 115-135, где CD3-связывающая область не способна, или по существу не способна, связываться или взаимодействовать с CD3, пока по меньшей мере одно из по меньшей мере одного CD28 sdAb не будет связано с CD28.

137. Полинуклеотид(полинуклеотиды), кодирующий: CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-35 и 113-136; слитый белок по любому из пп. 36-42, 45-47, 49-52 и 113-136; мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-63, 66-68, 70-80, 88-89 и 113-136; или анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-136.

138. Полинуклеотид, включающий первую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую первый полипептид CD28-связывающего полипептида по любому из пп. 1-35 и 113-136; слитый белок по любому из пп. 36-55, 81-89 и 113-136; или мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-80, 88-89 и 113-

136, и вторую нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую второй полипептид, где первая и вторая нуклеиновокислотные последовательности разделены внутренним сайтом входа в рибосому (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает пропуск рибосомы.

139. Полинуклеотид по п. 138, где первая нуклеиновокислотная последовательность и вторая нуклеиновокислотная последовательность функционально связаны с одним и тем же промотором.

140. Полинуклеотид по п. 138 или п. 139, где нуклеиновая кислота, кодирующая саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает пропуск рибосомы, выбрана из T2A, P2A, E2A и F2A.

141. Вектор, включающий полинуклеотид по любому из пп. 137-140.

142. Вектор по п. 141, который представляет собой вектор экспрессии.

143. Вектор по п. 141 или п. 142, который представляет собой вирусный вектор или эукариотический вектор, при этом необязательно эукариотический вектор представляет собой вектор млекопитающего.

144. Клетка, включающая полинуклеотид или полинуклеотиды по любому из пп. 137-140, или вектор или векторы по любому из пп. 141-143.

145. Клетка по п. 144, где клетка представляет собой лимфоцит.

146. Клетка по п. 144 или п. 145, где клетка представляет собой Т-клетку или природную киллерную (NK) клетку.

147. Способ получения полипептида, включающий введение в клетку полинуклеотида или полинуклеотидов по любому из пп. 137-140, или вектора или векторов по любому из пп. 141-143 и культивирование клетки в условиях для продуцирования полипептида.

148. Способ по п. 147, дополнительно включающий выделение и очистку полипептида из клетки.

149. Полипептид, полученный способом по п. 147 или п. 148.

150. Фармацевтическая композиция, включающая CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-35 и 113-136; слитый белок по любому из пп. 36-55, 81-89 и 113-136; мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-80, 88-89 и 113-136; или анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-136.

151. Фармацевтическая композиция по п. 150, включающая фармацевтически приемлемый носитель.

152. Фармацевтическая композиция по п. 150 или п. 151, которая является стерильной.

153. Способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, CD28-связывающего полипептида по любому из пп. 1-35 и 113-136; слитого белка по любому из пп. 36-55, 81-89 и 113-136; мультиспецифического связывающего полипептида по любому из пп. 55-80, 88-89 и 113-136; анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-136; или фармацевтической композиции по любому из пп. 150-152.

154. Способ по п. 153, где иммунный ответ повышается против опухоли или рака.

155. Способ по п. 153 или п. 154, где способ лечит заболевание или состояние у субъекта.

156. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества CD28-связывающего полипептида по любому из пп. 1-35 и 113-136; слитого белка по любому из пп. 36-55, 81-89 и 113-136; мультиспецифического связывающего полипептида по любому из пп. 55-80, 88-89 и 113-136; анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-136; или фармацевтической композиции по любому из пп. 150-152.

157. Применение CD28-связывающего полипептида по любому из пп. 1-35 и 113-136; слитого белка по любому из пп. 36-55, 81-89 и 113-136; мультиспецифического связывающего полипептида по любому из пп. 55-80, 88-89 и 113-136; анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-136; или фармацевтической композиции по любому из пп. 150-152.

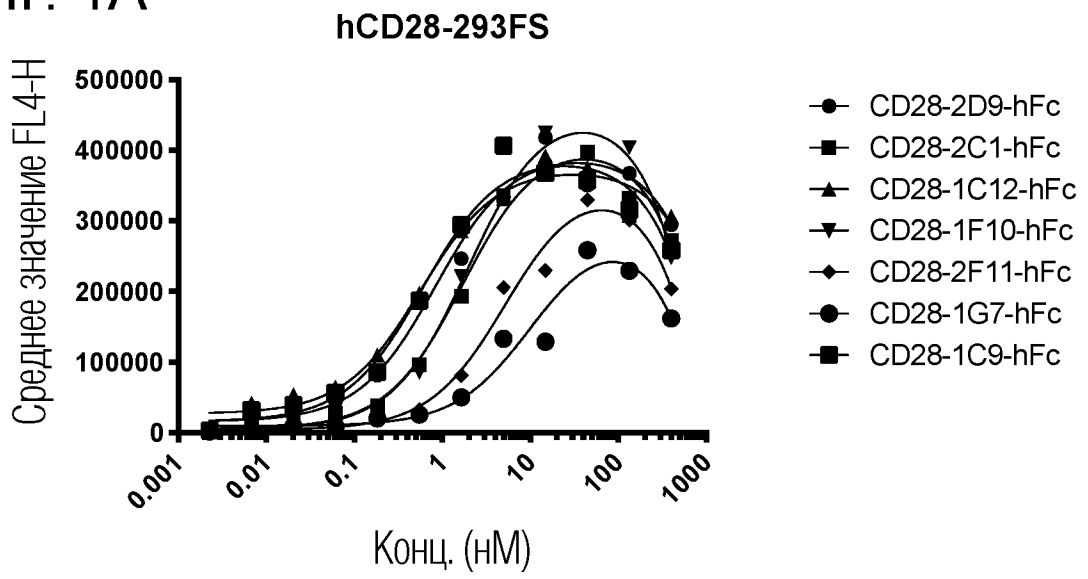
158. Композиция, включающая CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-35 и 113-136; слитый белок по любому из пп. 36-55, 81-89 и 113-136; мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-80, 88-89 и 113-136; или анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-136; или фармацевтическая композиция по любому из пп. 150-152 для применения в лечении заболевания или состояния у субъекта.

159. Композиция, включающая CD28-связывающий полипептид по любому из пп. 1-35 и 113-136; слитый белок по любому из пп. 36-55, 81-89 и 113-136; мультиспецифический связывающий полипептид по любому из пп. 55-80, 88-89 и 113-136; или анти-CD28 sdAb по любому из пп. 90-136; или фармацевтическая композиция по любому из пп. 150-152 для применения для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния у субъекта.

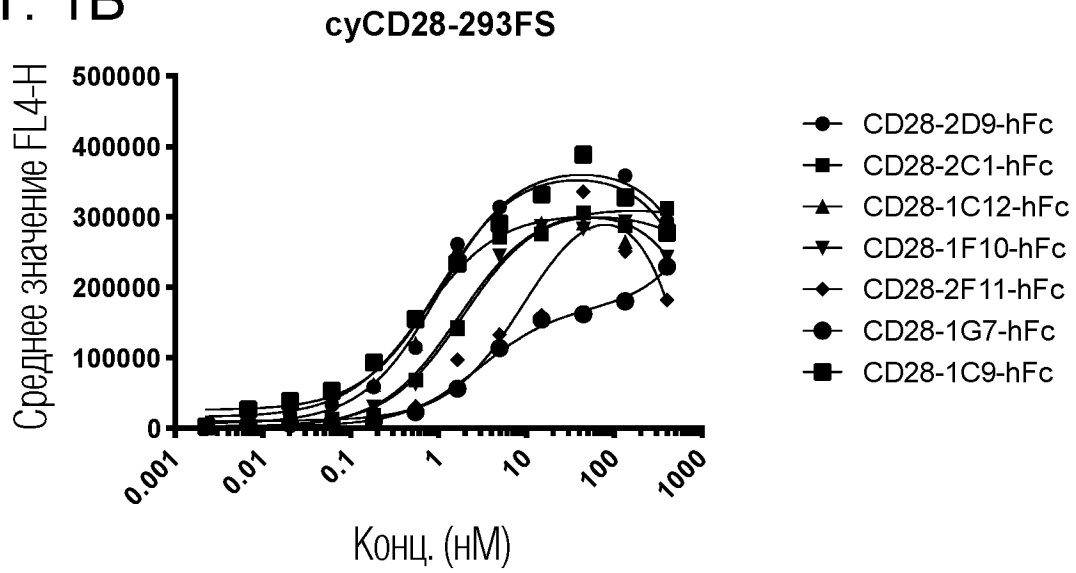
160. Способ по п. 155 или п. 156, применение по п. 157 или композиция по п. 158 или п. 159, где заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак.

161. Способ по п. 155 или п. 156, применение по п. 157 или композиция по п. 158 или п. 159, где субъект представляет собой человека.

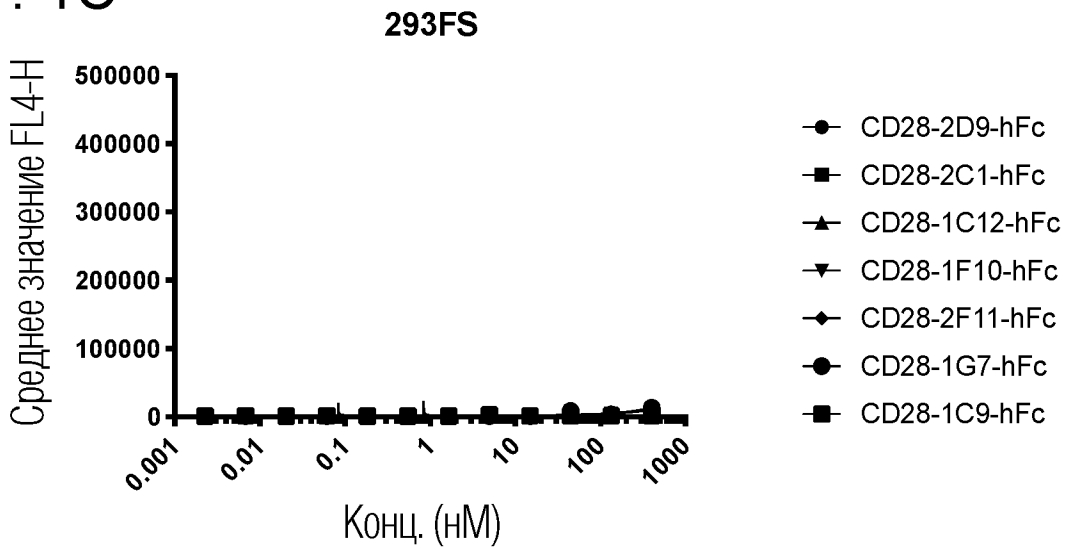
ФИГ. 1А



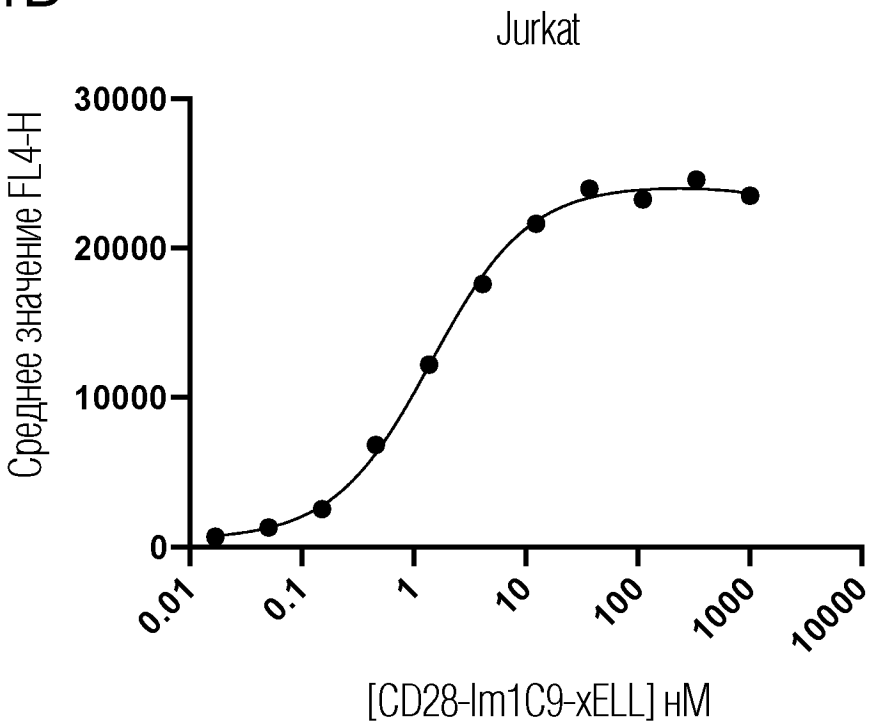
ФИГ. 1В



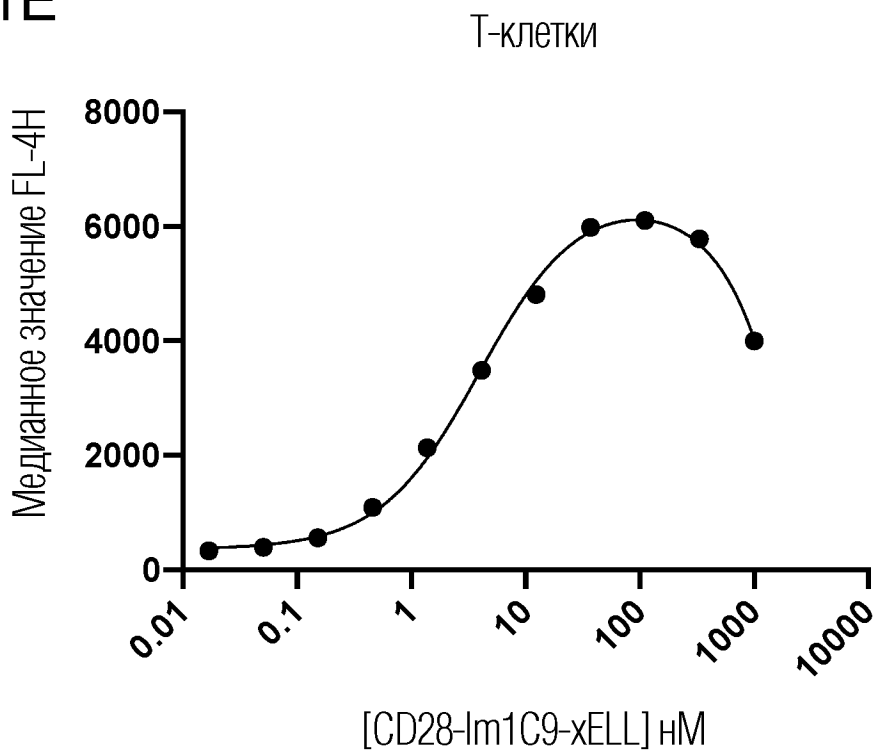
ФИГ. 1С



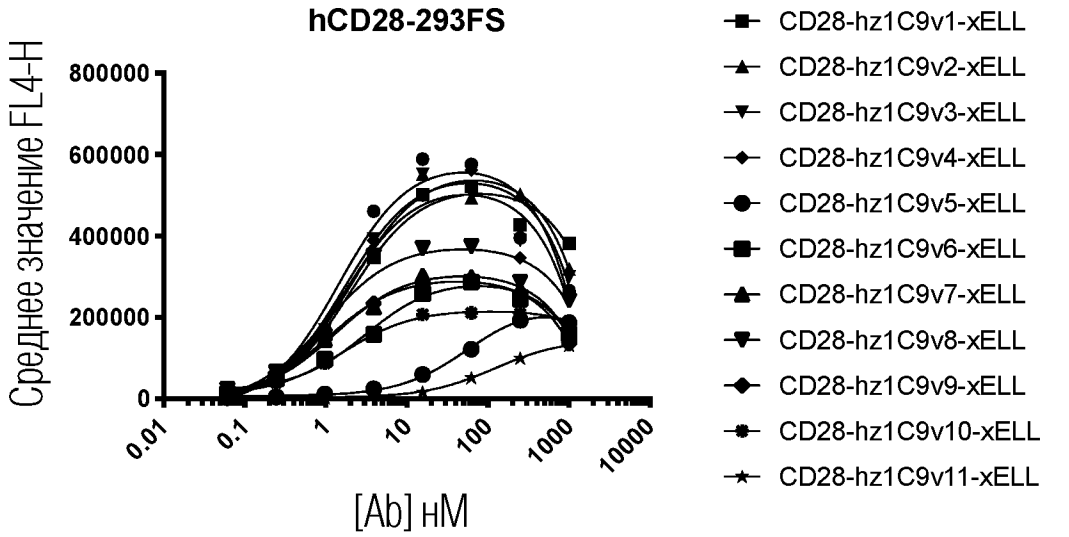
ФИГ. 1D


Jurkat
Среднее значение FL4-H
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
[CD28-Im1C9-xELL] нМ

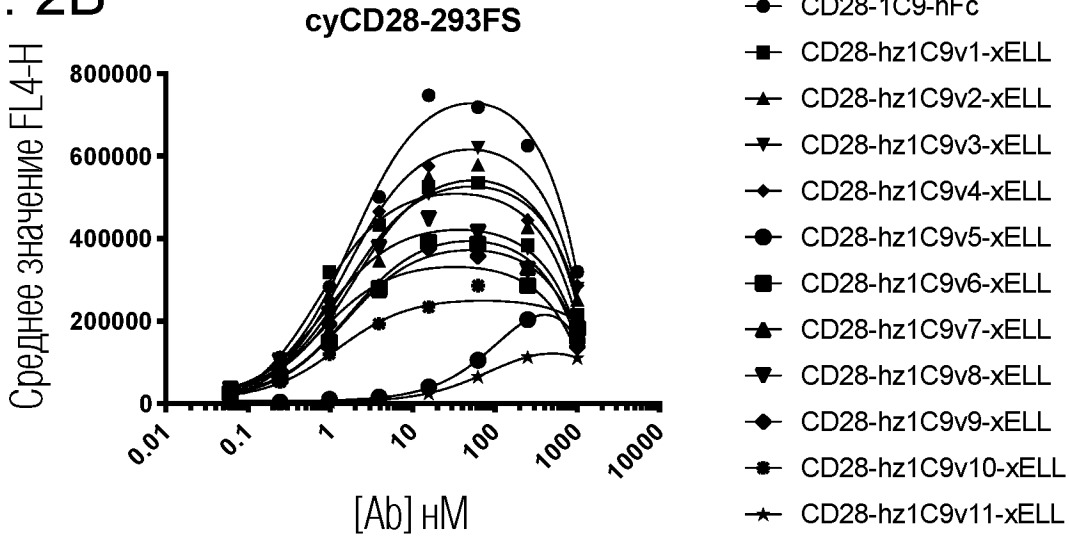
ФИГ. 1E


T-клетки
Медианное значение FL-4H
8000
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
[CD28-Im1C9-xELL] нМ

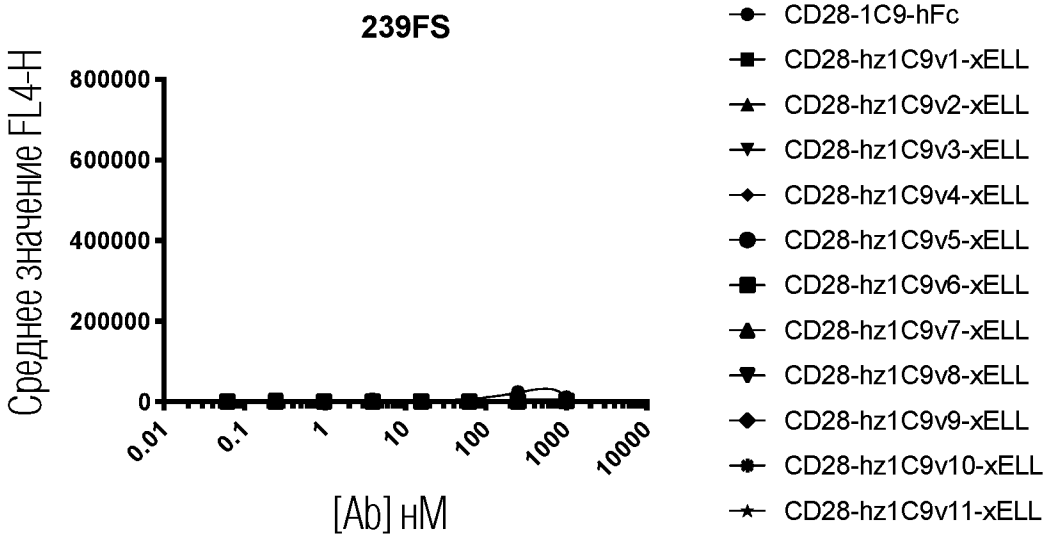
ФИГ. 2A



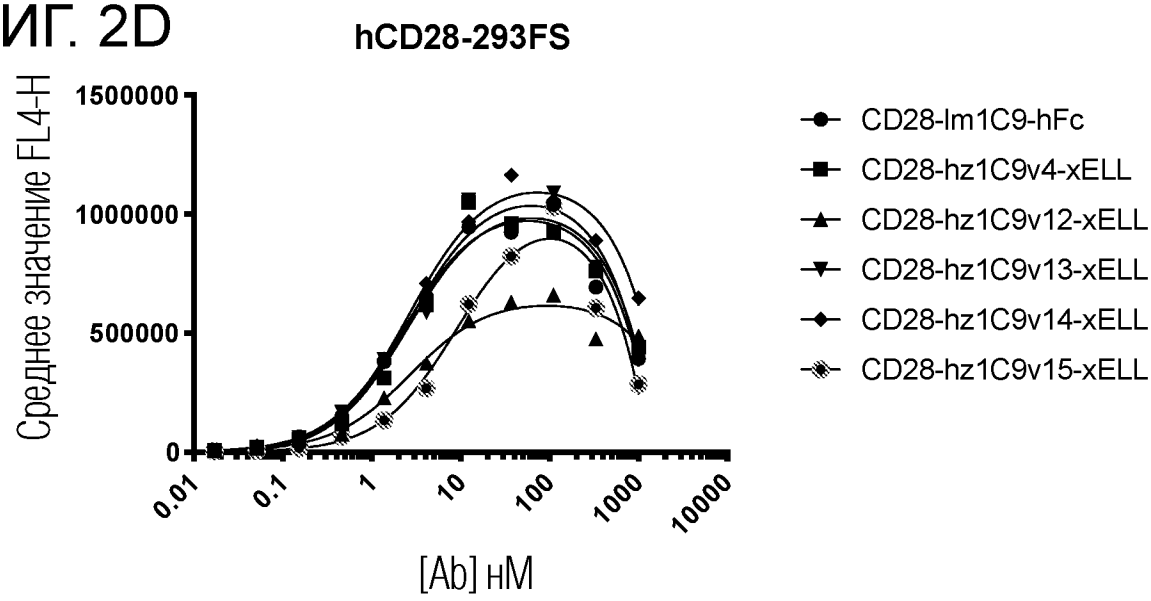
ФИГ. 2B



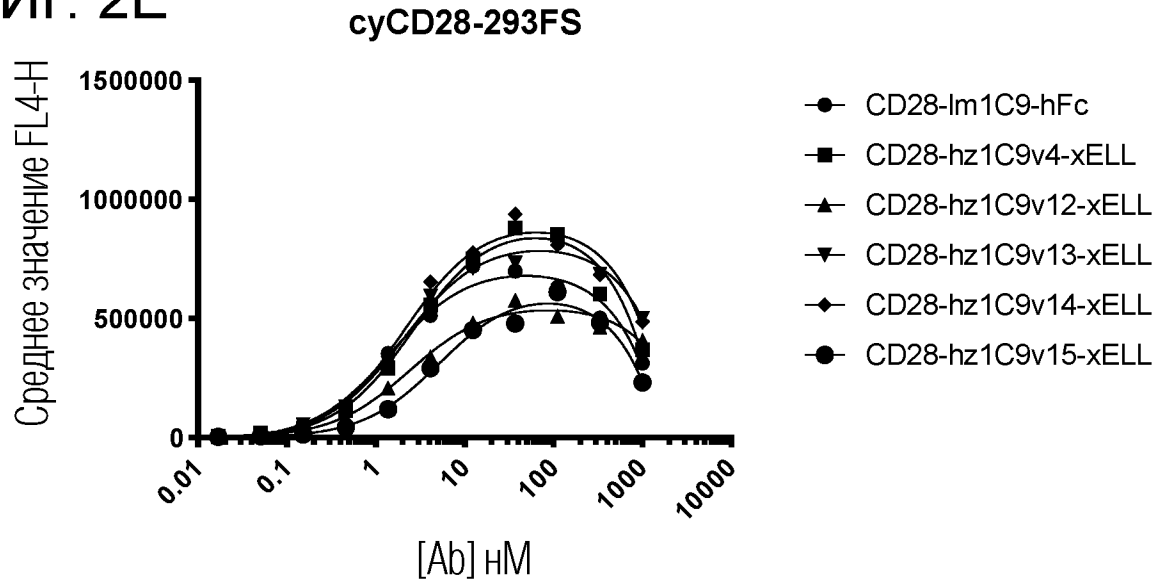
ФИГ. 2C



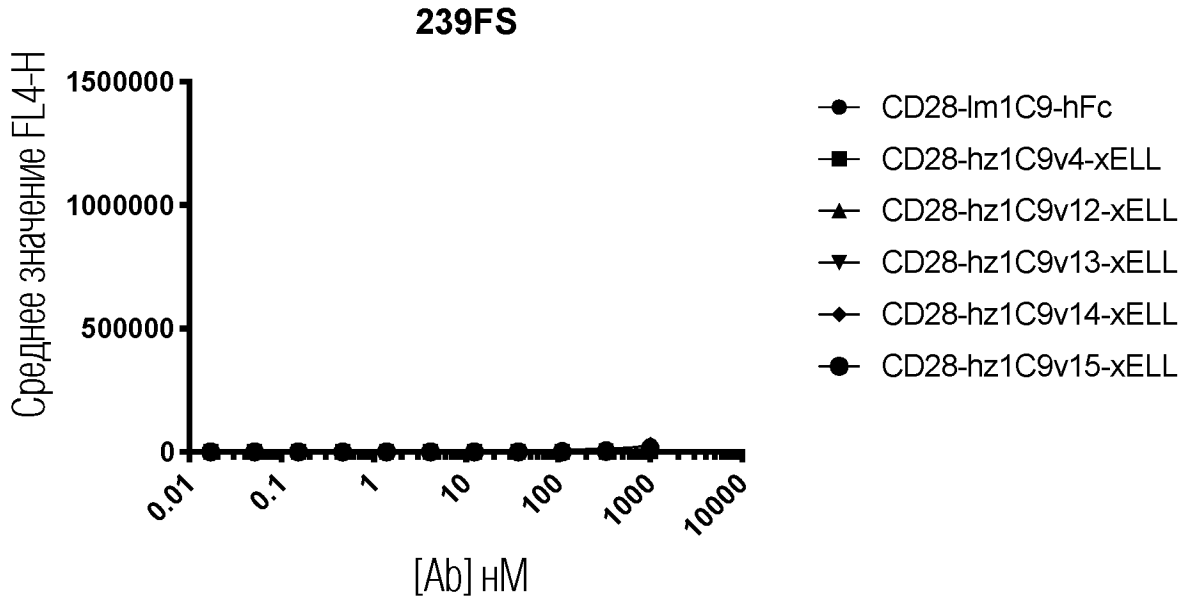
ФИГ. 2D


hCD28-293FS
Среднее значение FL4-H
1500000
1000000
500000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
[Ab] нМ
CD28-lm1C9-hFc
CD28-hz1C9v4-xELL
CD28-hz1C9v12-xELL
CD28-hz1C9v13-xELL
CD28-hz1C9v14-xELL
CD28-hz1C9v15-xELL

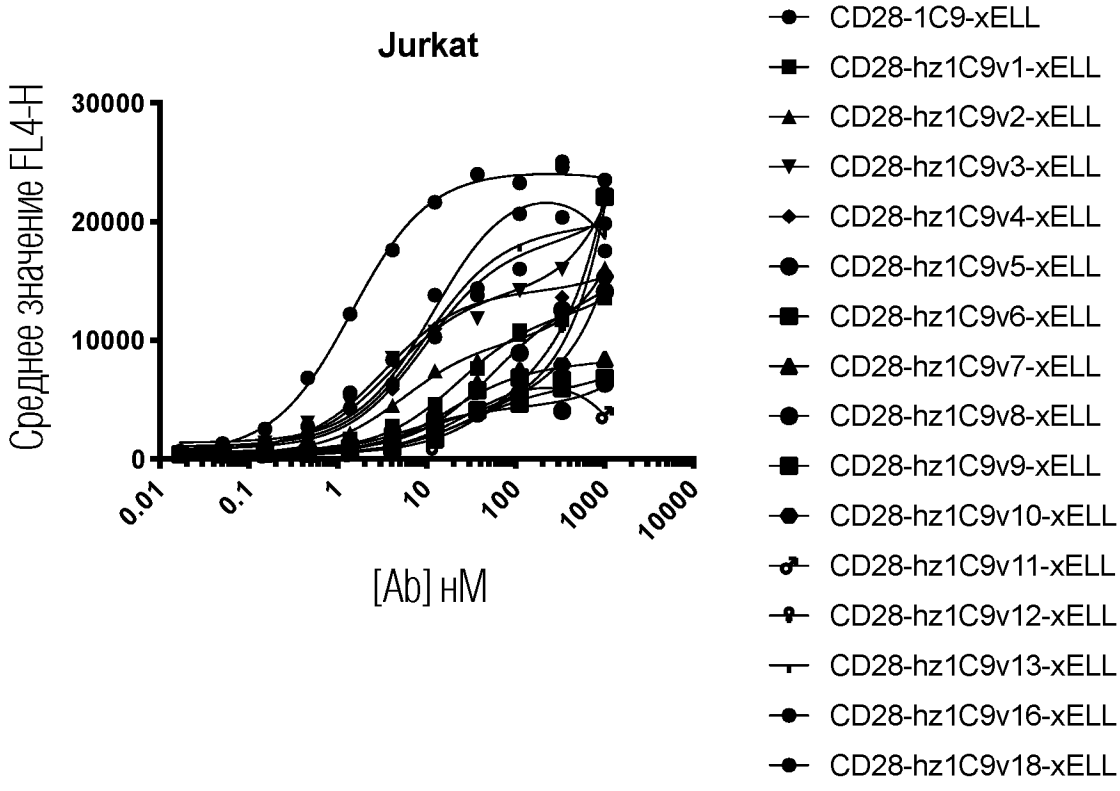
ФИГ. 2E


cyCD28-293FS
Среднее значение FL4-H
1500000
1000000
500000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
[Ab] нМ
CD28-lm1C9-hFc
CD28-hz1C9v4-xELL
CD28-hz1C9v12-xELL
CD28-hz1C9v13-xELL
CD28-hz1C9v14-xELL
CD28-hz1C9v15-xELL

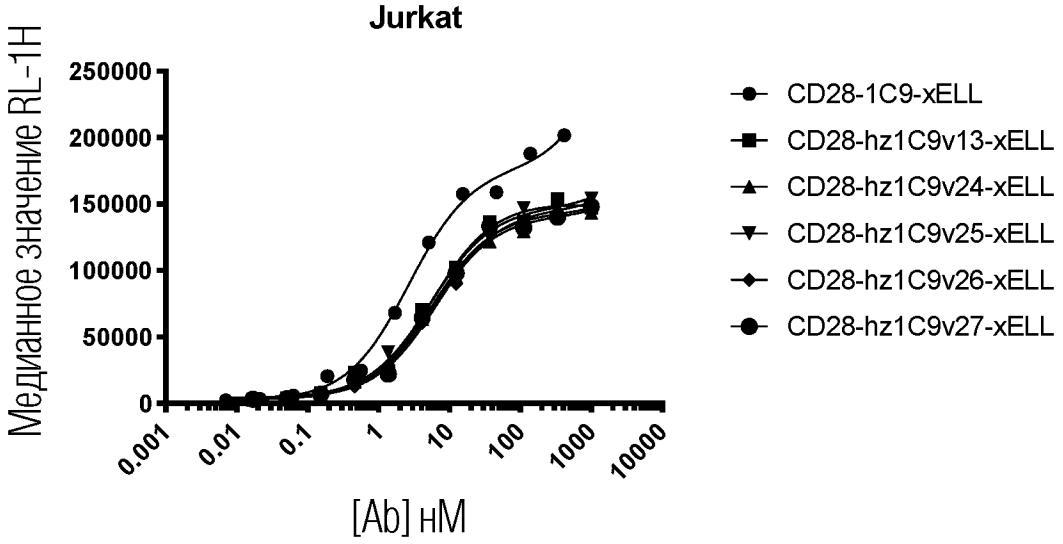
ФИГ. 2F


239FS
Среднее значение FL4-H
1500000
1000000
500000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
[Ab] нМ
CD28-lm1C9-hFc
CD28-hz1C9v4-xELL
CD28-hz1C9v12-xELL
CD28-hz1C9v13-xELL
CD28-hz1C9v14-xELL
CD28-hz1C9v15-xELL

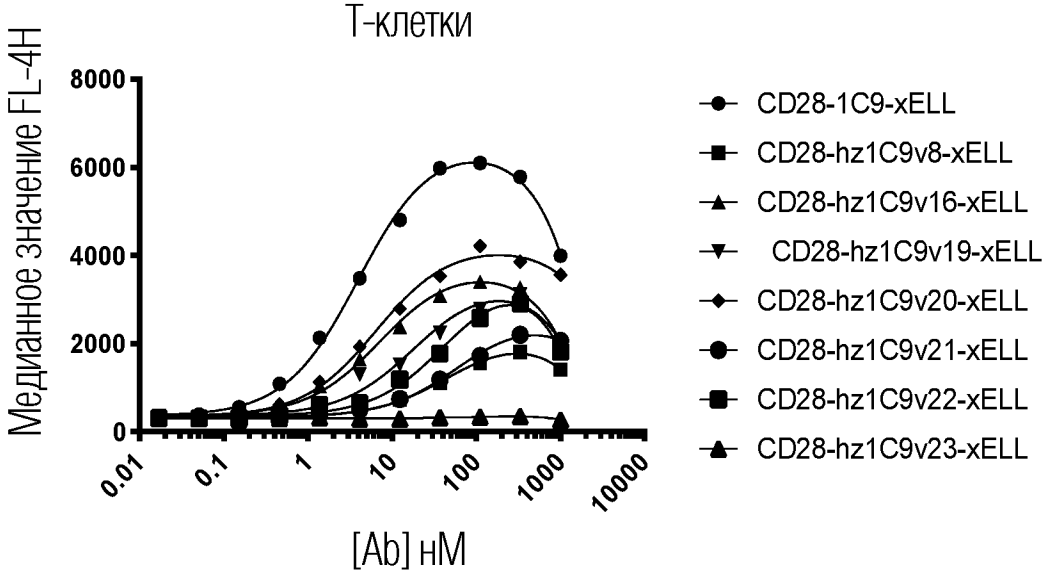
ФИГ. 2G


Jurkat
Среднее значение FL4-H
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
[Ab] нМ
CD28-1C9-xELL
CD28-hz1C9v1-xELL
CD28-hz1C9v2-xELL
CD28-hz1C9v3-xELL
CD28-hz1C9v4-xELL
CD28-hz1C9v5-xELL
CD28-hz1C9v6-xELL
CD28-hz1C9v7-xELL
CD28-hz1C9v8-xELL
CD28-hz1C9v9-xELL
CD28-hz1C9v10-xELL
CD28-hz1C9v11-xELL
CD28-hz1C9v12-xELL
CD28-hz1C9v13-xELL
CD28-hz1C9v16-xELL
CD28-hz1C9v18-xELL

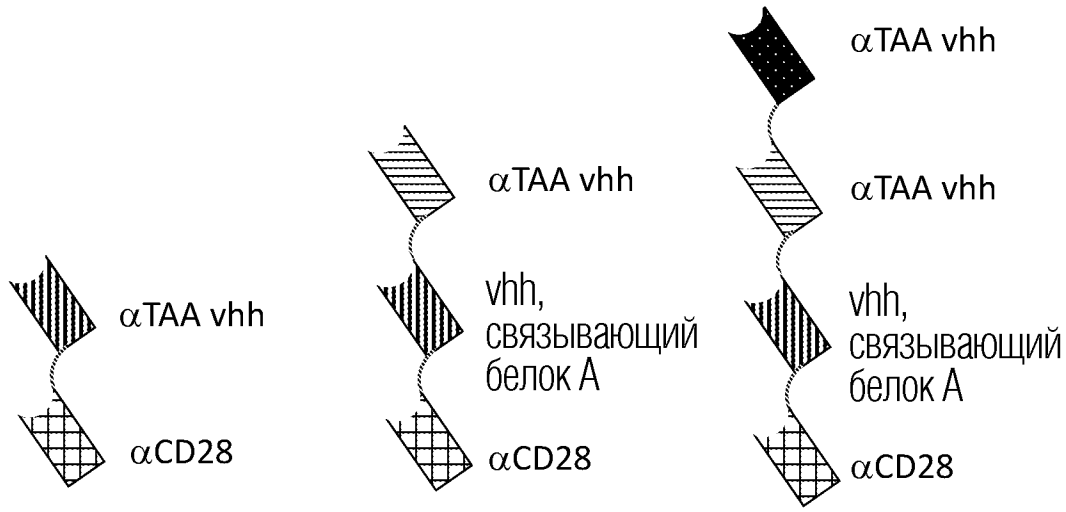
ФИГ. 2H


Jurkat
Медианное значение RL-1H
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
[Ab] нМ
CD28-1C9-xELL
CD28-hz1C9v13-xELL
CD28-hz1C9v24-xELL
CD28-hz1C9v25-xELL
CD28-hz1C9v26-xELL
CD28-hz1C9v27-xELL

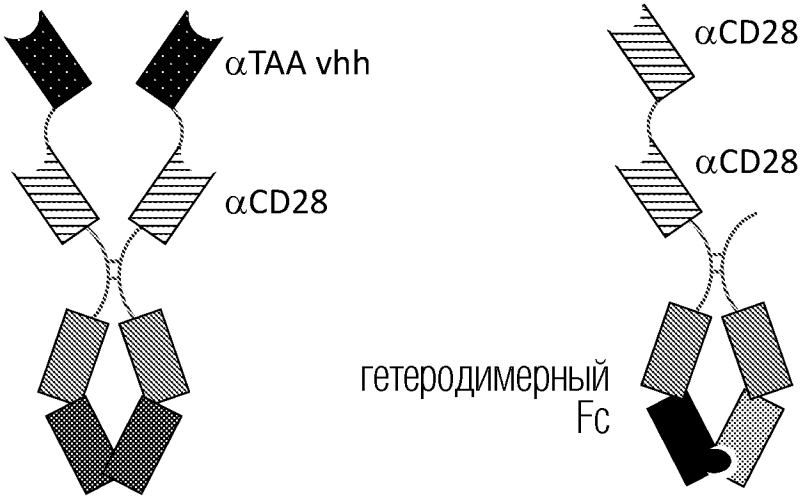
ФИГ. 2I


Т-клетки
Медианное значение FL-4H
8000
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
[Ab] нМ
CD28-1C9-xELL
CD28-hz1C9v8-xELL
CD28-hz1C9v16-xELL
CD28-hz1C9v19-xELL
CD28-hz1C9v20-xELL
CD28-hz1C9v21-xELL
CD28-hz1C9v22-xELL
CD28-hz1C9v23-xELL

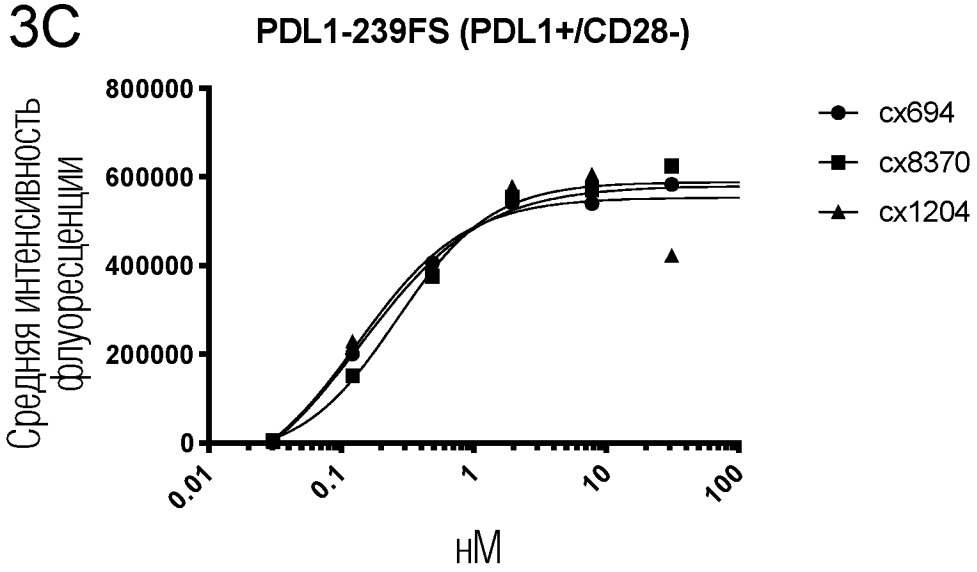
ФИГ. 3A


αTAA vhh
αCD28
αTAA vhh
vhh, связывающий белок A
αCD28
αTAA vhh
αTAA vhh
vhh, связывающий белок A
αCD28

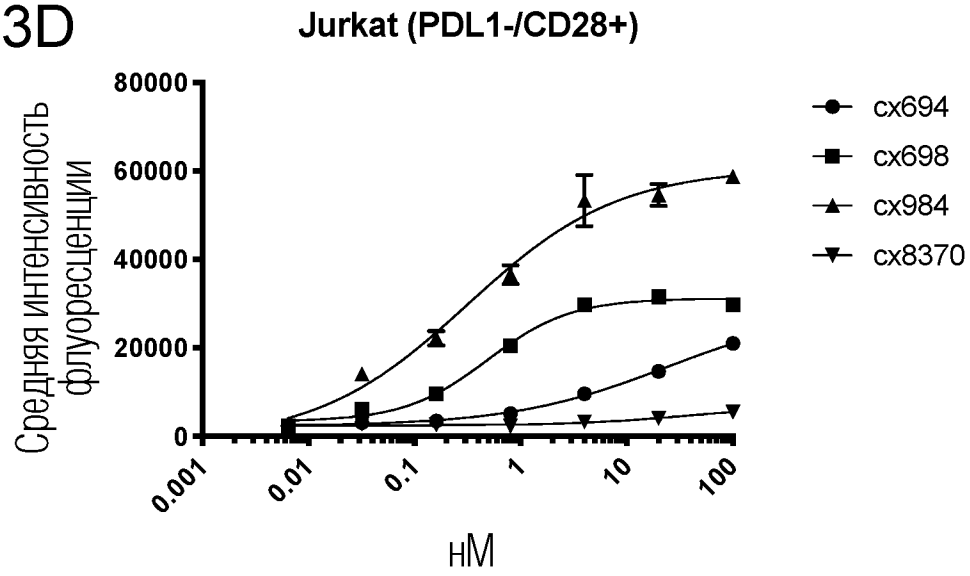
ФИГ. 3B


αTAA vhh
αCD28
αCD28
αCD28
гетеродимерный Fc

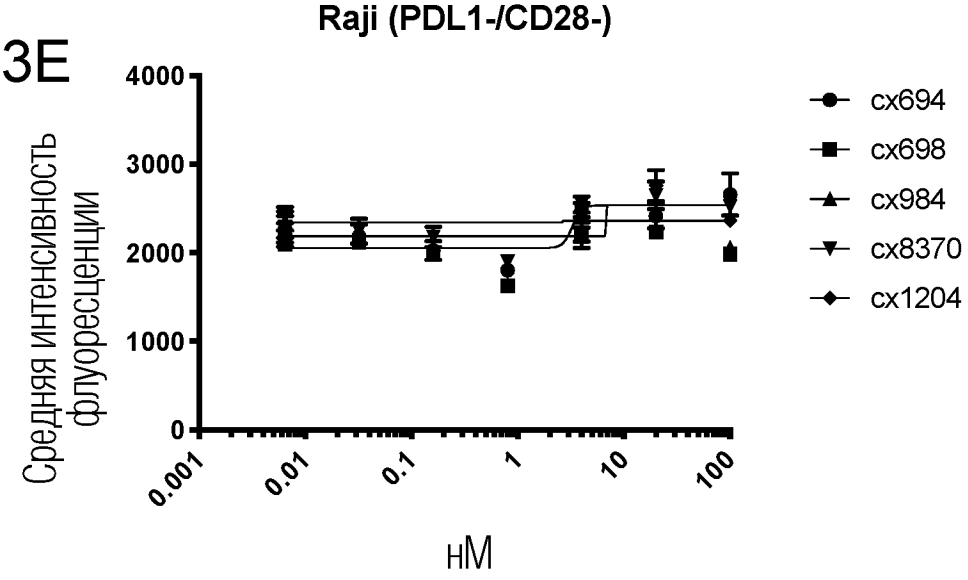
ФИГ. 3C



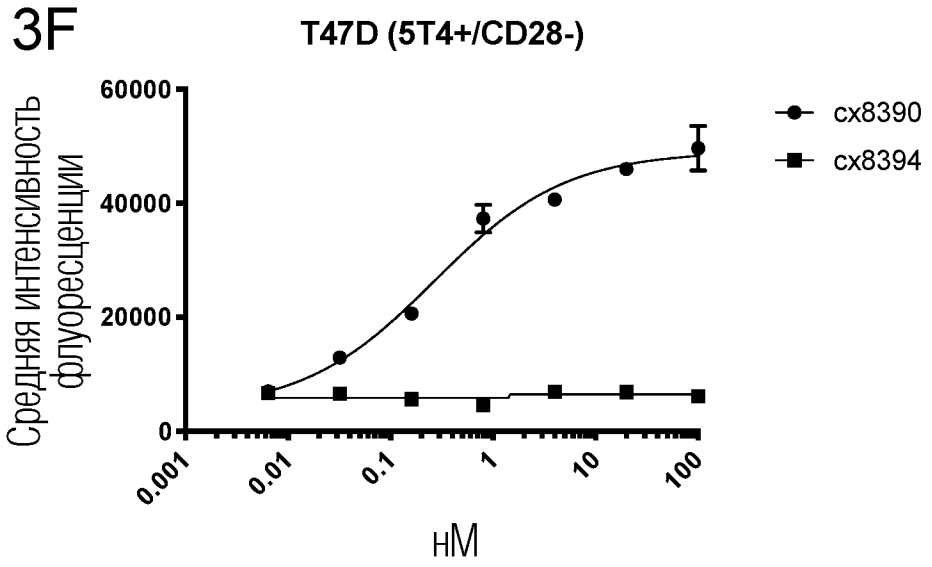
ФИГ. 3D



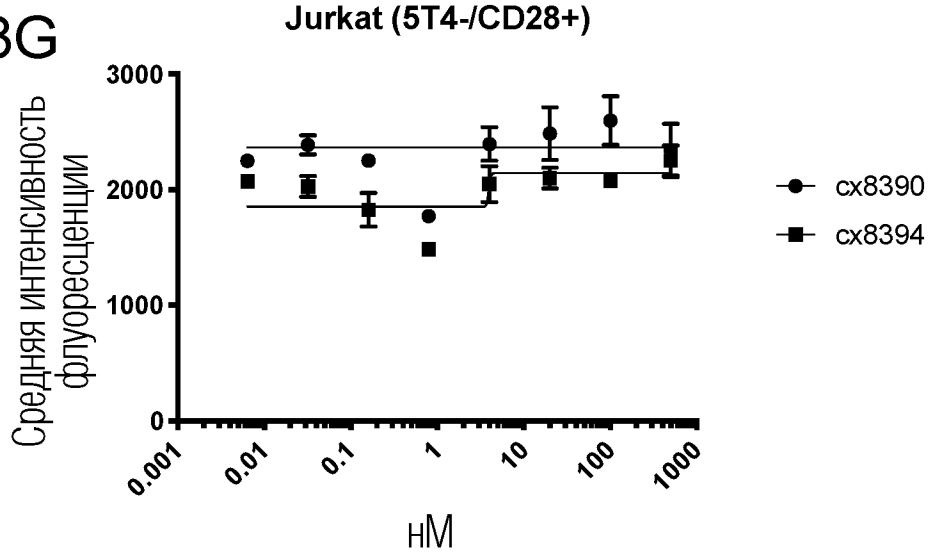
ФИГ. 3E



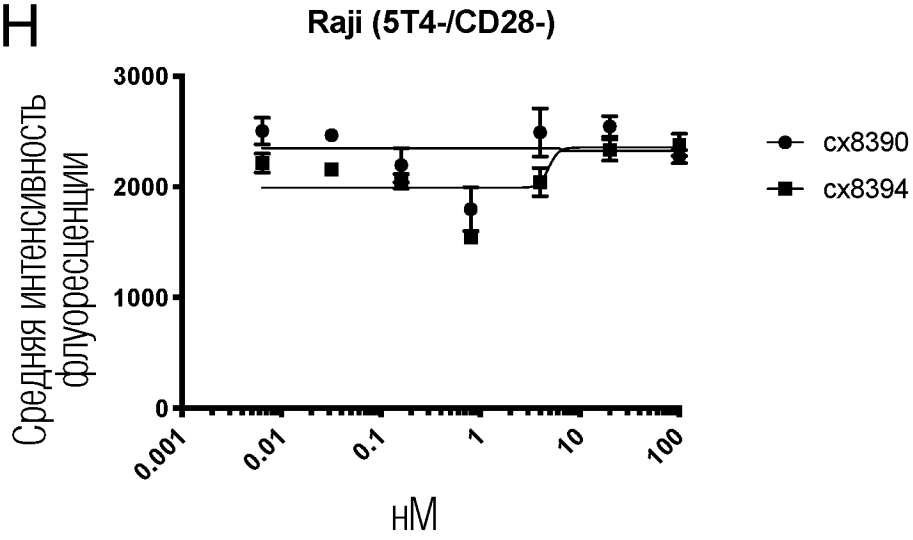
ФИГ. 3F



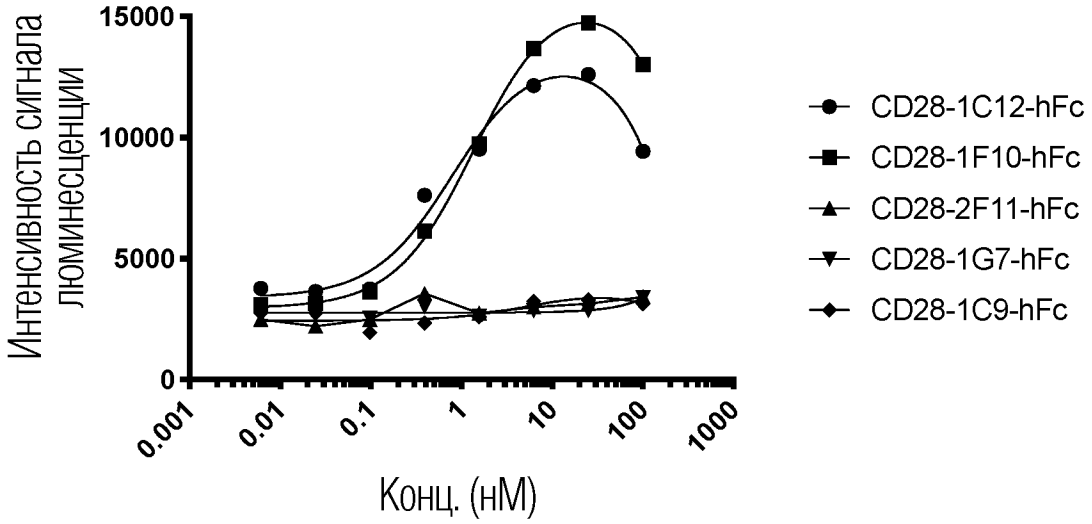
ФИГ. 3G



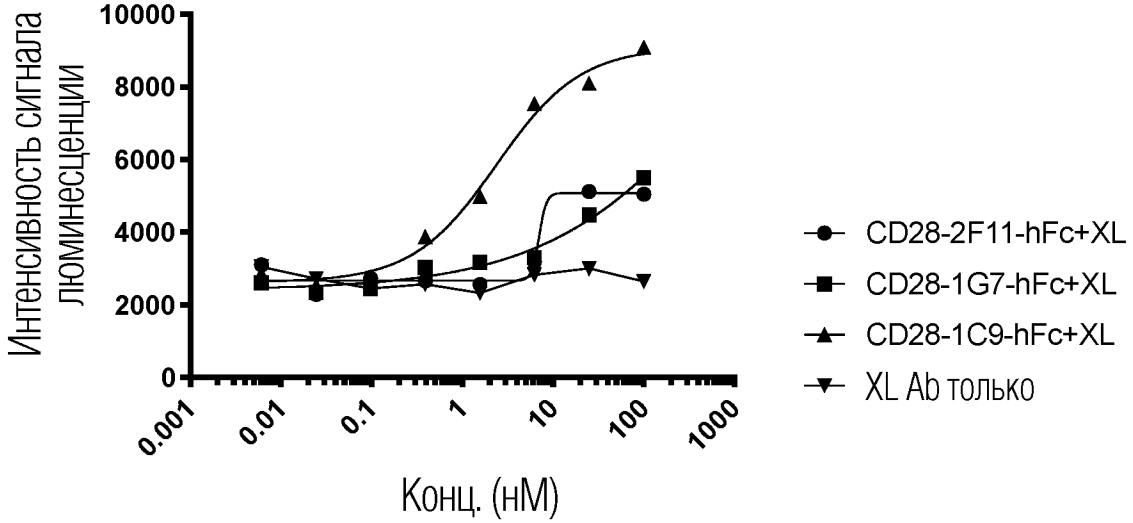
ФИГ. 3H



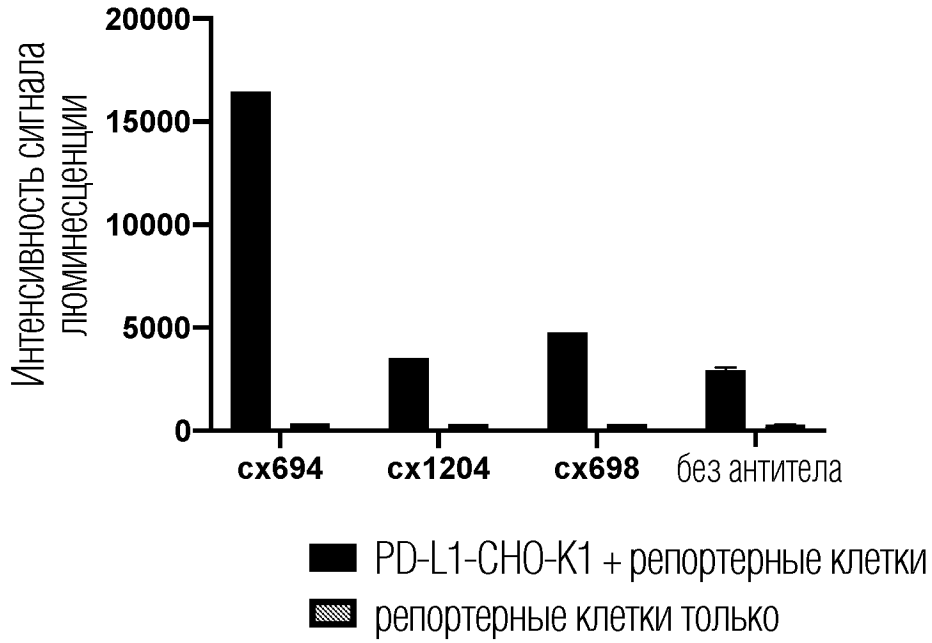
ФИГ. 4А


Интенсивность сигнала люминесценции
15000
10000
5000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Конц. (нМ)
CD28-1C12-hFc
CD28-1F10-hFc
CD28-2F11-hFc
CD28-1G7-hFc
CD28-1C9-hFc

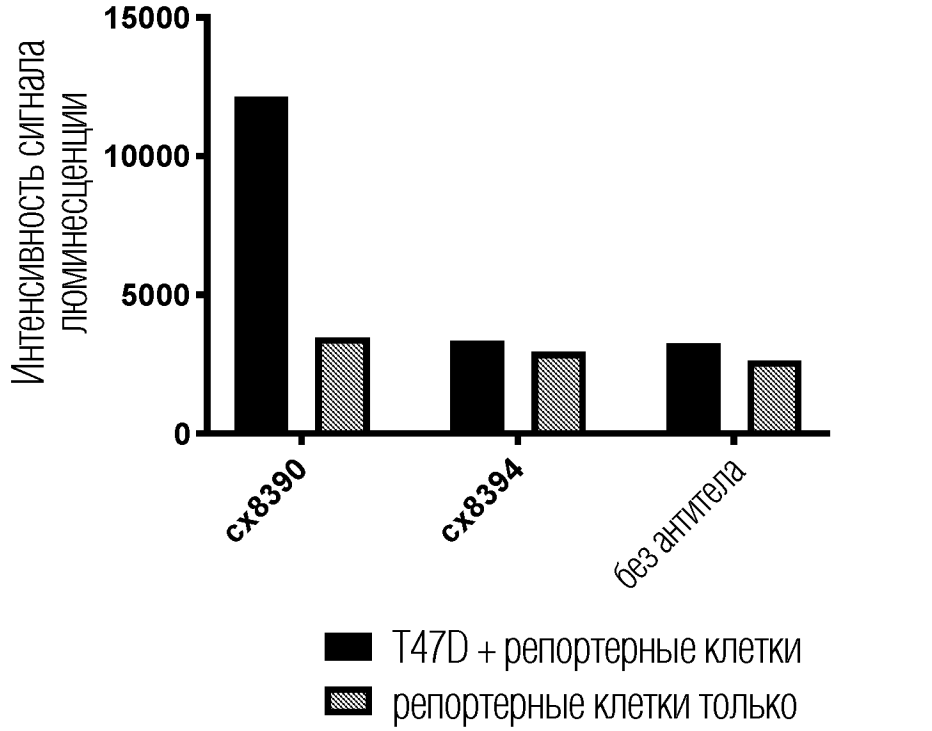
ФИГ. 4В


Интенсивность сигнала люминесценции
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Конц. (нМ)
CD28-2F11-hFc+XL
CD28-1G7-hFc+XL
CD28-1C9-hFc+XL
XL Ab только

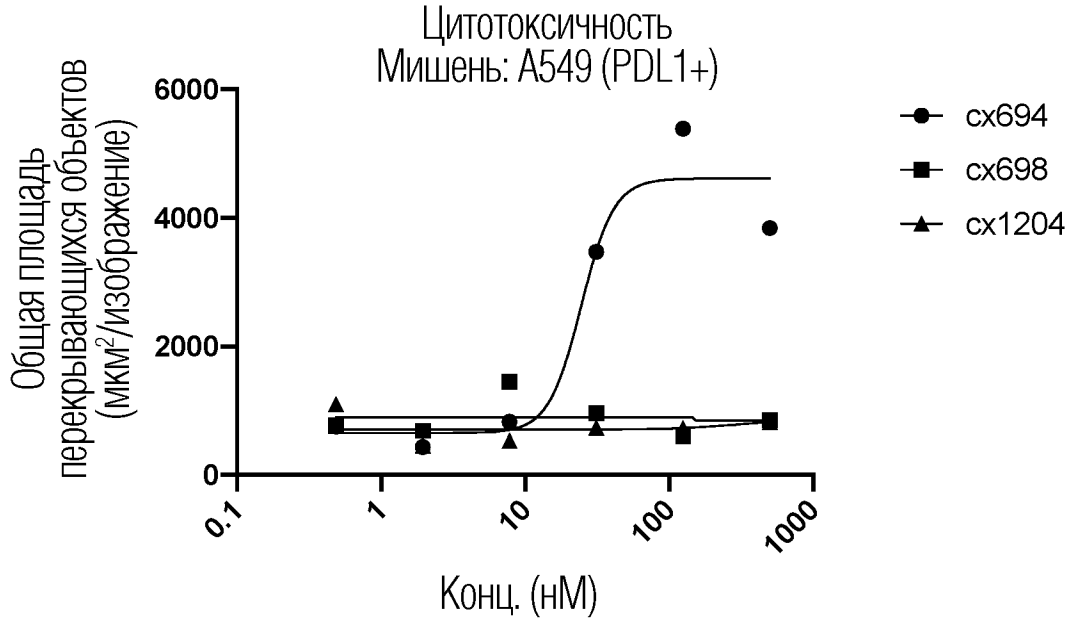
ФИГ. 4C


Интенсивность сигнала люминесценции
20000
15000
10000
5000
0
cx694
cx1204
cx698
без антитела
PD-L1-CHO-K1 + репортерные клетки
репортерные клетки только

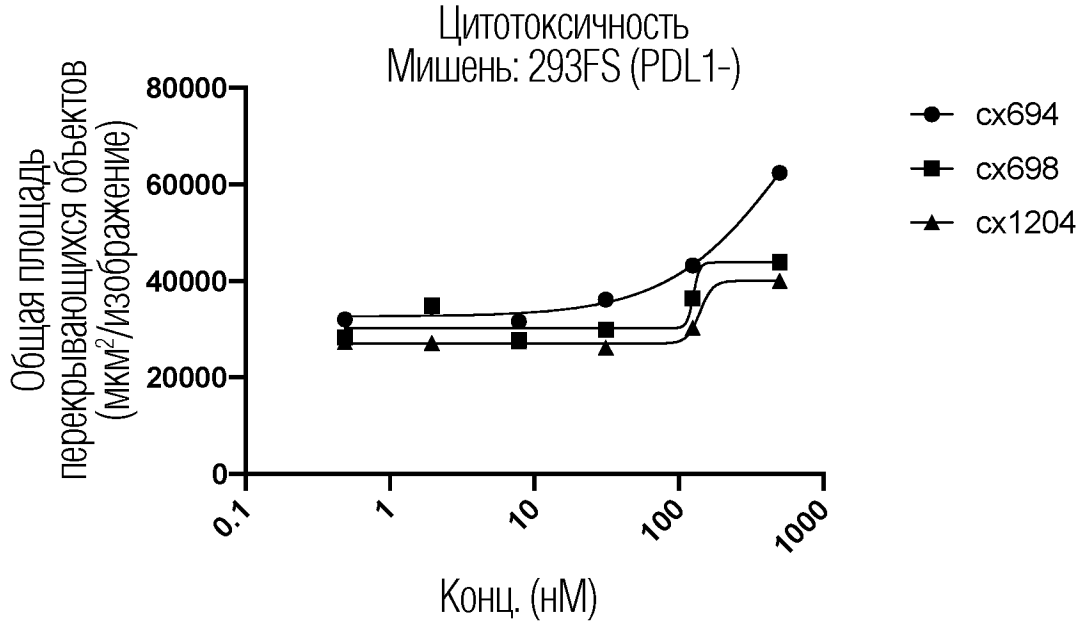
ФИГ. 4D


Интенсивность сигнала люминесценции
15000
10000
5000
0
cx8390
cx8394
без антитела
T47D + репортерные клетки
репортерные клетки только

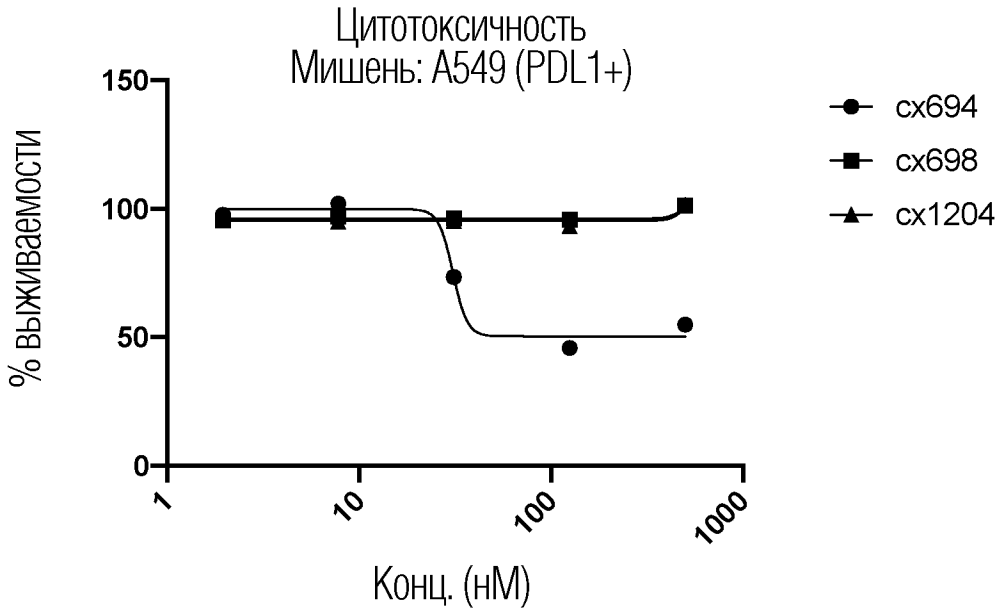
ФИГ. 5A


Цитотоксичность
Мишень: A549 (PDL1+)
Общая площадь перекрывающихся объектов (мкм²/изображение)
6000
4000
2000
0
0.1
1
10
100
1000
Конц. (нМ)
cx694
cx698
cx1204

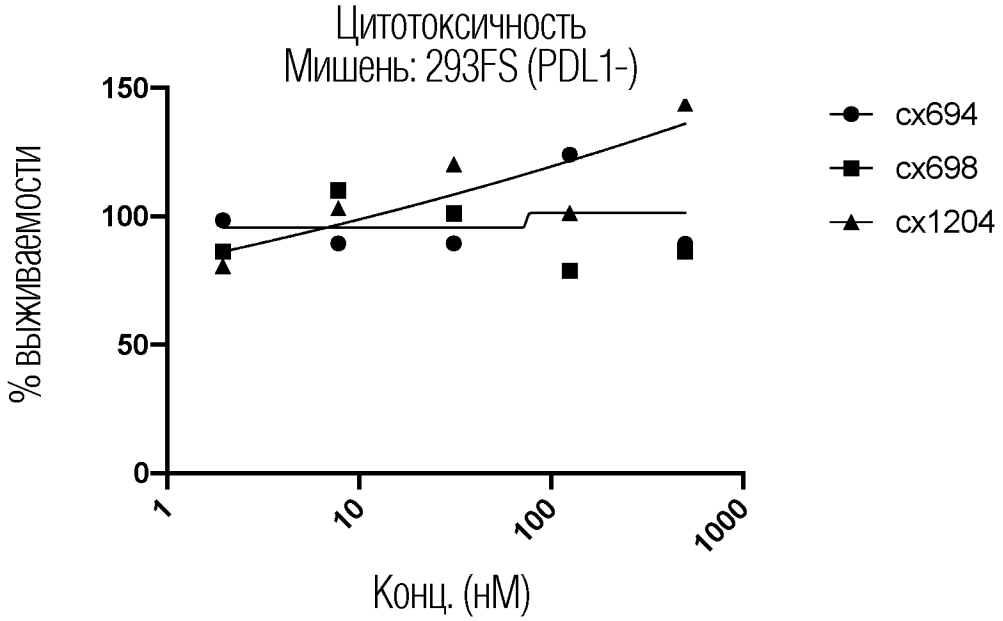
ФИГ. 5B


Цитотоксичность
Мишень: 293FS (PDL1-)
Общая площадь перекрывающихся объектов (мкм²/изображение)
80000
60000
40000
20000
0
0.1
1
10
100
1000
Конц. (нМ)
cx694
cx698
cx1204

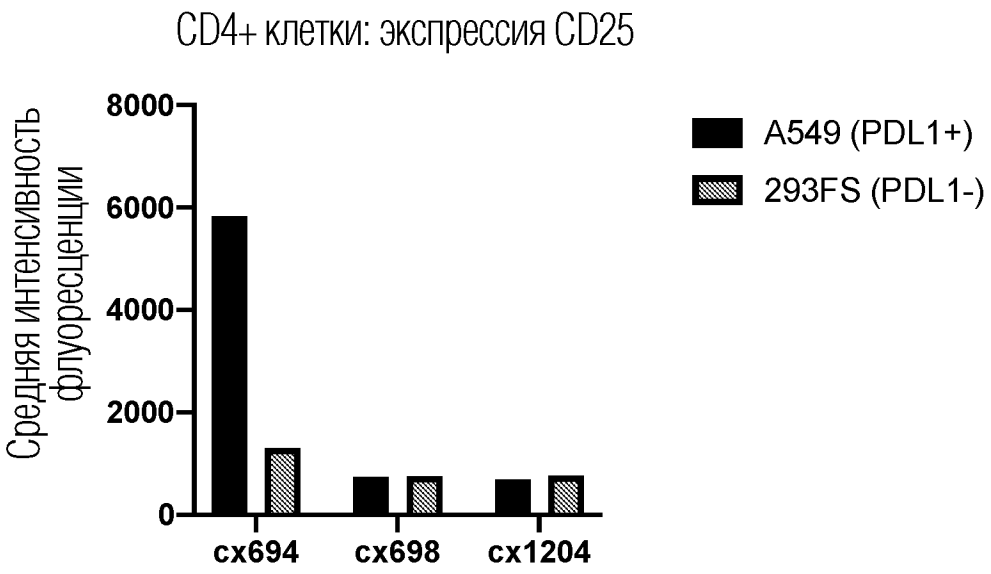
ФИГ. 5C


Цитотоксичность
Мишень: A549 (PDL1+)
% выживаемости
150
100
50
0
1
10
100
1000
Конц. (нМ)
cx694
cx698
cx1204

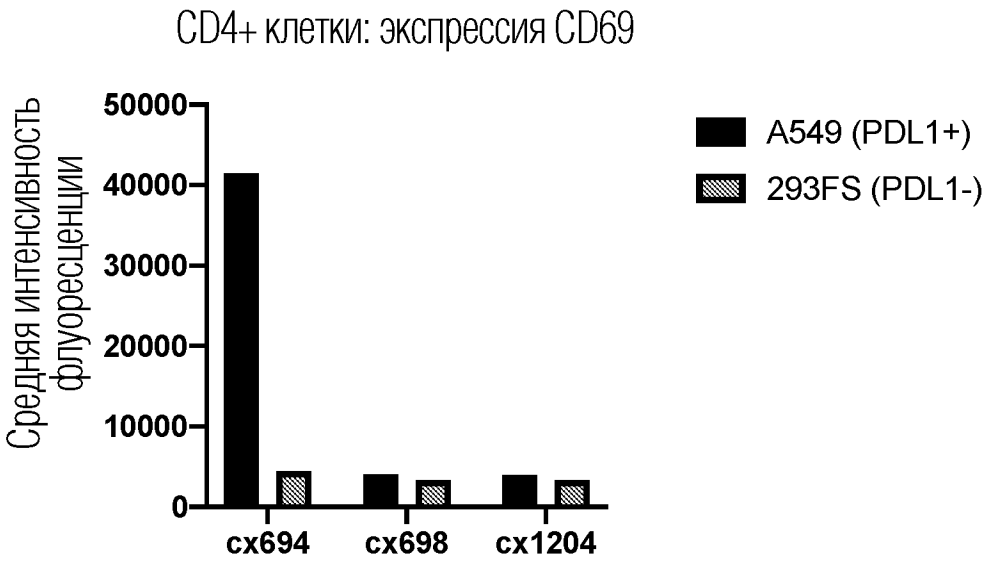
ФИГ. 5D


Цитотоксичность
Мишень: 293FS (PDL1-)
% выживаемости
150
100
50
0
1
10
100
1000
Конц. (нМ)
cx694
cx698
cx1204

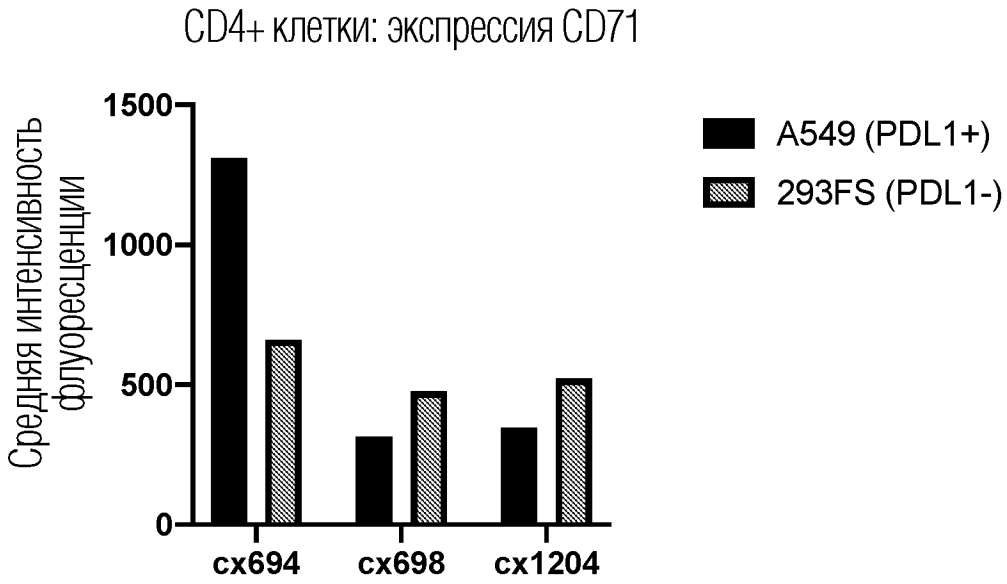
ФИГ. 6A


CD4+ клетки: экспрессия CD25
Средняя интенсивность флуоресценции
8000
6000
4000
2000
0
cx694
cx698
cx1204
A549 (PDL1+)
293FS (PDL1-)

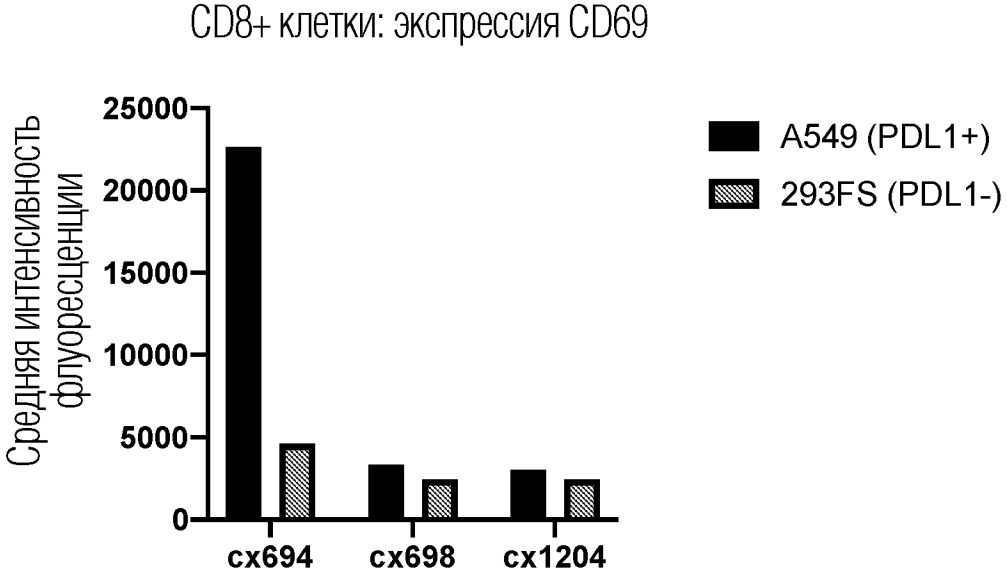
ФИГ. 6B


CD4+ клетки: экспрессия CD69
Средняя интенсивность флуоресценции
50000
40000
30000
20000
10000
0
cx694
cx698
cx1204
A549 (PDL1+)
293FS (PDL1-)

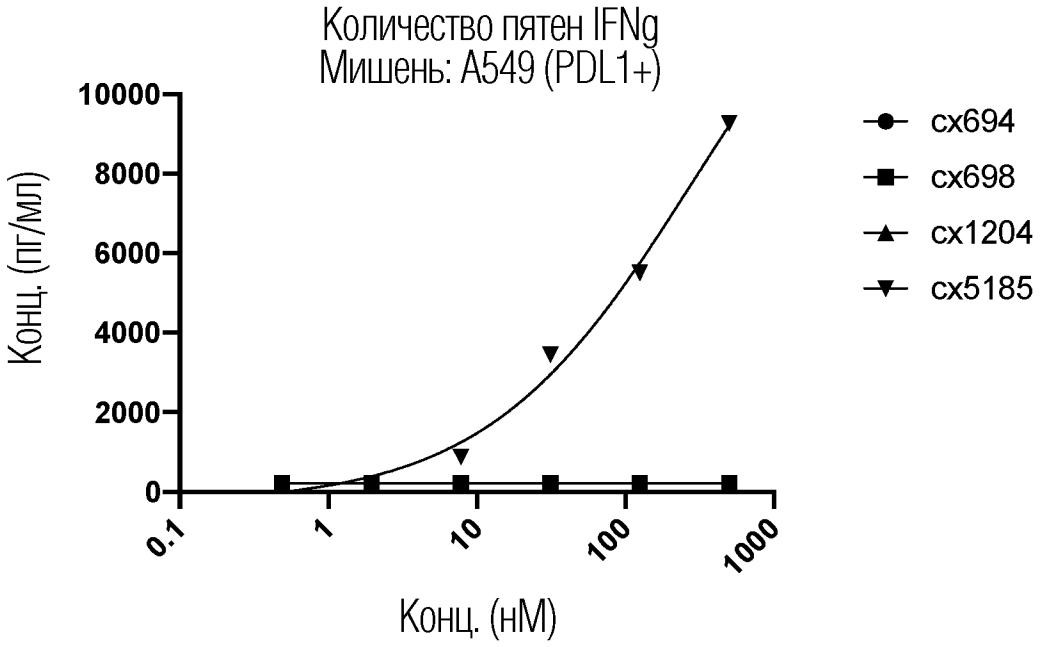
ФИГ. 6C


CD4+ клетки: экспрессия CD71
Средняя интенсивность флуоресценции
1500
1000
500
0
cx694
cx698
cx1204
A549 (PDL1+)
293FS (PDL1-)

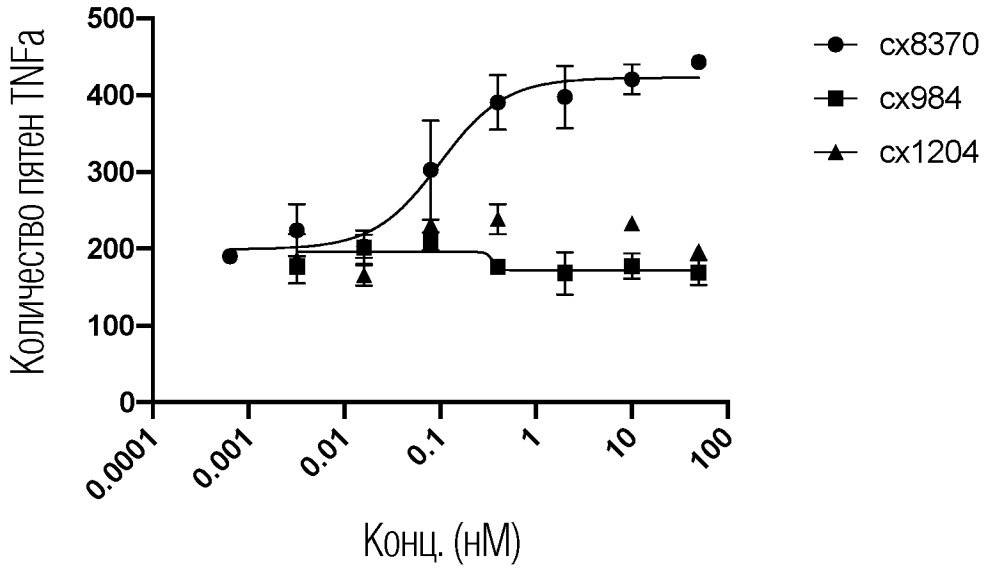
ФИГ. 6D


CD8+ клетки: экспрессия CD69
Средняя интенсивность флуоресценции
25000
20000
15000
10000
5000
0
cx694
cx698
cx1204
A549 (PDL1+)
293FS (PDL1-)

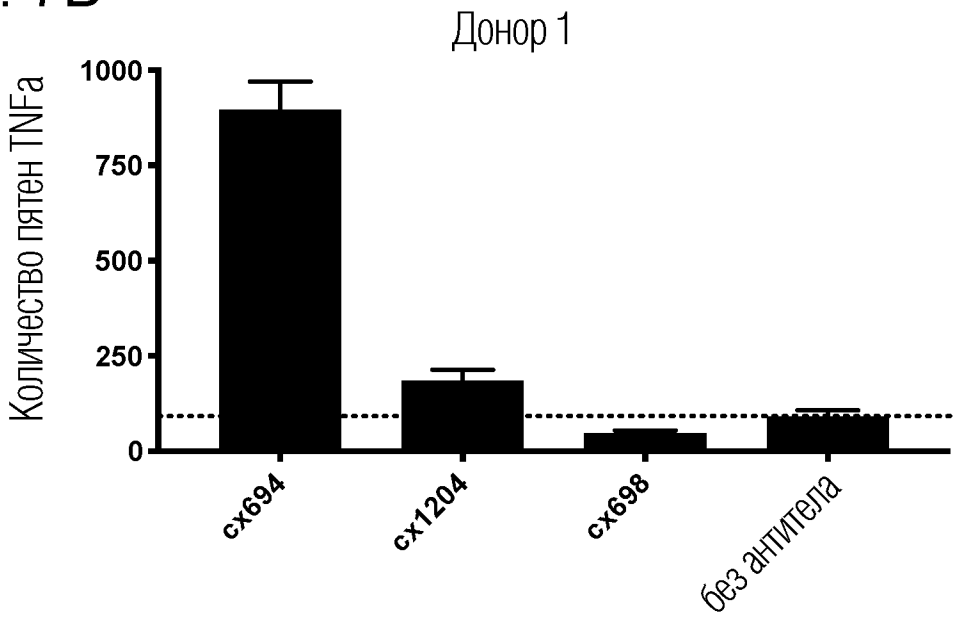
ФИГ. 6E


Количество пятен IFNg
Мишень: A549 (PDL1+)
Конц. (пг/мл)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.1
1
10
100
1000
Конц. (нМ)
cx694
cx698
cx1204
cx5185

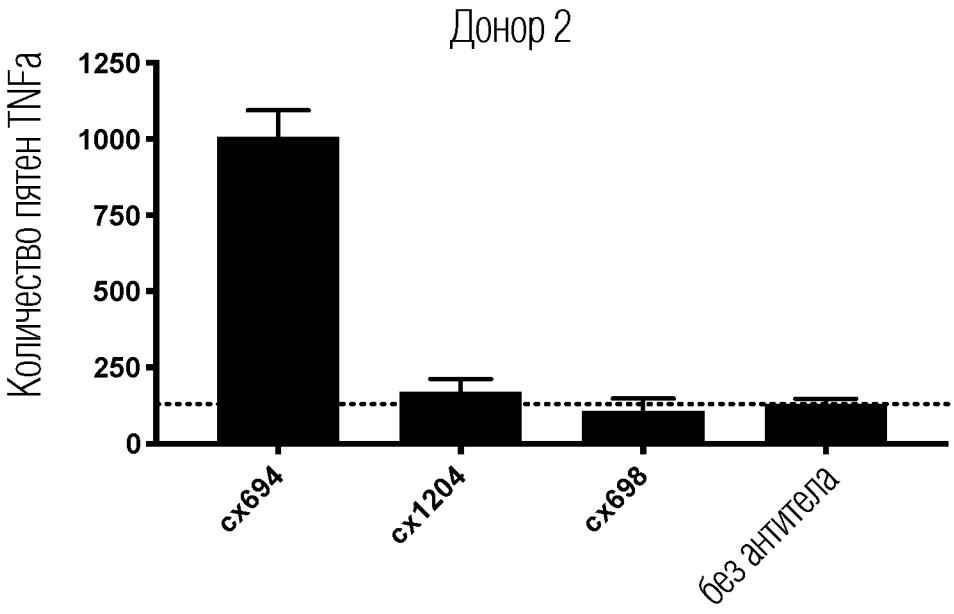
ФИГ. 7A


Количество пятен TNFa
500
400
300
200
100
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Конц. (нМ)
cx8370
cx984
cx1204

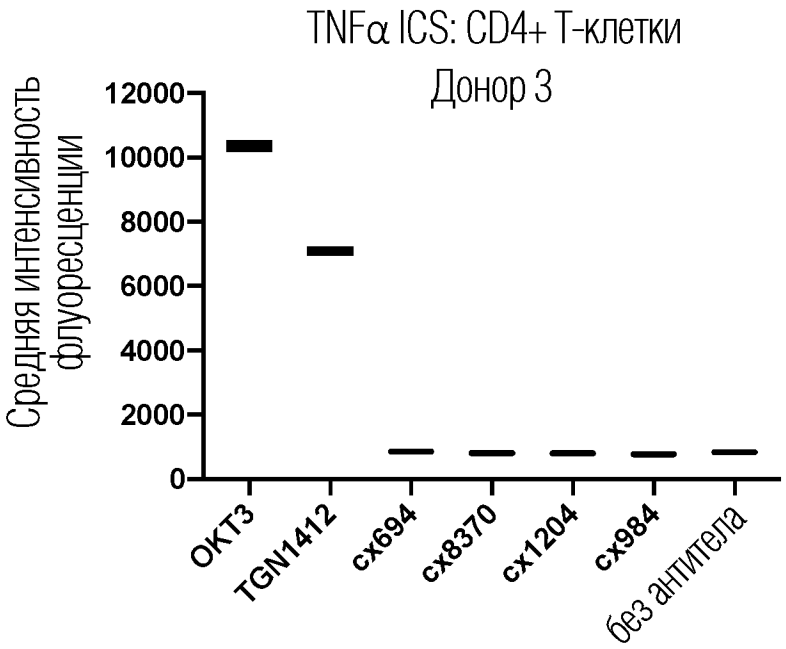
ФИГ. 7B


Донор 1
Количество пятен TNFa
1000
750
500
250
0
cx694
cx1204
cx698
без антитела

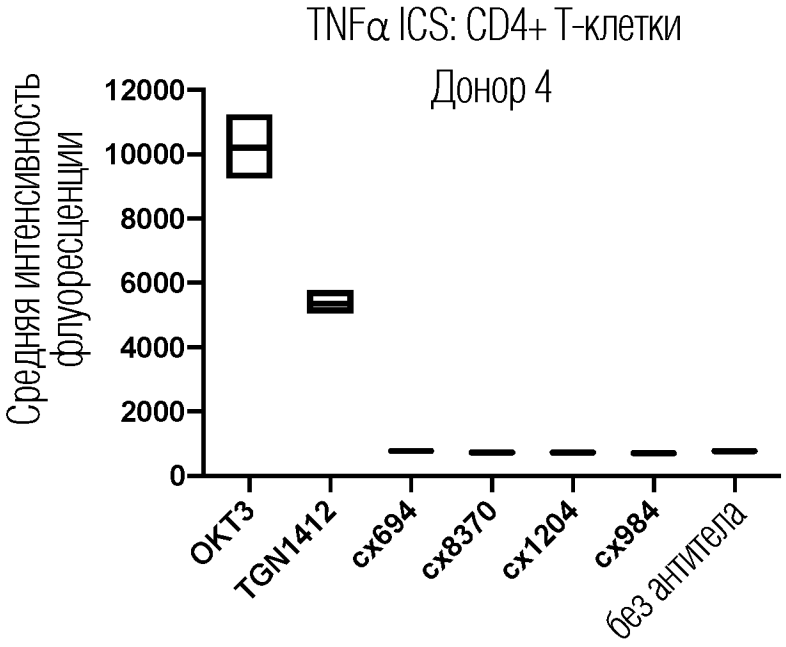
ФИГ. 7C


Донор 2
Количество пятен TNFa
1250
1000
750
500
250
0
cx694
cx1204
cx698
без антитела

ФИГ. 8A


TNFα ICS: CD4+ Т-клетки
Донор 3
Средняя интенсивность флуоресценции
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
OKT3
TGN1412
cx694
cx8370
cx1204
cx984
без антитела

ФИГ. 8B


TNFα ICS: CD4+ Т-клетки
Донор 4
Средняя интенсивность флуоресценции
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
OKT3
TGN1412
cx694
cx8370
cx1204
cx984
без антитела