

基于T细胞受体的多特异性多肽分子及其组合物和用途

本国际专利申请要求2023年10月27日提交的中国专利申请CN202311415371.1的优先权权益，其全部内容通过引入并入本文。

技术领域

本发明涉及基于T细胞受体的多特异性多肽分子及其用途，特别是在治疗癌症、感染性疾病、自身免疫病和/或炎症性疾病中的用途。

背景技术

T细胞是脊椎动物适应性免疫系统的重要组成部分，在病毒感染、癌症和自身免疫中起着至关重要的作用。TCR识别主要组织相容性复合体（MHC）-抗原肽复合物（pMHC），是T细胞介导免疫反应的重要步骤。TCR与由 γ 、 δ 、 ϵ 和 ζ 亚基组成的CD3信号装置的非共价结合形成TCR-CD3复合物。pMHC与TCR的结合激活LCK诱导的TCR CD3 ζ 亚基中细胞内免疫受体酪氨酸基激活基序（ITAM）的磷酸化。然后，CD3 ζ 磷酸化触发一系列磷酸化信号转导，涉及 ζ 链相关蛋白激酶70（ZAP70）和T细胞中的激活T细胞连接体（LAT），引起多个下游适配器和信号分子的招募以及LAT信号体的形成。组装的LAT信号体激活多种涉及转录因子的信号通路，如激活蛋白1（AP-1）、核因子- κ B（NF- κ B）和活化T细胞的核因子（NFAT）。活化的转录因子可引起后续的T细胞激活、增殖、细胞因子产生和效应器功能。

双特异性抗体（bispecific antibody, BsAb, 简称“双抗”）是指一个抗体分子同时靶向两个抗原或者靶向一个抗原的两个不同的抗原表位。双特异性抗体与普通抗体相比，特异性更强、更能准确靶向肿瘤细胞以及降低脱靶毒性。随着重组蛋白表达技术和抗体工程技术的发展，产生了许多不同的抗体形式。多特异性抗体用于各种目的，包括（1）受体激活（2）阻断（3）内化（4）聚集，（5）膜相关蛋白的结合，或（6）细胞毒性效应细胞的定向靶点。

T细胞重定位的bsAb（又名T cell engager, TcE）是重要的细胞毒性效应细胞重定位形式，是目前癌症免疫治疗的中心支柱。这种bsAb可识别肿瘤细胞表面的靶点，同时识别T细胞表面的分子（该分子大多数情况下是CD3），这样bsAb就可以将肿瘤细胞和具有细胞毒性的T细胞偶联在一起，以引起T细胞TCR下游信号通路的激活，通过T细胞的细胞毒性杀伤肿瘤细胞。Blinicyto（blinatumomab）是一种CD19/CD3双特异性抗体，其导致69%的复发/难治性B前体急性淋巴细胞白血病（ALL）患者完全缓解。目前已经出现了大量新的T细胞重定位抗体形式，如BITE、BITE-Fc、DART-Fc、TriTAC等。

基于抗体识别靶细胞表面分子的bsAb，仅仅识别肿瘤细胞表面抗原，不能识别将近90%的细胞内蛋白。而TCR可识别细胞内和细胞表面肿瘤特异抗原经加工后呈递在细胞表面MHC分子的抗原肽，识别范围更加广泛。基于TCR的T细胞重定位双特异性抗体中的靶细胞识别区从传统抗体换成了TCR，这样就可以利用TCR的广泛识别特性来增加靶点的选择性。

对于蛋白药物来说，肾小球的滤过界限一般在60kDa左右。也就是说小分子量的抗体片段或衍生物，例如纳米抗体（15kDa）和scFv（28kDa）甚至Fab（50kDa）都会通过肾小球的滤过作用从体内清除，导致其拥有较短的半衰期。其中，纳米抗体在所有抗体类型中分子量最小，半衰期往往只有几十分钟。因此，为了增加蛋白药物的疗效，有必要对蛋白药物进行改进，以延长其半衰期。

发明内容

为增加 TcE 的体内效果，除了提升 TCR 对 pMHC 的亲合力以外，还可以增加 TcE 针对靶细胞靶点的 TCR 的效价，也可以增加 TcE 针对效应细胞表面分子的效价，以提升 T 细胞杀伤活性和增殖能力。同时，为了维持 TcE 进入肿瘤的能力，同时保持 TcE 在体内合适的半衰期，需要将 TcE 的分子大小维持在一定的范围内并在多肽分子中适当地增加其他功能结构域，例如来源于抗体的铰链区、抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分和/或白蛋白(Alb) 或其结合部分的功能结构域。这些功能结构域的添加不但延长了多肽分子的半衰期，还能够保持多肽分子的杀伤活性。相应地，本发明提供了基于 TCR 的多特异性多肽分子，例如基于 TCR 的双特异性多肽分子、三特异性多肽分子或四特异性多肽分子。

术语

除非另有说明或定义，否则所使用的所有术语都具有技术人员所熟知的本领域通常的含义。例如，本文所使用的术语如 Janeway CA Jr, Travers P, Walport M 等的《免疫生物学》(Immunobiology)，第五版，New York: GarlandScience(2001) 和 “A multilingual glossary of

biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. 和 Kölbl, H. 编辑 (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland 中所述的定义。

应当注意, 如本文中及所附权利要求书中使用的, 单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”包括复数提及物, 除非上下文另有明确规定。因此, 术语“一个”、“一种”、“一个/种或多个/种”和“至少一个/种”可以互换使用。类似地, 术语“包含”、“包括”和“具有”可以互换使用。

除非另有说明或定义, 否则术语“包含”及其变体诸如“包括”和“含有”应理解为意味着包括所述元素或步骤, 但不排除任何其他元素或步骤。为了本发明的目的, 术语“由...组成”被认为是术语“包含”的优选实施方案。如果在下文中将组定义为包括或包含至少一定数量的实施方案, 则还应被理解为公开了优选仅由这些实施方案组成的组。

如本文所用的术语“T细胞受体”或“TCR”包括天然TCR以及TCR变体、片段和构建体。因此该术语包括包含TCR α 链和TCR β 链的异二聚体以及多聚体和单链构建体; 任选地包含其它结构域和/或部分, 只要所述TCR保留其识别抗原靶标的能力。

在TCR的天然形式中, 其作为T细胞表面上的若干蛋白质的复合物存在。T细胞受体由两条(单独的)蛋白质链组成, 这些蛋白质链由独立的T细胞受体 α 和 β (TCR α 和TCR β)基因产生, 并被称为 α 链和 β 链。TCR的每条链具有一个N末端免疫球蛋白样(Ig)-可变(V)区/结构域, 一个Ig-恒定(C)区/结构域, 将链锚定在质膜中的跨膜/细胞膜跨越区域, 和C-末端的短细胞质尾。

抗原特异性是由 α 和 β 链的可变区(TRAV和TRBV)赋予的。TCR α 链和 β 链的两个可变区均包含由框架(FR)区包围的三个高变或互补决定区(CDR1 α / β 、CDR2 α / β 和CDR3 α / β)。CDR3是抗原识别和特异性(即识别特异性抗原并与其相互作用的能力)的主要决定簇, 而CDR1和CDR2主要与呈递抗原肽的MHC分子相互作用。

TCR 识别抗原肽, 该抗原肽与抗原呈递细胞表面处的主要组织相容性复合体(MHC)分子结合(“在MHC 分子上呈递/展示”)。在 MHC 分子上呈递的抗原肽在本文中也称为“表位与 MHC 分子的复合物”、“表位-MHC 复合物”、“抗原-MHC 复合物”或“靶抗原肽-MHC 复合物”。存在两种不同类别的MHC 分子: MHC I 和 MHC II, 其呈递来自不同细胞区室的肽。MHC I 类分子在人体所有有核细胞的表面上均有表达, 并展示从细胞内区室到细胞毒性 T 细胞的肽或蛋白质片段。在人类中, MHC 也称为人白细胞抗原(HLA)。MHC I 类有三种主要类型: HLA-A、HLA-B 和 HLA-C。一旦 TCR 结合其特异性表位-MHC 复合物, 则 T 细胞被活化并发挥生物效应功能。

如本文所用的术语“TCR恒定区”包括TCR α 链恒定区(TRAC)和 β 链恒定区(TRBC), 其可以是人恒定区或衍生自另一物种, 例如鼠。

据报道, 在恒定区添加二硫键可促进TCR α 和 β 链的正确配对(Kuball J等Blood.2007 Mar 15; 109(6): 2331-8)。因此, 本文还设想在恒定区中添加一个或多个半胱氨酸修饰, 以在TCR α 链和TCR β 链之间形成二硫键。

野生型TCR恒定区的序列可以在国际免疫遗传学信息系统(IMG T)的公开数据库中找到, 如TCR分子 α 链的恒定域序列为“TRAC*01”, TCR分子 β 链的恒定域序列为“TRBC1*01”或“TRBC2*01”。

本发明中野生型TCR的氨基酸序列的位置按照国际免疫遗传学信息系统(IMG T)的命名规则进行编号。例如, TCR α 链可变区 (TRAV) 中的某个氨基酸, IMG T中列出的位置编号为104, 则本发明中将其描述为TRAV第104位氨基酸; TCR β 链可变区 (TRBV) 中的某个氨基酸, IMG T中列出的位置编号为84, 则本发明中将其描述为TRBV第84位氨基酸; 其他以此类推。例如, TCR α 链恒定区 (TRAC) 中的某个氨基酸, IMG T中列出的位置编号为48, 则本文中将其描述为TRAC第48位氨基酸; TCR β 链恒定区 (TRBC) 中的某个氨基酸, IMG T中列出的位置编号为57, 则本文中将其描述为TRBC第57位氨基酸; 其他以此类推。本发明中, 其他氨基酸的序列位置编号有特殊说明的, 则按特殊说明。

如本文所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子, 其具有特异性结合特定抗原的能力。此类分子通常包含通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链由重链可变区(或结构域)(本文缩写为 VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每条轻链由轻链可变区(或结构域)(本文缩写为 VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。抗体重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合, 宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(如效应细胞)和补体系统的组分如 C1q (补体激活经典途径中的第一组分)。

免疫球蛋白的重链可分为三个功能区: Fd 区、铰链区和 Fc 区(可结晶片段)。Fd 区包含 VH 和 CH1 结构域, 并与轻链结合形成 Fab (抗原结合片段)。Fc 区也称为 Fc 结构域, 其在每条重链中包含两个或三个重链恒定区 (CH2、CH3、CH4)。在 IgG 类抗体中, Fc 区包含 CH2 和 CH3 结构域。Fc 片段负责免疫球蛋白效应功能, 包括例如补体结合和与效应细胞的同源 Fc 受体结合。在免疫球蛋白

的天然结构中,两条重链的 Fc 结构域发生二聚化形成 Fc 二聚体。Fc 结构域中能够促进形成 Fc 二聚体的部分称为“Fc 结构域的二聚化部分”,其通常包括 CH2 结构域的一部分和 CH3 结构域。

IgG 类抗体的铰链区是指重链 CH1 和 CH2 部分之间的短氨基酸序列区域,在抗体天然状态下相对柔性。在 IgG、IgA 和 IgD 免疫球蛋白类别中发现的铰链区充当柔性间隔区,允许 Fab 部分相对于 Fc 区在空间中自由移动。铰链结构域在结构上多种多样,在免疫球蛋白类别和亚类之间的序列和长度都不同。根据晶体学研究,免疫球蛋白铰链区在结构和功能上可进一步细分为三个区域:上铰链、核心铰链和下铰链(Shin 等人, *Immunological Reviews* 130:87, 1992)。上铰链包括从 CH1 的羧基末端到铰链中限制运动的第一个残基的氨基酸,通常是在两条重链之间形成链间二硫键的第一个半胱氨酸残基。上铰链区的长度与抗体的片段柔性相关。核心铰链区含有重链间二硫键。下铰链区连接 CH2 结构域的氨基末端,并包括 CH2 结构域中的残基。人 IgG1 的核心铰链区含有当通过二硫键形成二聚化时会产生环状八肽的序列 Cys-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO: 1),据信环状八肽充当枢轴,从而赋予柔性。免疫球蛋白铰链区多肽序列的结构和柔性允许的构象变化可以影响抗体 Fc 部分的效应功能。

“轻链可变区(VL)”或“重链可变区(VH)”由间插三个“互补决定区”或“CDR”的“框架”区组成。框架区用于调整 CDR,以用于特异性结合抗原表位。CDR 包含抗体中主要负责抗原结合的氨基酸残基。从氨基末端到羧基末端,VL 和 VH 结构域都包含以下框架(FR)区和 CDR 区:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 和 FR4。

单域抗体(single domain antibody, sdAb),又称纳米抗体(nanobody),其由一个重链可变结构域组成。该重链可变结构域最初发现于骆驼科动物和鲨鱼的血清中分离出的一种重链抗体(HCAb),通过基因手段,扩增出其中的重链可变结构域。这种存在于天然存在的重链抗体中的可变结构域被称为“VHH”,以将其与存在于常规 4 链抗体中的重链可变结构域(VH)和存在于常规 4 链抗体中的轻链可变结构域(VL)区分开来。单独克隆并表达出来的 VHH 具有与原重链抗体相当的结构稳定性以及同等的抗原结合活性,VHH 是目前已知的可结合目标抗原的最小单位。

VHH 结构域具有许多独特的结构特征和功能特性,这些结构特征和功能特性使得分离的 VHH 结构域(以及基于 VHH 结构域的与天然存在的 VHH 结构域共享这些结构特征和功能特性的纳米抗体)和含有分离的 VHH 结构域的蛋白质非常有利于用作功能性抗原结合结构域或蛋白质。特别地,但不限于此,VHH 结构域(其本质上已经被“设计”以不存在轻链可变结构域且不与轻链可变结构域发生任何相互作用的情况下与抗原功能性结合)和纳米抗体可以作为单一的、相对较小的、功能性抗原结合结构单元、结构域或蛋白质。这将 VHH 结构域与常规 4 链抗体的 VH 和 VL 结构域区分开来,后者本身通常不适合作为单一抗原结合蛋白或结构域实际应用,而是需要以某种形式组合以提供功能性抗原结合单元(例如在如 Fab 片段的常规抗体片段中;在由与 VL 结构域共价连接的 VH 结构域组成的 ScFv 片段中)。

每个 VL、VH 和 VHH 结构域的氨基酸分配按照 CDR 的任何常规定义。常规定义包括 Kabat 定义(Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 和 1991)); Chothia 定义(Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, 1987; Chothia 等人, *Nature* 342: 878-883, 1989); Chothia Kabat CDR 的复合,其中 CDR-H1 是 Chothia 和 Kabat CDR 的复合; Oxford Molecular 的抗体建模软件所使用的 AbM 定义;以及 Martin 等人的 CONTACT 定义(万维网 bioinfo.org.uk/abs)。Kabat 提供了广泛使用的编号惯例(Kabat 编号系统),其中不同重链之间或不同轻链之间的对应残基被赋予相同的编号。本公开可以使用根据这些编号系统中的任一种定义的 CDR,但是优选的实施方案使用 Kabat 定义的 CDR。

本文所用的术语“抗体”应以其最广泛的意义来理解,并且包括单克隆抗体(包含全长单克隆抗体)、多克隆抗体、抗体片段和包含至少两个抗原结合区的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。抗体可含有另外的修饰,例如非天然存在的氨基酸、Fc 区中的突变、以及糖基化位点的突变。抗体还包括翻译后修饰的抗体、含有抗体的抗原决定簇的融合蛋白以及含有对抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子,只要这些抗体表现出预期的生物活性即可。

如本文所用,术语抗体的“抗原结合片段”是指保持特异性结合抗原能力的一种或多种抗体片段。已经表明,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段来执行。

抗原结合片段的实例包括但不限于(i)Fab 片段,其为由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂ 片段,其为二价片段,包含通过铰链区二硫键连接的两个 Fab 片段;(iii) Fab' 片段,其基本上是 Fab,但具有部分铰链区(参见, *FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY* (Paul et al., 3^{sup}.rd ed. 1993); (iv) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段;(v) 具有 VH 和 CH1 结构域以及位于 CH1 结构域的 C 端的一个或多个半胱氨酸残基的 Fd' 片段;(vi) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段;(vii) dAb 片段(Ward 等人(1989) *Nature* 341: 544-546),其由 VH 结构域组成;(viii) 单独的互补决定区(CDR)。此外,尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 通过独立的基因编码,但它们可以使用重组方法

通过合成接头连接,该合成接头能够使它们形成单个蛋白质链,在该蛋白质链中,VL 和 VH 区配对以形成单价分子(称为单链 Fv(ScFv);参见例如 Bird 等人(1988)Science 242, 423-426;以及 Huston 等人(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883)。此类单链抗体也意在包含在术语抗体的“抗原结合片段”内。此外,该术语还包括含有一对串联 Fd 片段(VH-CH1-VH-CH1)的“线性抗体”,其与互补的轻链多肽以及保留抗原结合活性的任何前述片段的修饰版本共同形成抗原结合区。

如本文所用的术语“抗原”是指任何能够诱导机体产生免疫应答物质。即能被 T/B 淋巴细胞表面的抗原受体(TCR/BCR)特异性识别并结合,活化 T/B 细胞,使之增殖分化,产生免疫应答产物(致敏淋巴细胞或抗体),并能与相应产物在体内外发生特异性结合的物质。

在本文中,抗原可以是肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原、自身抗原和免疫细胞表面分子。

如本文所用的术语“肿瘤相关抗原(TAA)”是指与正常细胞相比,在肿瘤细胞中差异表达(例如在肿瘤细胞上表达明显增加)的抗原。

如本文所用的术语“肿瘤特异性抗原(TSA)”是指肿瘤细胞所特有,不存在于正常组织和细胞中的抗原。

如本文所用的术语“病毒抗原”是指病毒中能够诱导机体产生免疫应答的物质。

如本文所用的术语“自身抗原”是指生物、物理、化学因素引起的自身组织细胞结构与成分发生改变,从而引起机体免疫系统针对这些自身组织细胞成分产生免疫应答反应的抗原物质。隐蔽抗原的释放可产生免疫应答。自身成分的改变可能产生自身抗原。例如,变性的 IgG 可刺激机体产生抗变性 IgG 抗体(类风湿因子),引起类风湿关节炎。临床上使用某些药物后,可改变血细胞表面抗原性,引起自身免疫性溶血性贫血或粒细胞减少。共同抗原引发的交叉反应可产生免疫应答。某些细菌、病毒与正常人体某些组织细胞上有相类似的抗原决定簇,针对这些细菌、病毒抗原决定簇产生的自身抗体和致敏淋巴细胞可与自身组织细胞发生交叉反应,引起自身免疫性疾病。

“免疫细胞表面分子”可以包括例如免疫细胞表面抗原(例如 T 细胞抗原)和共刺激分子。

抗原上被 TCR 或抗体结合的位点被称为“表位”。表位可以由连续氨基酸或通过一种或多种蛋白质的三级折叠而并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位(也称为线性表位)通常在暴露于变性溶剂后保留,而通过三级折叠形成的表位(也称为构象表位)通常在变性溶剂的处理中丢失。表位通常包含处于独特空间构象的至少 3 个,更通常地至少 5 个或 8-10 个氨基酸。表位限定了 TCR 或抗体的最小结合位点,因此是 TCR 或抗体或其抗原结合片段的特异性靶标。

本文中,术语“白蛋白”涵盖任何脊椎动物来源的任何天然白蛋白,所述任何脊椎动物来源包括哺乳动物,诸如灵长类(例如,人和猴)和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。白蛋白还涵盖全长、未加工的白蛋白前原蛋白以及由细胞中的加工所产生的任何形式的白蛋白。白蛋白还涵盖天然存在的白蛋白的变体,例如剪接变体或等位基因变体。该术语还涵盖任何重组形式的白蛋白。白蛋白序列是本领域已知的。例如可在 NCBI 中找到关于人血清白蛋白基因(包括基因组 DNA 序列)的信息。示例性的全长人血清白蛋白前原蛋白的氨基酸序列可在 NCBI 登录号 NP_000468.1 下找到。人血清白蛋白以前白蛋白的形式合成,成熟的白蛋白是 585 个氨基酸残基的单链多肽,分子量为 66458,分子中含 17 个二硫键,不含有糖的组分。在体液 pH7.4 的环境中,白蛋白为负离子,每分子可以带有 200 个以上负电荷。外源性输注的白蛋白在 2h 后约有 10%进入血管外的组织间隙,20 天达平衡。白蛋白在血浆中的半衰期为 15-19 天。

>gi|4502027|ref|NP_000468.1|血清白蛋白前原蛋白[智人]

MKWVYTFISLLFLFSSAYS**SRGVFRR**DAHKSEVAH**RFKDL**GEENFKALVLI**AFAQYLQQCP**FEDHV**KLV**
VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF**LQHKDDNPN**
LPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA**FTECCQAADKAACLLPKL**
DEL**RDEG**KASSAK**QRLK**CAS**LQK**FGERAFAKAWAVARLS**QRF**PKAEFAEVSKLVTDLTKVHTEC**CHGDLLE**
CADD**RADL**AKYICENQDSISSKLKECKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAAD**FVESKDVCKNYAEAK**
DVFLGMFLY**EYARRHPDYSV**VLLRLAKTYETTLEKCCAAAD**PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC**EL
FE**QLGEYK**FNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMP**CAEDYLSVVLNQLCVLHE**
KTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ**TALVELVKHKP**
KATKE**QLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF**AEEGKKLVAASQAALGL (下划线指示信号肽,粗体指示前肽,斜体指示成熟人血清白蛋白(SEQ ID NO: 2))。

本文中,术语“白蛋白结合部分”是指以非共价方式连接,或通过缀合或直接遗传融合以共价方式与白蛋白连接的片段,其保留有与白蛋白结合的最小功能单位。在一些实施方案中,所述白蛋白结合部分包括任何已知的能够与白蛋白结合的部分,例如,可以为特异性结合白蛋白的内源性或外源性配体、有机小分子、脂肪酸、蛋白质、短肽(例如 QRLMEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID NO: 3))、抗体、抗体片段和抗体样支架、链球菌白 G 蛋白等。

如本发明所用，术语“序列同一性”是指两条序列(氨基酸)对齐后在相同位置具有相同残基的程度。例如，“氨基酸序列与 SEQ ID NO: Y 是 X% 相同的”是指该氨基酸序列与 SEQ ID NO: Y 的同一性百分比，并被阐述为该氨基酸序列中 X% 的残基与 SEQ ID NO: Y 中公开的序列残基相同。

通常使用计算机程序进行此类计算。比较和对齐序列对的示例性程序包括 ALIGN (Myers 和 Miller, 1988)、FASTA (Pearson 和 Lipman, 1988; Pearson, 1990) 以及 gapped BLAST (Altschul 等人, 1997)、BLASTP、BLASTN 或者 GCG (Devereux 等人, 1984)。

此外，在确定两条氨基酸序列之间的序列同一性的程度时，技术人员可以考虑所谓的“保守性”氨基酸取代，其通常可以描述为氨基酸残基被替换为具有类似化学结构的另一种氨基酸残基的氨基酸取代，其对多肽的功能、活性或其他生物学性质几乎没有影响或基本上没有影响。这种保守性氨基酸取代在本领域中是众所周知的，例如 WO 04/037999, GB-A-2 357 768, WO 98/49185, WO 00/46383 和 WO 01/09300; 并且(优选地)这些取代的类型和/或组合可以根据来自 WO 04/037999 以及 WO 98/49185 以及其中引用的另外的参考文献的相关教导来选择。

这种保守性取代优选地是以下组(a)到(e)中的一个氨基酸被同组中的另一个氨基酸残基取代的取代: (a) 小的脂肪族、非极性或非极性残基: Ala、Ser、Thr、Pro 和 Gly; (b) 极性、带负电的残基及其(不带电的)酰胺: Asp、Asn、Glu 和 Gln; (c) 极性、带正电的残基: His、Arg 和 Lys; (d) 大的脂肪族、非极性残基: Met、Leu、He、Val 和 Cys; 以及(e) 芳香族残基: Phe、Tyr 和 Trp。

特别优选的保守性取代如下: Ala 到 Gly 或到 Ser; Arg 到 Lys; Asn 到 Gln 或到 His; Asp 到 Glu; Cys 到 Ser; Gln 到 Asn; Glu 到 Asp; Gly 到 Ala 或到 Pro; His 到 Asn 或到 Gln; Ile 到 Leu 或到 Val; Leu 到 Ile 或到 Val; Lys 到 Arg、到 Gln 或到 Glu; Met 到 Leu、到 Tyr 或到 Ile; Phe 到 Met、到 Leu 或到 Tyr; Ser 到 Thr; Thr 到 Ser; Trp 到 Tyr; Tyr 到 Trp; 和/或 Phe 到 Val、到 Ile 或到 Leu。

如本文所用的术语“含半胱氨酸的肽段”是指能够在包含该肽段的两条多肽链之间形成二硫键的一段包含半胱氨酸残基的多肽，其长度为 3-10 个氨基酸。

如本文所用的术语“载体”是用作将(外源)遗传材料转移到宿主细胞中的媒介的核酸分子，在该宿主细胞中作为载体的所述核酸分子可以例如复制和/或表达。

如本文所用的术语“宿主细胞”是指已引入表达载体从而能够表达外援遗传材料的任何类型的细胞。

术语“药学上可接受”是指载体或佐剂与组合物的其他成分相容并且对其接受者没有大量毒害，和/或这些载体或佐剂被批准或可用于包含在人类肠胃外给药的药物组合物中。

如本文所用的术语“治疗”、“处理”等，指施用药剂或进行程序，以便获得效果。这些效果可以就完全或部分地预防疾病或其症状而言是预防性的，和/或可以就影响疾病和/或疾病症状的部分或完全治愈而言是治疗性的。如本发明所用，“治疗”可包括治疗哺乳动物，特别是人类的疾病或病症(例如癌症、感染性疾病、自身免疫病或炎症性疾病)，并且包括: (a) 在对疾病易感而尚未被诊断为患病的受试者中预防该疾病或疾病症状的发生(例如，包括可能与原发疾病相关或由其引起的疾病); (b) 抑制疾病，即阻止其发展; (c) 缓解疾病，即导致疾病的消退。治疗可指在治疗或改善或预防癌症方面取得成功的任何指代，包括任何客观或主观参数，例如消除; 缓解; 减少症状或使疾病病症对患者而言更容易忍受; 减慢恶化或衰退速度; 或使恶化的终点衰弱减少。症状的治疗或改善基于一个或多个客观或主观参数; 包括医生检查的结果。因此，术语“治疗”包括施用本发明公开的多特异性多肽分子或药物组合物或缀合物，以预防或延迟、缓解或阻止或抑制与疾病(例如癌症)相关的症状或病症的发展。术语“治疗效果”是指受试者中疾病、疾病症状或疾病副作用的减少、消除或预防。

如本文所用的术语“有效量”意指当施用到受试者用于治疗或预防疾病时足以实现这样的治疗或预防的治疗剂的量。“有效量”可根据化合物、疾病及其严重度、以及待治疗的受试者的年龄、体重等改变。“治疗有效量”是指用于治疗性治疗的有效量。“预防有效量”是指用于预防性治疗的有效量。

如本文所用，术语“受试者”是指期望诊断、医治或治疗的任何哺乳动物受试者。用于治疗目的的“哺乳动物”是指任何归类为哺乳动物的动物，包括人、家畜、以及实验室动物、动物园动物、运动动物或宠物动物，如狗、马、猫、牛、绵羊、山羊、猪、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猴子等。

本发明的优选实施方案

通过结合附图对以下实施方案的详细描述，本发明的特征和优点及其附加特征和优点将在下文得到更清楚的理解。本文参照附图描述的实施方案是解释性的，说明性的，并用于普遍理解本发明。实施方案不应解释为限制本发明的范围。相同或相似的要素和具有相同或相似功能的要素在整个描述中使用相同的附图标记表示。

在第一方面，本发明提供了一种多特异性多肽分子，所述多特异性多肽分子包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区，

其中所述第一结合区包含来源于与所述第一抗原-MHC 复合物结合的 T 细胞受体(TCR)的 α 链可变区(TRA V1)和 β 链可变区(TRB V1);

其中所述第二结合区包含来源于与所述第二抗原结合的抗体的重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1 或来源于与所述第二抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH1);

其中所述第一抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原,且所述第二抗原为免疫细胞表面分子;

其中所述抗体的 N 端连接在所述 TCR 的 C 端。

在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含至少一种能够延长所述多特异性多肽分子半衰期的功能结构域。在一些实施方案中,能够延长所述多特异性多肽分子半衰期的功能结构域选自以下至少一种;

- 1) 源于抗体的铰链区;
- 2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分;
- 3) 源于抗体的 CH3 结构域;
- 4) 白蛋白(Alb)或其结合部分;
- 5) 源于 TCR 的恒定区或其片段。

在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含以下至少一种功能结构域:

- 1) 源于抗体的铰链区;
- 2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分;
- 3) 源于抗体的 CH3 结构域;
- 4) 白蛋白(Alb)或其结合部分;
- 5) 源于 TCR 的恒定区或其片段。

在一些实施方案中,所述抗体的 N 末端连接在所述 TCR 的 C 末端。

在一些实施方案中,所述第二结合区氨基酸链的 N 端连接在所述第一结合区氨基酸链的 C 端。

在一些实施方案中,本发明提供的多特异性多肽分子不包含所述第二结合区氨基酸链的 C 端连接在所述第一结合区氨基酸链的 N 端。

在一些实施方案中,本发明提供的多特异性多肽分子不包含第二结合区通过单链(VH1 和 VL1 分布在一条多肽链上,或所述抗体包含 VHH1)或双链(VH1 和 VL1 分布两条多肽链上)中的任何一条多肽链的 C 末端连接在第一结合区的一条多肽链或多条多肽链的 N 末端。

在一些实施方案中,本发明提供的多特异性多肽分子不包含以下情况:

VL1 和 VH1 分布在一条多肽链上形成第二结合区单链或所述第二结合区单链包含 VHH1, TRA V1 和 TRB V1 分布在一条多肽链上形成第一结合区单链,所述第二结合区单链的 C 末端连接在所述第一结合区单链的 N 末端;

VL1 和 VH1 分布在一条多肽链上形成第二结合区单链或所述第二结合区单链包含 VHH1, TRA V 和 TRB V1 分布在两条多肽链上分别形成 α 链和 β 链,所述第二结合区单链的 C 末端连接在 α 链或 β 链的 N 末端;

VL1 和 VH1 分布在多条多肽链上形成分别形成 L 链和 H 链, TRA V1 和 TRB V1 分布在一条多肽链上形成第一结合区单链,所述 L 链或 H 链的 C 末端连接在所述第一结合区单链的 N 末端;

VL1 和 VH1 分布在多条多肽链上形成分别形成 L 链和 H 链, TRA V1 和 TRB V1 分布在两条多肽链上分别形成 α 链和 β 链,所述 L 链或 H 链的 C 末端连接在 α 链或 β 链的 N 末端。

在一些实施方案中,本发明提供的多特异性多肽分子不包含以下情况:

从 N 端到 C 端: scFv1-TRB V1、scFv1-TRA V1、scFv1-scTCR、VHH1-TRB V1、VHH1-TRA V1、VHH1-scTCR、VH1-TRB V1、VH1-TRA V1、VH1-scTCR、VL1-TRB V1、VL1-TRA V1、VL1-scTCR、Fab1-TRB V1、Fab1-TRA V1、Fab1-scTCR。

在一些实施方案中,VL1 和 VH1 分布在一条多肽链上,该多肽链的 C 末端与 TCR 的 N 末端连接。

在一些实施方案中,VL1 和 VH1 分布在多条多肽链上,且 VL1 或 VH1 所在多肽链的 C 末端与 TCR 的 N 末端连接。

在一些实施方案中,所述 TRA V1 和 TRB V1 分布在两条不同的多肽链上(也即,TCR 为异源二聚体 $\alpha\beta$ TCR)。

在一些实施方案中,VL1 和 VH1 分布在一条多肽链上,或者 VL1 和 VH1 分布在两条不同的多肽链上,并且所述 TRA V1 和 TRB V1 分布在两条不同的多肽链上。

在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子包含两条多肽链。

在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子包含两条多肽链,所述 TRA V1 和 TRB V1 分布在两

条不同的多肽链上，所述 VHH1 或所述 VH1 和 VL1 分布在一条多肽链上（例如形成 scFv1），它们的 N 端连接在所述 TRAV1 或 TRBV1 所在多肽链的 C 端，或所述 VH1 和 VL1 中的一个所在多肽链的 N 端连接在所述 TRAV1 所在多肽链的 C 端，另一个所在多肽链的 N 端连接在所述 TRBV1 所在多肽链的 C 端。

5 在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含三条多肽链。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含三条多肽链，并且所述 VH1 和 VL1 分布在不同的多肽链上，所述 TRAV1 和 TRBV1 分布在不同的多肽链上，VH1 或 VL1 所在多肽链的 N 端连接在 TRBV1 或 TRAV1 所在多肽链的 C 端。

10 在第二方面，本发明提供了一种多特异性多肽分子，所述多特异性多肽分子在两条多肽链上包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区，

其中所述第一结合区包含来源于与所述第一抗原-MHC 复合物结合的 T 细胞受体(TCR)的 α 链可变区(TRAV1)和 β 链可变区(TRBV1)；

其中所述第二结合区包含来源于与所述第二抗原结合的抗体的重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1 或来源于与所述第二抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH1)；

15 其中所述第一抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原，且所述第二抗原为免疫细胞表面分子；

其中所述抗体的 N 端连接在所述 TCR 的 C 端。

20 在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含至少一种能够延长所述多特异性多肽分子半衰期的功能结构域。在一些实施方案中，能够延长所述多特异性多肽分子半衰期的功能结构域选自以下至少一种：

1) 源于抗体的铰链区；

2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分；

3) 源于抗体的 CH3 结构域；

25 4) 白蛋白(Alb) 或其结合部分；

5) 源于 TCR 的恒定区或其片段。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含以下至少一种功能结构域：

1) 源于抗体的铰链区；

2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分；

3) 源于抗体的 CH3 结构域；

30 4) 白蛋白(Alb) 或其结合部分；

5) 源于 TCR 的恒定区或其片段。

在一些实施方案中，所述抗体的 N 末端连接在所述 TCR 的 C 末端。

在一些实施方案中，所述 TRAV1 和 TRBV1 位于两条不同的多肽链上（也即，TCR 为异源二聚体 $\alpha\beta$ TCR）。

35 在一些实施方案中，VH1 和 VL1 连接在一条多肽链上，例如，形成 scFv1 或 Fab1，并连接在所述 TCR 的 C 端。

在一些实施方案中，所述 TRAV1 和 TRBV1 位于两条不同的多肽链上，并且 VH1 和 VL1 连接在一条多肽链上，并且其 N 末端连接在 TRAV1 所在多肽链的 C 末端，或者 TRBV1 所在多肽链的 C 末端。

40 在一些实施方案中，所述 VH1 和 VL1 通过接头连接。

在本发明第二方面的多特异性多肽分子的实施方案中，所述 VH1 和 VL1 形成 scFv1，并且 scFv1 的 N 端连接在所述 TRAV1 所在多肽链或所述 TRBV1 所在多肽链的 C 端。在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：TRBV1-scFv1 和 TRAV1；或 TRAV1-scFv1 和 TRBV1。

45 在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：TRBV1-VL1-VH1 和 TRAV1；或 TRBV1-VH1-VL1 和 TRAV1；或 TRAV1-VL1-VH1 和 TRBV1；或 TRAV1-VH1-VL1 和 TRBV1。

在一些实施方案中，所述第二结合区包含来源于与所述第二抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH1)，所述 VHH1 连接在所述 TCR 的 C 端。在一些实施方案中，所述 TRAV1 和 TRBV1 位于两条不同的多肽链上，并且所述第二结合区包含 VHH1，其中，所述 VHH1 的 N 末端连接在 TRAV1 或 TRBV1 所在多肽链的 C 末端。在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：TRBV1-VHH1 和 TRAV1；或 TRAV1-VHH1 和 TRBV1。

50 在一些实施方案中，所述第二结合区包含 VH1 和 VL1，并且所述 VH1 和 VL1 位于两条不同的多肽链上。在一些实施方案中，所述 TRAV1 和 TRBV1 位于两条不同的多肽链上，并且所述 VH1 和

VL1 位于两条不同的多肽链上, 其中, 所述 VH1 和 VL1 中的一个所在多肽链连接在所述 TRAV1 所在多肽链的 C 末端, 另一个所在多肽链连接在所述 TRBV1 所在多肽链的 C 末端。

在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含: TRBV1-VL1 和 TRAV1-VH1; 或 TRAV1-VL1 和 TRBV1-VH1。

5 在一些实施方案中, 所述 TRAV1 和 TRBV1 位于两条不同的多肽链上, 并且其中所述 VHH1 或所述 VH1 和 VL1 在一条多肽链上(例如形成 scFv1)连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 C 端, 或者所述 VH1 和 VL1 中的一个连接在所述 TRAV1 的 C 端, 另一个连接在所述 TRBV1 的 C 端。

在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和/或 TRBV1 的 C 端的选自以下的恒定结构域:

10 (1) TCR 恒定区或其片段, 所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC);

(2) CH3, 所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域, 优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变;

15 (3) CL 和 CH1, 所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域, 并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

在本发明第二方面的多特异性多肽分子的实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含与第三抗原结合的第三结合区, 所述第三结合区包含来源于与所述第三抗原-MHC 复合物结合的 TCR 的 α 链可变区(TRAV2)和 β 链可变区(TRBV2); 其中所述第三抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原, 并且所述第三抗原与所述第一抗原相同或不同。在一些实施方案中, 20 所述 TRAV2 与所述 TRAV1 相同。在一些实施方案中, 所述 TRBV2 与所述 TRBV1 相同。

在一些实施方案中, 所述 TRAV2 和所述 TRBV2 通过接头连接在同一条多肽链上。

在一些实施方案中, 所述 VH1 和 VL1 分布在一条多肽链上并连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 C 端, 并且所述 TRAV2 和所述 TRBV2 通过接头连接在同一条多肽链上并且连接在 VH1 与 VL1 之间。

25 在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含:

TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 TRAV1; 或

TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 TRAV1; 或

TRBV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 TRAV1; 或

TRBV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 TRAV1; 或

30 TRAV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 TRBV1; 或

TRAV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 TRBV1; 或

TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 TRBV1; 或

TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 TRBV1。

在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV2 和/或 TRBV2 的 C 端选自以下的恒定结构域:

35 (1) TCR 恒定区或其片段, 所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC);

(2) CH3, 所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域, 优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变;

40 (3) CL 和 CH1, 所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域, 并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

在本发明第二方面的多特异性多肽分子的实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含与第四抗原结合的第四结合区, 所述第四结合区包含来源于与所述第四抗原结合的抗体的重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2 或来源于与所述第四抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH2); 其中所述第四抗原为免疫细胞表面分子, 并且所述第四抗原与所述第二抗原相同或不同。在一些实施方案中, 所述 VH2 与所述 VH1 相同。在一些实施方案中, 所述 VL2 与所述 VL1 相同。在一些实施方案中, 所述 VHH2 与所述 VHH1 相同。

45 在一些实施方案中, 所述 VHH2 或所述 VH2 和 VL2 形成 scFv2 连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 N 端, 或者所述 VH2 和 VL2 中的一个连接在所述 TRAV1 的 N 端, 另一个连接在所述 TRBV1 的 N 端。

50 在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子包含所述第一结合区、所述第二结合区和所述第四结合区, 并且所述 VH2 和 VL2 形成 scFv2 连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 N 端。在一些实施方案中, 所述 VH2 和 VL2 通过接头连接形成 scFv2。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：

scFv2-TRBV1-scFv1 和 TRAV1；或
scFv2-TRAV1-scFv1 和 TRBV1；或
scFv2-TRBV1-VHH1 和 TRAV1；或
scFv2-TRAV1-VHH1 和 TRBV1；或
scFv2-TRBV1-VL1 和 TRAV1-VH1；或
scFv2-TRAV1-VL1 和 TRBV1-VH1；或
TRBV1-scFv1 和 scFv2-TRAV1；或
TRAV1-scFv1 和 scFv2-TRBV1；或
TRBV1-VHH1 和 scFv2-TRAV1；或
TRAV1-VHH1 和 scFv2-TRBV1；或
TRBV1-VL1 和 scFv2-TRAV1-VH1；或
TRAV1-VL1 和 scFv2-TRBV1-VH1。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含所述第一结合区、所述第二结合区和所述第四结合区，并且所述 VHH2 连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 N 端。在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：

VHH2-TRBV1-scFv1 和 TRAV1；或
VHH2-TRAV1-scFv1 和 TRBV1；或
VHH2-TRBV1-VHH1 和 TRAV1；或
VHH2-TRAV1-VHH1 和 TRBV1；或
VHH2-TRBV1-VL1 和 TRAV1-VH1；或
VHH2-TRAV1-VL1 和 TRBV1-VH1；或
TRBV1-scFv1 和 VHH2-TRAV1；或
TRAV1-scFv1 和 VHH2-TRBV1；或
TRBV1-VHH 和 VHH2-TRAV1；或
TRAV1-VHH 和 VHH2-TRBV1；或
TRBV1-VL1 和 VHH2-TRAV1-VH1；或
TRAV1-VL1 和 VHH2-TRBV1-VH1。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含所述第一结合区、所述第二结合区和所述第四结合区，并且所述 VH2 和 VL2 中的一个连接在所述 TRAV1 的 N 端，另一个连接在所述 TRBV1 的 N 端。在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：

VL2-TRBV1-scFv1 和 VH2-TRAV1；或
VH2-TRBV1-scFv1 和 VL2-TRAV1；或
VL2-TRAV1-scFv1 和 VH2-TRBV1；或
VH2-TRAV1-scFv1 和 VL2-TRBV1；或
VL2-TRBV1-VHH 和 VH2-TRAV1；或
VH2-TRBV1-VHH 和 VL2-TRAV1；或
VL2-TRAV1-VHH 和 VH2-TRBV1；或
VH2-TRAV1-VHH 和 VL2-TRBV1；或
VL2-TRBV1-VL1 和 VH2-TRAV1-VH1；或
VH2-TRBV1-VL1 和 VL2-TRAV1-VH1；或
VL2-TRAV1-VL1 和 VH2-TRBV1-VH1；或
VH2-TRAV1-VL1 和 VL2-TRBV1-VH1。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含所述第一结合区、所述第二结合区、所述第三结合区和所述第四结合区，并且所述 VH2 和 VL2 形成 scFv2 连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 N 端。在一些实施方案中，所述 VH2 和 VL2 通过接头连接形成 scFv2。在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：

scFv2-TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 TRAV1；或
scFv2-TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 TRAV1；或
scFv2-TRBV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 TRAV1；或
scFv2-TRBV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 TRAV1；或
scFv2-TRAV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 TRBV1；或
scFv2-TRAV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 TRBV1；或

scFv2-TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 TRBV1；或
scFv2-TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 TRBV1；或
TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 scFv2-TRAV1；或
5 TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 scFv2-TRAV1；或
TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 scFv2-TRAV1；或
TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 scFv2-TRBV1；或
TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 scFv2-TRBV1；或
10 TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 scFv2-TRBV1；或
TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 scFv2-TRBV1。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含所述第一结合区、所述第二结合区、所述第三结合区和所述第四结合区，并且所述 VHH2 连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 N 端。在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：

VHH2-TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 TRAV1；或
15 VHH2-TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 TRAV1；或
VHH2-TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 TRAV1；或
VHH2-TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 TRAV1；或
VHH2-TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 TRBV1；或
VHH2-TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 TRBV1；或
20 VHH2-TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 TRBV1；或
VHH2-TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 TRBV1；或
TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 VHH2-TRAV1；或
TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 VHH2-TRAV1；或
25 TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 VHH2-TRAV1；或
TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 VHH2-TRBV1；或
TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 VHH2-TRBV1；或
TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 VHH2-TRBV1；或
30 TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 VHH2-TRBV1。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含所述第一结合区、所述第二结合区、所述第三结合区和所述第四结合区，并且所述 VH2 和 VL2 中的一个连接在所述 TRAV1 的 N 端，另一个连接在所述 TRBV1 的 N 端。在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：

VL2-TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 VH2-TRAV1；或
VL2-TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 VH2-TRAV1；或
35 VH2-TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 VL2-TRAV1；或
VH2-TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 VL2-TRAV1；或
VL2-TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 VH2-TRAV1；或
VL2-TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 VH2-TRAV1；或
VH2-TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 VL2-TRAV1；或
40 VH2-TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 VL2-TRAV1；或
VL2-TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 VH2-TRBV1；或
VL2-TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 VH2-TRBV1；或
VH2-TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 VL2-TRBV1；或
45 VL2-TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 VH2-TRBV1；或
VL2-TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 VH2-TRBV1；或
VH2-TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 VL2-TRBV1；或
VH2-TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 VL2-TRBV1。

在本发明第二方面的多特异性多肽分子的实施方案中，所述功能结构域来源于白蛋白或其结合部分和任选的抗体的铰链区；并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任一条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

在一些实施方案中，所述功能结构域来源于白蛋白或其结合部分，并且所述白蛋白或其结合部分通过接头连接在所述多特异性多肽分子的任一条多肽链的 C 末端。

在一些实施方案中，所述功能结构域来源于白蛋白或其结合部分和抗体的铰链区，所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任一条多肽链的 C 末端，并且白蛋白或其结合部分通过任选的接头连接在抗体的铰链区的任意一条链的 C 末端。

5 在一些实施方案中，所述功能结构域包含两条链，并且所述多特异性多肽分子的两条链通过所述功能结构域的两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。

在一些实施方案中，所述功能结构域包含两条链，所述第一结合区和第二结合区通过所述功能结构域的两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。

在一些实施方案中，所述功能结构域包含两条链，分别连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

10 在一些实施方案中，所述功能结构域的一条链通过任选的接头连接在 TCR 的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端，另外一条连接在抗体的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

在一些实施方案中，所述功能结构域的一条链连接在 TRAV1 或 TRBV1 所在链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端，另一条连接在抗体所在链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

15 在一些实施方案中，TRAV1 和 TRBV1 位于两条不同的多肽链上，所述功能结构域的一条链连接在 TRAV1 或 TRBV1 所在链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端，另一条连接在抗体所在链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

20 在一些实施方案中，TRAV1 和 TRBV1 位于两条不同的多肽链上，所述第二结合区包含 VHH1，或者包含 VH1 和 VL1 并且所述 VH1 和 VL1 在一条多肽链上，所述功能结构域的一条链连接在 TRAV1 或 TRBV1 所在链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端，另一条连接在抗体所在链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

在一些实施方案中，TRAV1 和 TRBV1 位于两条不同的多肽链上，并且所述 VH1 和 VL1 中的一个连接在所述 TRAV1 所在链的 C 端，另一个连接在所述 TRBV1 所在链的 C 端，其中，所述功能结构域的两条链分别连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

25 在一些实施方案中，TRAV1 和 TRBV1 位于两条不同的多肽链上，所述 VH1 和 VL1 在一条多肽链上且 N 末端连接在 TRAV1 或 TRBV1 所在多肽链的 C 端，C 末端连接所述功能结构域的一条链，所述功能结构域的另一条链连接在 TRBV1 或 TRAV1 所在多肽链的 C 末端。

在一些实施方案中，TRAV1 和 TRBV1 位于两条不同的多肽链上，所述 VH1 和 VL1 在一条多肽链上连接在 TRAV1 或 TRBV1 所在多肽链的 C 端，所述功能结构域的一条链连接在 TRAV1 所在链的 N 末端，另一条链连接在 TRBV1 所在链的 N 末端。

30 在本发明第二方面的多特异性多肽分子的实施方案中，所述功能结构域来源于抗体的铰链区和/或抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分和/或抗体的 CH3 结构域；并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。在一些实施方案中，所述功能结构域来源于抗体的铰链区和/或抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分和/或抗体的 CH3 结构域；并且所述功能结构域的两条链分别通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

35 在一些实施方案中，所述功能结构域来源于抗体的铰链区和/或抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分和/或抗体的 CH3 结构域，并且所述多特异性多肽分子的两条链通过所述功能结构域的两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。

40 在一些实施方案中，所述功能结构域来源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分和任选的抗体的铰链区。在一些实施方案中，所述功能结构域来源于抗体的铰链区和抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分。在一些实施方案中，所述功能结构域来源于抗体的 Fc 结构域。在一些实施方案中，所述功能结构域为抗体的 Fc 结构域。在一些实施方案中，所述功能结构域通过任选的接头分别连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

45 在一些实施方案中，所述功能结构域来源于抗体的 CH3 结构域和任选的抗体的铰链区。在一些实施方案中，所述功能结构域来源于抗体的铰链区和抗体的 CH3 结构域。在一些实施方案中，所述功能结构域通过任选的接头分别连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

50 在一些实施方案中，所述功能结构域来源于 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区。在一些实施方案中，所述功能结构域来源于抗体的铰链区和 TCR 的恒定区或其片段。在一些实施方案中，所述功能结构域通过任选的接头分别连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。在一些实施方案中，所述恒定区或其片段包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和 TCR β 链恒定区(TRBC)，并且所述 TRAC 和 TRBC 分别连接至通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

在本发明第二方面的多特异性多肽分子的实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和/或 TRBV1 的 C 端的恒定结构域。

在一种实施方案中，所述恒定结构域为 TCR 恒定区或其片段，所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC)。

5 在一种实施方案中，所述恒定结构域为 CH3，所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域，优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变。

在一种实施方案中，所述恒定结构域为 CL 和 CH1，所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域，并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

10 在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TCR 恒定区或其片段。在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含通过任选的接头分别连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TRAC 和 TRBC。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链，并且包含所述第一结合区和所述第二结合区以及分别连接在任意一条多肽链 C 末端的来源于白蛋白或其结合部分和任选的抗体的铰链区的功能结构域；其中：

15 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区；或

20 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区；或

25 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区；或

30 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区；或

35 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

40 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

45 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

50 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或
- 5 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区；或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区；或
- 10 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或
- 15 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区；或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区。
- 20 在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链，并且包含所述第一结合区和所述第二结合区以及分别连接在所述第一多肽链和第二多肽链 C 末端的来源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分和任选的抗体的铰链区的功能结构域；其中：
- 25 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或
- 30 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或
- 35 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或
- 40 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或
- 45 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或
- 50 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的

的接头-任选的铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链，并且包含所述第一结合区、所述第二结合区和所述第三结合区以及连接在任意一条多肽链上 C 末端的来源于白蛋白或其结合部分和任选的抗体的铰链区的功能结构域，并且所述 VH1 和 VL1 在一条多肽链上连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 C 端，所述 TRAV2 和所述 TRBV2 通过接头连接在同一条多肽链上并且连接在 VH1 与 VL1 之间；其中：

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选

的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb。

在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子包含所述第一结合区、所述第二结合区和所述第三结合区以及来源于抗体的Fc结构域或其二聚化部分和任选的抗体的铰链区的功能结构域,并且所述多特异性多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链;其中:

- 5 所述第一多肽链从N端到C端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3;或
- 所述第一多肽链从N端到C端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3;或
- 10 所述第一多肽链从N端到C端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3;或
- 所述第一多肽链从N端到C端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3;或
- 15 所述第一多肽链从N端到C端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3;或
- 所述第一多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3;或
- 20 所述第一多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3;或
- 所述第一多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3;或
- 25 所述第一多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3。
- 在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子包含所述第一结合区、所述第二结合区和所述第四结合区以及来源于白蛋白或其结合部分和任选的抗体的铰链区的功能结构域,并且所述多特异性多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链;其中:
- 30 所述第一多肽链从N端到C端包含:scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-Alb,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区;或
- 35 所述第一多肽链从N端到C端包含:scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb;或
- 所述第一多肽链从N端到C端包含:scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-Alb,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区;或
- 40 所述第一多肽链从N端到C端包含:scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb;或
- 所述第一多肽链从N端到C端包含:scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区;或
- 45 所述第一多肽链从N端到C端包含:scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb;或
- 所述第一多肽链从N端到C端包含:scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb;或
- 50 所述第一多肽链从N端到C端包含:scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区;或
- 所述第一多肽链从N端到C端包含:scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VHH1-任选的

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VHH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的

- 头-任选的铰链区-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb。
- 在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子包含所述第一结合区、所述第二结合区和所述第四结合区以及来源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分和任选的抗体的铰链区的功能结构域, 并且所述多特异性多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链; 其中:
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接

头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

5 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

10 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

15 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

20 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

25 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VHH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

30 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

35 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子包含所述第一结合区、所述第二结合区、所述第三结合区和所述第四结合区以及来源于白蛋白或其结合部分和任选的抗体的铰链区的功能结构域, 并且所述多特异性多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链; 其中:

45 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb; 或

50 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-A1b, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-A1b; 或

TRBV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区; 或

所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-A1b, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-A1b, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-A1b; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-Alb; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端

含: VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-A1b，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区；或

5 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-A1b，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRAIV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-Alb。

15 在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子包含所述第一结合区、所述第二结合区、所述第三结合区和所述第四结合区以及来源于抗体的Fc结构域或其二聚化部分和任选的抗体的较链区的功能结构域,并且所述多特异性多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链;其中:

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

20 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRA V2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRA V1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

35 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRBV2-接头-
45 TRAV2-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含:
scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRBV2-接头-TRAV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

50 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VL1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-TRBV2-接头-

C 端包含：VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述 scFv1 从 N 端到 C 端由以下组成：VH1-接头 VL1 或 VL1-接头-VH1。

在一些实施方案中，所述 scFv2 从 N 端到 C 端由以下组成：VH2-接头 VL2 或 VL2-接头-VH2。

5 在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含通过任选的接头分别连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 CH3。在这种情况下，上述多特异性多肽分子的第一多肽链和第二多肽链中的分别连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TRAC 和 TRBC 均被替换为 CH3。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 CL 和 CH1。在一些实施方案中，CL 连接至 TRAV1 的 C 端，并且 CH1 连接至 TRBV1 的 C 端。

10 在一些实施方案中，CH1 连接至 TRAV1 的 C 端，并且 CL 连接至 TRBV1 的 C 端。在这种情况下，上述多特异性多肽分子的第一多肽链和第二多肽链中的分别连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TRAC 和 TRBC 分别被替换为 CL 和 CH1 或替换为 CH1 和 CL。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子不包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和/或 TRBV1 的 C 端的恒定区，例如，TCR 恒定区或其片段、CH3，或 CL 和 CH1。在这种情况下，上述多特异性多肽分子的第一多肽链和第二多肽链中的分别连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TRAC 和 TRBC 分别去除。例如，“所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3”调整为“所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-接头-scFv1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3”。

20 在本发明第二方面的多特异性多肽分子的实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含分别连接至所述 VH1 和 VL1 的来源于抗体的 CH1 和 CL，其中所述 VH1、VL1、CH1 和 CL 形成单链 Fab 并通过接头连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 C 端。在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：

25 TRBV1-VL1-CL-VH1-CH1 和 TRAV1；或
TRBV1-VH1-CH1-VL1-CL 和 TRAV1；或
TRAV1-VL1-CL-VH1-CH1 和 TRBV1；或
TRAV1-VH1-CH1-VL1-CL 和 TRBV1。

在本发明第二方面的多特异性多肽分子的实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含与第四抗原结合的第四结合区，所述第四结合区包含来源于与第四抗原结合的抗体的重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2，以及来源于抗体的 CH1 和 CL。

30 在一些实施方案中，所述 VH2、VL2、CH1 和 CL 形成单链 Fab2 连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 N 端。在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：

35 Fab2-TRBV1-scFv1 和 TRAV1；或
Fab2-TRAV1-scFv1 和 TRBV1；或
Fab2-TRBV1-VHH1 和 TRAV1；或
Fab2-TRAV1-VHH1 和 TRBV1；或
Fab2-TRBV1-VL1 和 TRAV1-VH1；或
Fab2-TRAV1-VL1 和 TRBV1-VH1；或
40 TRBV1-scFv1 和 Fab2-TRAV1；或
TRAV1-scFv1 和 Fab2-TRBV1；或
TRBV1-VHH1 和 Fab2-TRAV1；或
TRAV1-VHH1 和 Fab2-TRBV1；或
TRBV1-VL1 和 Fab2-TRAV1-VH1；或
TRAV1-VL1 和 Fab2-TRBV1-VH1；或

45 在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子包含所述第一结合区、所述第二结合区、所述第三结合区和所述第四结合区，所述第四结合区包含来源于与第四抗原结合的抗体的重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2，以及来源于抗体的 CH1 和 CL，其中所述 VH2、VL2、CH1 和 CL 形成单链 Fab2 连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 N 端。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：

50 Fab2-TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 TRAV1；或
Fab2-TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 TRAV1；或
Fab2-TRBV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 TRAV1；或
Fab2-TRBV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 TRAV1；或

- Fab2-TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 TRBV1; 或
Fab2-TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 TRBV1; 或
Fab2-TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 TRBV1; 或
Fab2-TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 TRBV1; 或
5 TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 Fab2-TRAV1; 或
TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 Fab2-TRAV1; 或
TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 Fab2-TRAV1; 或
TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 Fab2-TRBV1; 或
10 TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 Fab2-TRBV1; 或
TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 Fab2-TRBV1; 或
TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 Fab2-TRBV1。
在一些实施方案中, 所述 Fab2 从 N 端到 C 端选自 VL2-CL-VH2-CH1、VH2-CH1-VL2-CL、VL2-
CL-VH2-CH1 和 VH2-CH1-VL2-CL。
- 15 在本发明第二方面的多特异性多肽分子的优选实施方案中, 所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链; 其中:
所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-
-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-
-铰链区-CH2-CH3 (format 62); 或
20 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-
-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-
-铰链区-CH2-CH3 (format 62-LJH1); 或
所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-VL1-任选的接头-
-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-
25 -铰链区-CH2-CH3 (format 62-LJH2); 或
所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-接头-VL1-任选的接头-
-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-
-铰链区-CH2-CH3 (format 62-LJH3); 或
所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-接头-CH2-
30 CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-CH2-CH3 (format
62-3); 或
所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-
-铰链区-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链
区-CH3 (format 62-4); 或
35 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-
-铰链区-TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰
链区-TRAC (format 62-5); 或
所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-
-铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-
40 Alb (format 62-6); 或
所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-接头-Alb,
并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC (format 62-7); 或
所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-CH3-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-
-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-CH3-任选的
45 接头-任选的铰链区-CH2-CH3 (format 62-8); 或
所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-CH1-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-
-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-CL-任选的接头-
-铰链区-CH2-CH3; 或
所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-CL-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-任
50 选的铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-CH1-任选的接
头-任选的铰链区-CH2-CH3; 或
所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VHH1-任选的接头-铰链区-
CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-

CH2-CH3 (format 62-10); 或

所述抗体是抗体 Fab, 并且其中所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-CL-接头-VH1-CH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3 (format 62-12); 或

5 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3 (format 58-2); 或

10 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3 (format 72); 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3 (format 72-2); 或

15 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3 (format 72-3); 或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3 (format 50-2)。

20 在第三方面, 本发明提供了一种多特异性多肽分子, 所述多特异性多肽分子在三条多肽链上包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区,

其中所述第一结合区包含来源于与所述第一抗原-MHC 复合物结合的 T 细胞受体(TCR)的 α 链可变区(TRAV1)和 β 链可变区(TRBV1);

25 其中所述第二结合区包含来源于与所述第二抗原结合的抗体的重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1 或来源于与所述第二抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH1);

其中所述第一抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原, 且所述第二抗原为免疫细胞表面分子;

所述第二结合区与所述第一结合区不相连。

30 在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含至少一个能够延长所述多特异性多肽分子半衰期的功能结构域。在一些实施方案中, 所述延长半衰期的功能结构域选自以下的任何一种功能结构域:

- 35
- 1) 源于抗体的铰链区;
 - 2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分;
 - 3) 源于抗体的 CH3 结构域;
 - 4) 白蛋白(Alb) 或其结合部分;
 - 5) 源于 TCR 的恒定区或其片段。

在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含以下至少一种功能结构域:

- 40
- 1) 源于抗体的铰链区;
 - 2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分;
 - 3) 源于抗体的 CH3 结构域;
 - 4) 白蛋白(Alb) 或其结合部分;
 - 5) 源于 TCR 的恒定区或其片段。

45 在一些实施方案中, 所述第二结合区与所述第一结合区不直接相连。在一些实施方案中, 所述第二结合区与所述第一结合区不通过接头连接。所述“不直接相连”是指, 第二结合区的全部或部分氨基酸序列不通过任何的形式与第一结合区的全部或部分氨基酸序列连接在一条多肽链上。

50 在一些实施方案中, 所述 VH1 和 VL1 串联在一条多肽链上(例如形成 scFv1 或 Fab1), 并且所述 TRAV1 和 TRBV1 位于不同的多肽链上。在一些实施方案中, 所述 VH1 和 VL1 串联在一条多肽链上(例如形成 scFv1 或 Fab1), 并且所述 TRAV1 和 TRBV1 分别位于另外两条多肽链上。在一些实施方案中, 所述 VH1 和 VL1 串联在一条多肽链上(例如形成 scFv1 或 Fab1), 并且不与 TRAV1 和 TRBV1 所在的多肽链直接相连。

在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子的三条多肽链分别包含:

TRBV1, VL1-VH1, 和 TRAV1; 或

TRBV1, VH1-VL1, 和 TRAV1; 或

TRBV1, VHH1, 和 TRAV1。

在本发明第三方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和/或 TRBV1 的 C 端的选自以下的恒定结构域:

(1) TCR 恒定区或其片段, 所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC);

(2) CH3, 所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域, 优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变;

(3) CL 和 CH1, 所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域, 并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TCR 恒定区或其片段。在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子包含通过任选的接头分别连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TRAC 和 TRBC。在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子的三条多肽链分别包含:

TRBV1-TRBC, VL1-VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或

TRBV1-TRBC, VH1-VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或

TRBV1-TRBC, scFv1, 和 TRAV1-TRAC; 或

TRBV1-TRBC, VHH1, 和 TRAV1-TRAC。

在本发明第三方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含分别连接至所述 VH1 和 VL1 的来源于抗体的 CH1 和 CL, 其中所述 VH1、VL1、CH1 和 CL 形成单链 Fab1 并通过任选的接头连接至所述功能结构域的 N 端。在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子的三条多肽链分别包含: TRBV1-TRBC, Fab1, 和 TRAV1-TRAC。

在本发明第三方面的多特异性多肽分子的实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含与第三抗原结合的第三结合区, 所述第三结合区包含来源于与所述第三抗原-MHC 复合物结合的 TCR 的 α 链可变区(TRAV2)和 β 链可变区(TRBV2); 其中所述第三抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原, 并且所述第三抗原与所述第一抗原相同或不同。在一些实施方案中, 所述 TRAV2 与所述 TRAV1 相同, 和/或所述 TRBV2 与所述 TRBV1 相同。

在一些实施方案中, 所述 TRAV2 和所述 TRBV2 通过接头连接在同一条多肽链上。

在一些实施方案中, 所述 TRAV2 和所述 TRBV2 通过接头连接在同一条多肽链上并且连接在 VH1 与 VL1 之间。

在本发明第三方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV2 和/或 TRBV2 的 C 端的选自以下的恒定结构域:

(1) TCR 恒定区或其片段, 所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC);

(2) CH3, 所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域, 优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变;

(3) CL 和 CH1, 所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域, 并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

在一些实施方案中, 本发明第三方面的多特异性多肽分子包含第一结合区、第二结合区和第三结合区, 所述多特异性多肽分子的三条多肽链分别包含:

TRBV1-TRBC, VL1-TRBV2-TRAV2-VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或

TRBV1-TRBC, VL1-TRAV2-TRBV2-VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或

TRBV1-TRBC, VH1-TRBV2-TRAV2-VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或

TRBV1-TRBC, VH1-TRAV2-TRBV2-VL1, 和 TRAV1-TRAC。

在本发明第三方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含与第四抗原结合的第四结合区, 所述第四结合区包含来源于与所述第四抗原结合的抗体的重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2 或来源于与所述第四抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH2); 其中所述第四抗原为免疫细胞表面分子, 并且所述第四抗原与所述第二抗原相同或不同。在一些实施方案中, 所述 VH2 与所述 VH1 相同。在一些实施方案中, 所述 VL2 与所述 VL1 相同。在一些实施方案中, 所述 VHH2 与所述 VHH1 相同。

在一些实施方案中, 所述 VHH2 或所述 VH2 和 VL2 形成 scFv2 连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 N 端或 C 端, 或者所述 VH2 和 VL2 中的一个连接在所述 TRAV1 的 N 端或 C 端, 另一个连接在所述 TRBV1 的 N 端或 C 端。在一些实施方案中, 所述 VHH2 或所述 VH2 和 VL2 形成 scFv2 连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 N 端, 或者所述 VH2 和 VL2 中的一个连接在所述 TRAV1 的 N

端, 另一个连接在所述 TRBV1 的 N 端。在一些实施方案中, scFv2 包含 VH2-VL2 或 VL2-VH2。

在一些实施方案中, 本发明第三方面的多特异性多肽分子所述多特异性多肽分子的三条多肽链分别包含:

- 5 scFv2-TRBV1-TRBC, VL1-VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC, VL1-VH1, 和 scFv2-TRAV1-TRAC; 或
 scFv2-TRBV1-TRBC, VH1-VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC, VH1-VL1, 和 scFv2-TRAV1-TRAC; 或
 scFv2-TRBV1-TRBC, scFv1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC, scFv1, 和 scFv2-TRAV1-TRAC。

- 10 在本发明第三方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含分别连接至所述 VH2 和 VL2 的来源于抗体的 CH1 和 CL。在一些实施方案中, 所述 VH2、VL2、CH1 和 CL 形成 Fab2 并通过任选的接头连接至所述 TRBV1 或 TRAV1 的 N 端。在一些实施方案中, Fab2 包含 VL1-CL-VH1-CH1、VL1-CH1-VH1-CL、VH1-CH1-VL1-CL 或 VH1-CL-VL1-CH1。

- 15 在一些实施方案中, 本发明第三方面的多特异性多肽分子包含第一结合区、第二结合区、第三结合区和第四结合区, 多肽分子的三条多肽链分别包含:

- scFv2-TRBV1-TRBC, VL1-TRBV2-TRAV2-VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 scFv2-TRBV1-TRBC, VH1-TRBV2-TRAV2-VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 scFv2-TRBV1-TRBC, VL1-TRAV2-TRBV2-VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 scFv2-TRBV1-TRBC, VH1-TRAV2-TRBV2-VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或
20 TRBV1-TRBC, VL1-TRBV2-TRAV2-VH1, 和 scFv2-TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC, VH1-TRBV2-TRAV2-VL1, 和 scFv2-TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC, VL1-TRAV2-TRBV2-VH1, 和 scFv2-TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC, VH1-TRAV2-TRBV2-VL1, 和 scFv2-TRAV1-TRAC; 或
25 scFv2-TRBV1-TRBC, VL1-TRBV2-TRAV2-VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 scFv2-TRBV1-TRBC, VH1-TRAV2-TRBV2-VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 scFv2-TRBV1-TRBC, VL1-TRAV2-TRBV2-VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC, VH1-TRBV2-TRAV2-VL1, 和 scFv2-TRAV1-TRAC; 或
30 TRBV1-TRBC, VL1-TRBV2-TRAV2-VH1, 和 scFv2-TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC, VH1-TRAV2-TRBV2-VL1, 和 scFv2-TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC, VL1-TRAV2-TRBV2-VH1, 和 scFv2-TRAV1-TRAC。

在一些实施方案中, 所述功能结构域含有两条链, 分别连接在本发明第三方面的多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端。

- 35 在一些实施方案中, 所述功能结构域含有两条链, 并且所述多特异性多肽分子的第一结合区和第二结合区通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。

在一些实施方案中, 所述功能结构域含有两条链, 分别连接在本发明第三方面的多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端, 并且所述多特异性多肽分子的第一结合区和第二结合区通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。

- 40 在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子的第一结合区和第二结合区通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接, 并且, 所述功能结构域的一条链连接在第二结合区的抗体所在肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端, 另一条链连接在第一结合区中 TRAV1 或 TRBV1 所在肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端。

- 45 在本发明第三方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述功能结构域来源于抗体的铰链区和/或抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分; 并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端。

在本发明第三方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述功能结构域来源于抗体的 CH3 结构域和任选的抗体的铰链区; 并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端。

- 50 在本发明第三方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述功能结构域来源于 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区; 并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端。

在一些实施方案中, 所述 TCR 的恒定区或其片段选自 TCR α 链恒定区(TRAC)和 TCR β 链恒定区(TRBC)。

在本发明第三方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述 TCR 为 $\alpha\beta$ TCR，形成两条多肽链，且 VH1 和 VL1 串联形成 scFv，形成第三条多肽链；并且所述功能结构域来源于抗体的铰链区和抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分；其中所述功能结构域的一条链通过任选的接头连接在 scFv 的 C 末端，另外一条链连接在所述 TCR 的 α 链或 β 链的 C 末端。在一些实施方案中，所述 α 链和 β 链各自独立的包含可变区，例如， α 链包含 TRAV1， β 链包含 TRBV1。在一些实施方案中，所述 α 链和 β 链各自独立的包含可变区和恒定区，例如， α 链包含 TRAV1 和 TRAC， β 链包含 TRBV1 和 TRBC。

在本发明第三方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述多肽分子包含第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链；其中：

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3（format 59）。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VHH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VHH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC。

在第四方面，本发明提供了一种多特异性多肽分子，所述多特异性多肽分子在三条多肽链上包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区，

其中所述第一结合区包含来源于与所述第一抗原-MHC 复合物结合的 T 细胞受体(TCR)的 α 链可变区(TRAV1)和 β 链可变区(TRBV1)；

其中所述第二结合区包含来源于与所述第二抗原结合的抗体的重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1；

其中所述第一抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原，且所述第二抗原为免疫细胞表面分子；

其中所述 TRAV1 和 TRBV1 分别分布在两条不同的多肽链上，所述 VH1 和 VL1 分别分布在两条不同的多肽链上，并且所述 VH1 或 VL1 所在肽链连接至所述 TRAV1 或 TRBV1 所在肽链的 C 端。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含至少一种能够延长所述多特异性多肽分子半衰期的功能结构域。在一些实施方案中，能够延长所述多特异性多肽分子半衰期的功能结构域选自以下至少一种：

- 1) 源于抗体的铰链区；
- 2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分；
- 3) 源于抗体的 CH3 结构域；
- 4) 白蛋白(Alb) 或其结合部分；
- 5) 源于 TCR 的恒定区或其片段。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含以下至少一种功能结构域：

- 1) 源于抗体的铰链区；
- 2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分；
- 3) 源于抗体的 CH3 结构域；
- 4) 白蛋白(Alb) 或其结合部分；
- 5) 源于 TCR 的恒定区或其片段。

在一些实施方案中，所述 VH1 或 VL1 所在肽链的 N 端连接至所述 TRAV1 或 TRBV1 所在肽链的 C 端。在一些实施方案中，所述 VH1 或 VL1 所在肽链的 N 末端连接至所述 TRAV1 或 TRBV1 所在肽链的 C 末端。

在一些实施方案中,所述 VL1 或 VH1 所在肽链通过接头连接在所述 TRBV1 或 TRAV1 所在肽链的 C 端。在优选的实施方案中,所述 VL1 或 VH1 所在肽链的 N 末端通过接头连接在所述 TRBV1 或 TRAV1 所在肽链的 C 末端。

在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子的三条多肽链分别包含:

- 5 TRBV1-VL1, VH1, 和 TRAV1; 或
 TRBV1-VH1, VL1, 和 TRAV1; 或
 TRAV1-VL1, VH1, 和 TRBV1; 或
 TRAV1-VH1, VL1, 和 TRBV1。

- 10 在本发明第四方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含通过任
 选的接头连接至 TRAV1 和/或 TRBV1 的 C 端的选自以下的恒定结构域:

(1) TCR 恒定区或其片段,所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC);

(2) CH3, 所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域,优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变;

- 15 (3) CL 和 CH1, 所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域,并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TCR 恒定区或其片段。在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子包含通过任选的接头分别连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TRAC 和 TRBC。在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子的三条多肽链分别包含:

- 20 TRBV1-TRBC-VL1, VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC-VH1, VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRAV1-TRAC-VL1, VH1, 和 TRBV1-TRBC; 或
 TRAV1-TRAC-VH1, VL1, 和 TRBV1-TRBC。

- 25 在本发明第四方面的多特异性多肽分子的实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含分别连接至所述 VH1 和 VL1 的来源于抗体的 CH1 和 CL。在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子的三条多肽链分别包含:

- 30 TRBV1-TRBC-VL1-CL, VH1-CH, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC-VH1-CH, VL1-CL, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRAV1-TRAC-VL1-CL, VH1-CH, 和 TRBV1-TRBC; 或
 TRAV1-TRAC-VH1-CH, VL1-CL, 和 TRBV1-TRBC。

- 35 在本发明第四方面的多特异性多肽分子的实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含与第三抗原结合的第三结合区,所述第三结合区包含来源于与所述第三抗原-MHC 复合物结合的 TCR 的 α 链可变区(TRAV2)和 β 链可变区(TRBV2); 其中所述第三抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原,并且所述第三抗原与所述第一抗原相同或不同。在一些实施方案中,所述 TRAV2 与所述 TRAV1 相同。在一些实施方案中,所述 TRBV2 与所述 TRBV1 相同。

- 40 在一些实施方案中,所述 TRAV2 或所述 TRBV2 通过任选的接头连接在 VH1 或 VL1 的 C 端。在一些实施方案中,所述 TRAV2 和所述 TRBV2 串联在一条链上,并通过任选的接头连接在 VH1 的 C 端或 VL1 的 C 端。在一些实施方案中,所述 TRAV2 和所述 TRBV2 中的一个连接在 VH1 的 C 端,另一个连接在 VL1 的 C 端。

在一些实施方案中,本发明第三方面的多特异性多肽分子包含第一结合区、第二结合区和第三结合区,所述多特异性多肽分子的三条多肽链分别包含:

- 45 TRBV1-TRBC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC-VL1-TRAV2-TRBV2, VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRBV2-TRAV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或
50 TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRAV2-TRBV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
 TRAV1-TRAC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 TRBV1-TRBC; 或
 TRAV1-TRAC-VL1-TRAV2-TRBV2, VH1, 和 TRBV1-TRBC; 或
 TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRBV2-TRAV2, 和 TRBV1-TRBC; 或

- TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 TRBV1-TRBC; 或
5 TRAV1-TRAC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VH1, VL1-TRAV2-TRBV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRBV1-TRBC-VL1-TRAV2, VH1-TRAV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VL1-TRAV2, VH1-TRBV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VH1-TRBV2, VL1-TRAV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
10 TRBV1-TRBC-VH1-TRAV2, VL1-TRBV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
TRAV1-TRAC-VL1-TRBV2, VH1-TRAV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VL1-TRAV2, VH1-TRBV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VH1-TRBV2, VL1-TRAV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VH1-TRAV2, VL1-TRBV2, 和 TRBV1-TRBC。
- 15 在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV2 和/或 TRBV2 的 C 端的选自以下的恒定结构域:
- (1) TCR 恒定区或其片段, 所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC);
- (2) CH3, 所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域, 优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变;
- 20 (3) CL 和 CH1, 所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域, 并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。
- 在本发明第四方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含与第四抗原结合的第四结合区, 所述第四结合区包含来源于与所述第四抗原结合的抗体的重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2 或来源于与所述第四抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH); 其中
- 25 所述第四抗原为免疫细胞表面分子, 并且所述第四抗原与所述第二抗原相同或不同。在一些实施方案中, 所述 VH2 与所述 VH1 相同。在一些实施方案中, 所述 VL2 与所述 VL1 相同。
- 在一些实施方案中, 所述 VHH 或所述 VH2 和 VL2 形成 scFv 连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 N 端或 C 端, 或者所述 VH2 和 VL2 中的一个连接在所述 TRAV1 的 N 端或 C 端, 另一个连接在所述 TRBV1 的 N 端或 C 端。在一些实施方案中, 所述 VHH 或所述 VH2 和 VL2 形成 scFv 连接在所述
- 30 TRAV1 或所述 TRBV1 的 N 端, 或者所述 VH2 和 VL2 中的一个连接在所述 TRAV1 的 N 端, 另一个连接在所述 TRBV1 的 N 端。在一些实施方案中, scFv 包含 VH2-VL2 或 VL2-VH2。
- 在一些实施方案中, 本发明第三方面的多特异性多肽分子所述多特异性多肽分子的三条多肽链分别包含:
- 35 scFv-TRBV1-TRBC-VL1, VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VL1, VH1, 和 scFv-TRAV1-TRAC; 或
VHH-TRBV1-TRBC-VL1, VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VL1, VH1, 和 VHH-TRAV1-TRAC; 或
VH2-TRBV1-TRBC-VL1, VH1, 和 VL2-TRAV1-TRAC; 或
VL2-TRBV1-TRBC-VL1, VH1, 和 VH2-TRAV1-TRAC; 或
40 scFv-TRBV1-TRBC-VH1, VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VH1, VL1, 和 scFv-TRAV1-TRAC; 或
VHH-TRBV1-TRBC-VH1, VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VH1, VL1, 和 VHH-TRAV1-TRAC; 或
VH2-TRBV1-TRBC-VH1, VL1, 和 VL2-TRAV1-TRAC; 或
45 VL2-TRBV1-TRBC-VH1, VL1, 和 VH2-TRAV1-TRAC; 或
scFv-TRAV1-TRAC-VL1, VH1, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VL1, VH1, 和 scFv-TRBV1-TRBC; 或
VHH-TRAV1-TRAC-VL1, VH1, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VL1, VH1, 和 VHH-TRBV1-TRBC; 或
50 VH2-TRAV1-TRAC-VL1, VH1, 和 VL2-TRBV1-TRBC; 或
VL2-TRAV1-TRAC-VL1, VH1, 和 VH2-TRBV1-TRBC; 或
scFv-TRAV1-TRAC-VH1, VL1, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VH1, VL1, 和 scFv-TRBV1-TRBC; 或

VHH-TRAV1-TRAC-VH1, VL1, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VH1, VL1, 和 VHH-TRBV1-TRBC; 或
VH2-TRAV1-TRAC-VH1, VL1, 和 VL2-TRBV1-TRBC; 或
VL2-TRAV1-TRAC-VH1, VL1, 和 VH2-TRBV1-TRBC。

5 在本发明第四方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含分别连接至所述 VH2 和 VL2 的来源于抗体的 CH1 和 CL, 其中所述 VH2、VL2、CH1 和 CL 形成单链 Fab 并通过任选的接头连接至所述功能结构域的 N 端。在一些实施方案中, Fab 包含 VL1-CL-VH1-CH1、VL1-CH1-VH1-CL、VH1-CH1-VL1-CL 或 VH1-CL-VL1-CH1。

10 在一些实施方案中, 本发明第四方面的多特异性多肽分子包含第一结合区、第二结合区、第三结合区和第四结合区, 多肽分子的三条多肽链分别包含:

scFv-TRBV1-TRBC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
scFv-TRBV1-TRBC-VL1-TRAV2-TRBV2, VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
scFv-TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
scFv-TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
15 TRBV1-TRBC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 scFv-TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VL1-TRAV2-TRBV2, VH1, 和 scFv-TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRBV2-TRAV2, 和 scFv-TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 scFv-TRAV1-TRAC; 或
20 VHH-TRBV1-TRBC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
VHH-TRBV1-TRBC-VL1-TRAV2-TRBV2, VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或
VHH-TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRBV2-TRAV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
VHH-TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 VHH-TRAV1-TRAC; 或
25 TRBV1-TRBC-VL1-TRAV2-TRBV2, VH1, 和 VHH-TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRBV2-TRAV2, 和 VHH-TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 VHH-TRAV1-TRAC; 或
VH2-TRBV1-TRBC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 VL2-TRAV1-TRAC; 或
VH2-TRBV1-TRBC-VL1-TRAV2-TRBV2, VH1, 和 VL2-TRAV1-TRAC; 或
30 VH2-TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRBV2-TRAV2, 和 VL2-TRAV1-TRAC; 或
VH2-TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 VL2-TRAV1-TRAC; 或
VL2-TRBV1-TRBC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 VH2-TRAV1-TRAC; 或
VL2-TRBV1-TRBC-VL1-TRAV2-TRBV2, VH1, 和 VH2-TRAV1-TRAC; 或
VL2-TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRBV2-TRAV2, 和 VH2-TRAV1-TRAC; 或
35 VL2-TRBV1-TRBC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 VH2-TRAV1-TRAC; 或
scFv-TRBV1-TRBC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或
scFv-TRBV1-TRBC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或
scFv-TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
scFv-TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRAV2-TRBV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
40 TRBV1-TRBC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 scFv-TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 scFv-TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 scFv-TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRAV2-TRBV2, 和 scFv-TRAV1-TRAC; 或
VHH-TRBV1-TRBC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或
45 VHH-TRBV1-TRBC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或
VHH-TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
VHH-TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRAV2-TRBV2, 和 TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 VHH-TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 VHH-TRAV1-TRAC; 或
50 TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 VHH-TRAV1-TRAC; 或
TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRAV2-TRBV2, 和 VHH-TRAV1-TRAC; 或
VH2-TRBV1-TRBC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 VL2-TRAV1-TRAC; 或
VH2-TRBV1-TRBC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 VL2-TRAV1-TRAC; 或
VH2-TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 VL2-TRAV1-TRAC; 或

VH2-TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRAV2-TRBV2, 和 VL2-TRAV1-TRAC; 或
VL2-TRBV1-TRBC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 VH2-TRAV1-TRAC; 或
VL2-TRBV1-TRBC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 VH2-TRAV1-TRAC; 或
VL2-TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 VH2-TRAV1-TRAC; 或
5 VL2-TRBV1-TRBC-VH1, VL1-TRAV2-TRBV2, 和 VH2-TRAV1-TRAC; 或
scFv-TRAV1-TRAC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 TRBV1-TRBC; 或
scFv-TRAV1-TRAC-VL1-TRAV2-TRBV2, VH1, 和 TRBV1-TRBC; 或
scFv-TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRBV2-TRAV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
10 scFv-TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 scFv-TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VL1-TRAV2-TRBV2, VH1, 和 scFv-TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRBV2-TRAV2, 和 scFv-TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 scFv-TRBV1-TRBC; 或
15 VHH-TRAV1-TRAC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 TRBV1-TRBC; 或
VHH-TRAV1-TRAC-VL1-TRAV2-TRBV2, VH1, 和 TRBV1-TRBC; 或
VHH-TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRBV2-TRAV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
VHH-TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 VHH-TRBV1-TRBC; 或
20 TRAV1-TRAC-VL1-TRAV2-TRBV2, VH1, 和 VHH-TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRBV2-TRAV2, 和 VHH-TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 VHH-TRBV1-TRBC; 或
VH2-TRAV1-TRAC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 VL2-TRBV1-TRBC; 或
VH2-TRAV1-TRAC-VL1-TRAV2-TRBV2, VH1, 和 VL2-TRBV1-TRBC; 或
25 VH2-TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRBV2-TRAV2, 和 VL2-TRBV1-TRBC; 或
VH2-TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 VL2-TRBV1-TRBC; 或
VL2-TRAV1-TRAC-VL1-TRBV2-TRAV2, VH1, 和 VH2-TRBV1-TRBC; 或
VL2-TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRBV2-TRAV2, 和 VH2-TRBV1-TRBC; 或
VL2-TRAV1-TRAC-VL1, VH1-TRAV2-TRBV2, 和 VH2-TRBV1-TRBC; 或
30 scFv-TRAV1-TRAC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 TRBV1-TRBC; 或
scFv-TRAV1-TRAC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 TRBV1-TRBC; 或
scFv-TRAV1-TRAC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
scFv-TRAV1-TRAC-VH1, VL1-TRAV2-TRBV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
35 TRAV1-TRAC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 scFv-TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 scFv-TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 scFv-TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VH1, VL1-TRAV2-TRBV2, 和 scFv-TRBV1-TRBC; 或
VHH-TRAV1-TRAC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 TRBV1-TRBC; 或
40 VHH-TRAV1-TRAC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 TRBV1-TRBC; 或
VHH-TRAV1-TRAC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
VHH-TRAV1-TRAC-VH1, VL1-TRAV2-TRBV2, 和 TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 VHH-TRBV1-TRBC; 或
TRAV1-TRAC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 VHH-TRBV1-TRBC; 或
45 TRAV1-TRAC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 VHH-TRBV1-TRBC; 或
VH2-TRAV1-TRAC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 VL2-TRBV1-TRBC; 或
VH2-TRAV1-TRAC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 VL2-TRBV1-TRBC; 或
VH2-TRAV1-TRAC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 VL2-TRBV1-TRBC; 或
50 VL2-TRAV1-TRAC-VH1-TRBV2-TRAV2, VL1, 和 VH2-TRBV1-TRBC; 或
VL2-TRAV1-TRAC-VH1-TRAV2-TRBV2, VL1, 和 VH2-TRBV1-TRBC; 或
VL2-TRAV1-TRAC-VH1, VL1-TRBV2-TRAV2, 和 VH2-TRBV1-TRBC; 或
VL2-TRAV1-TRAC-VH1, VL1-TRAV2-TRBV2, 和 VH2-TRBV1-TRBC。

在本发明第四方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述功能结构域来源于白蛋白或其结合部分和任选的铰链区，并通过任选的接头连接至任意一条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

5 在本发明第四方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述功能结构域来源于抗体的铰链区和/或抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分；并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

在本发明第四方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述功能结构域来源于抗体的 CH3 结构域和任选的抗体的铰链区；并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

10 在本发明第四方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述功能结构域来源于 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区；并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。

在一些实施方案中，所述 TCR 的恒定区或其片段选自 TCR α 链恒定区(TRAC)和 TCR β 链恒定区(TRBC)。

15 在一些实施方案中，所述功能结构域包含两条肽链，并且其中所述多特异性多肽分子中的任意两条链通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接，例如，所述第一结合区和第二结合区通过所述功能结构域的两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。

在本发明第四方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述多肽分子包含第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链；其中：

20 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3 (format 62-1)。

25 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

30 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC。

35 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC。

40 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC。

45 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区。

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-Alb，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区。

50 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1，所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-任选的铰链区,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC。

5 在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-任选的铰链区,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-Alb。

10 在第五方面,本发明提供了一种多特异性多肽分子,所述多特异性多肽分子在两条多肽链上包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区,

其中所述第一结合区包含来源于与所述第一抗原-MHC 复合物结合的 T 细胞受体(TCR)的 α 链可变区(TRAV1)和 β 链可变区(TRBV1);

15 其中所述第二结合区包含来源于与所述第二抗原结合的抗体的重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1;

其中所述第一抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原,且所述第二抗原为免疫细胞表面分子;

其中 VH1 和 VL1 分别分布在所述多特异性多肽分子的两条不同的多肽链上,并且 VH1 或 VL1 所在多肽链的 C 端连接在所述 TCR 的 N 端;

20 其中所述多特异性多肽分子还包含以下至少一种功能结构域:

- 1) 源于抗体的铰链区;
- 2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分;
- 3) 源于抗体的 CH3 结构域;
- 4) 白蛋白(Alb) 或其结合部分;
- 25 5) 源于 TCR 的恒定区或其片段。

在一些实施方案中, TRAV1 和 TRBV1 串联在一条多肽链上。在一些实施方案中, VH1 和 VL1 分别分布在所述多特异性多肽分子的两条不同的多肽链上,并且 TRAV1 和 TRBV1 串联在一条多肽链上,并且该多肽链的 N 末端连接在 VH1 或 VL1 所在肽链的 C 末端。

在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子中相邻可变区之间通过接头连接。

30 在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子包含:

VH1-TRBV1-TRAV1 和 VL1; 或
VL1-TRBV1-TRAV1 和 VH1; 或
VH1-TRAV1-TRBV1 和 VL1; 或
VL1-TRAV1-TRBV1 和 VH1。

35 在本发明第五方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和/或 TRBV1 的 C 端的选自以下的恒定结构域:

(1) TCR 恒定区或其片段,所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC);

40 (2) CH3, 所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域,优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变;

(3) CL 和 CH1, 所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域,并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

在本发明第五方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含分别连接至所述 VH1 和 VL1 的来源于抗体的 CH1 和 CL。

45 在本发明第五方面的多特异性多肽分子的实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含与第三抗原结合的第三结合区,所述第三结合区包含来源于与所述第三抗原-MHC 复合物结合的 TCR 的 α 链可变区(TRAV2)和 β 链可变区(TRBV2); 其中所述第三抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原,并且所述第三抗原与所述第一抗原相同或不同。在一些实施方案中,所述 TRAV2 与所述 TRAV1 相同。在一些实施方案中,所述 TRBV2 与所述 TRBV1 相同。

50 在一些实施方案中,所述 TRAV2 和 TRBV2 串联在一条多肽链上。在一些实施方案中, TRAV2 和 TRBV2 串联在一条多肽链上并且连接在 TRAV1 之间 TRBV1。在一些实施方案中,所述 TRAV2 和 TRBV2 分别分布在两条不同的多肽链上,并且其中一个连接在 VH1 的 N 端,另一个连接在 VL1 的 N 端。

在本发明第五方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：

- 5
10
15
- VH1-TRBV1-TRAV2-TRBV2-TRAV1 和 VL1；或
VH1-TRBV1-TRBV2-TRAV2-TRAV1 和 VL1；或
VL1-TRBV1-TRAV2-TRBV2-TRAV1 和 VH1；或
VL1-TRBV1-TRBV2-TRAV2-TRAV1 和 VH1；或
VH1-TRAV1-TRAV2-TRBV2-TRBV1 和 VL1；或
VH1-TRAV1-TRBV2-TRAV2-TRBV1 和 VL1；或
VL1-TRAV1-TRBV2-TRAV2-TRBV1 和 VH1；或
VL1-TRAV1-TRAV2-TRBV2-TRBV1 和 VH1；或
TRBV2-VH1-TRBV1-TRAV1 和 TRAV2-VL1；或
TRBV2-VL1-TRBV1-TRAV1 和 TRAV2-VH1；或
TRBV2-VH1-TRAV1-TRBV1 和 TRAV2-VL1；或
TRBV2-VL1-TRAV1-TRBV1 和 TRAV2-VH1；或
TRAV2-VH1-TRBV1-TRAV1 和 TRBV2-VL1；或
TRAV2-VL1-TRBV1-TRAV1 和 TRBV2-VH1；或
TRAV2-VH1-TRAV1-TRBV1 和 TRBV2-VL1；或
TRAV2-VL1-TRAV1-TRBV1 和 TRBV2-VH1。

20 在本发明第五方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV2 和/或 TRBV2 的 C 端的选自以下的恒定结构域：

(1) TCR 恒定区或其片段，所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC)；

(2) CH3，所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域，优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变；

25 (3) CL 和 CH1，所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域，并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

在本发明第五方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含与第四抗原结合的第四结合区，所述第四结合区包含来源于与所述第四抗原结合的抗体的重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2 或来源于与所述第四抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH)；其中
30 所述第四抗原为免疫细胞表面分子，并且所述第四抗原与所述第二抗原相同或不同。在一些实施方案中，所述 VH2 与所述 VH1 相同。在一些实施方案中，所述 VL2 与所述 VL1 相同。

在一些实施方案中，所述 VHH 或所述 VH2 和 VL2 形成 scFv2 通过接头连接在所述 VH1 或所述 VL1 的 N 端，或者连接在 TRAV1 和 TRBV1 之间，或者所述 VH2 和 VL2 中的一个通过接头连接在所述 VH1 的 N 端，另一个通过接头连接在所述 VL1 的 N 端。

35 在本发明第五方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：

- 40
45
50
- scFv2-VH1-TRBV1-TRAV1 和 VL1；或
scFv2-VL1-TRBV1-TRAV1 和 VH1；或
scFv2-VH1-TRAV1-TRBV1 和 VL1；或
scFv2-VL1-TRAV1-TRBV1 和 VH1；或
VH1-TRBV1-scFv2-TRAV1 和 VL1；或
VL1-TRBV1-scFv2-TRAV1 和 VH1；或
VH1-TRAV1-scFv2-TRBV1 和 VL1；或
VL1-TRAV1-scFv2-TRBV1 和 VH1；或
VH1-TRBV1-VHH-TRAV1 和 VL1；或
VL1-TRBV1-VHH-TRAV1 和 VH1；或
VH1-TRAV1-VHH-TRBV1 和 VL1；或
VL1-TRAV1-VHH-TRBV1 和 VH1；或
VH1-TRBV1-TRAV1 和 scFv2-VL1；或
VL1-TRBV1-TRAV1 和 scFv2-VH1；或
VH1-TRAV1-TRBV1 和 scFv2-VL1；或
VL1-TRAV1-TRBV1 和 scFv2-VH1；或
VHH-VH1-TRBV1-TRAV1 和 VL1；或

- VHH-VL1-TRBV1-TRAV1 和 VH1；或
VHH-VH1-TRAV1-TRBV1 和 VL1；或
VHH-VL1-TRAV1-TRBV1 和 VH1；或
VH1-TRBV1-TRAV1 和 VHH-VL1；或
5 VL1-TRBV1-TRAV1 和 VHH-VH1；或
VH1-TRAV1-TRBV1 和 VHH-VL1；或
VL1-TRAV1-TRBV1 和 VHH-VH1；或
VH2-VH1-TRBV1-TRAV1 和 VL2-VL1；或
VL2-VH1-TRBV1-TRAV1 和 VH2-VL1；或
10 VH2-VL1-TRBV1-TRAV1 和 VL2-VH1；或
VL2-VL1-TRBV1-TRAV1 和 VH2-VH1；或
VH2-VH1-TRAV1-TRBV1 和 VL2-VL1；或
VL2-VH1-TRAV1-TRBV1 和 VH2-VL1；或
VH2-VL1-TRAV1-TRBV1 和 VL2-VH1；或
15 VL2-VL1-TRAV1-TRBV1 和 VH2-VH1。
- 在一些实施方案中，所述功能结构域包含两条链，并且所述多特异性多肽分子的两条链通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。
- 在一些实施方案中，所述功能结构域包含两条链，并且所述多特异性多肽分子的第一结合区和第二结合区通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。
- 20 在一些实施方案中，所述功能结构域包含两条链，并且分别连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端。
- 在一些实施方案中，所述功能结构域包含两条链，并分别连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 N 末端。
- 25 在一些实施方案中，VH1 和 VL1 分别分布在所述多特异性多肽分子的两条不同的多肽链上，并且 TRAV1 和 TRBV1 串联在一条多肽链上，并且该肽链的 N 末端连接在 VH1 或 VL1 所在肽链的 C 末端，所述功能结构域包含两条链，并且所述多特异性多肽分子的第一结合区和第二结合区通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接，例如，所述该肽链的 C 末端连接所述功能结构域的一条链，所述多特异性多肽分子的另一条多肽链的 C 末端连接所述功能结构域的另一条链。
- 30 在本发明第五方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述功能结构域来源于白蛋白或其结合部分和任选的抗体的铰链区；并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任一条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。在一些实施方案中，所述功能结构域来源于白蛋白或其结合部分，所述白蛋白或其结合部分通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任一条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。在一些实施方案中，所述功能结构域来源于白蛋白或其结合部分和抗体的铰链区，所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任一条多肽链的 C 末端，并且白蛋白或其结合部分通过任选的接头连接在抗体的铰链区的任意一条链的 C 末端。
- 35 在一些实施方案中，所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链；其中：所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-任选的接头-任选的铰链区。
- 40 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。
- 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-任选的铰链区。
- 45 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。
- 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-任选的接头-任选的铰链区。
- 50 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-任选的铰链区，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。

TRAV1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VL1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VL1-任选的接头-任选的铰链区。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VL1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VH1-任选的接头-任选的铰链区。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VH1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VH1-任选的接头-任选的铰链区。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VH1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VL1-任选的接头-任选的铰链区。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VL1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VL1-任选的接头-任选的铰链区。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VL1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VH1-任选的接头-任选的铰链区。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VH1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VH1-任选的接头-任选的铰链区。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-任选的铰链区, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VH1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。

在本发明第五方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述功能结构域来源于抗体的铰链区和/或抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分和/或抗体的 CH3 结构域; 并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端。

在一些实施方案中, 所述功能结构域来源于抗体的铰链区和抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分。

在一些实施方案中, 所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链; 其中: 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3 (format 62-2)。

在一些实施方案中, 所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链; 其中: 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: CH3-CH2-铰链区-任选的接头-VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1, 并且所述第二多肽链从

N 端到 C 端包含：CH3-CH2-铰链区-任选的接头-VL1。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

5 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

10 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链；其中：所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：CH3-CH2-铰链区-任选的接头-VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：CH3-CH2-铰链区-任选的接头-VL1-任选的接头。

15 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：CH3-CH2-铰链区-任选的接头-VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：CH3-CH2-铰链区-任选的接头-VH1。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：CH3-CH2-铰链区-任选的接头-VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：CH3-CH2-铰链区-任选的接头-VL1。

20 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：CH3-CH2-铰链区-任选的接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：CH3-CH2-铰链区-任选的接头-VH1。

25 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：scFv2-接头-VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：scFv2-接头-VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

30 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：scFv2-接头-VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：scFv2-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

35 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：scFv2-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3 (format 72-1)。

40 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：scFv2-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：scFv2-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

45 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：scFv2-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VHH-接头-VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

50 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VHH-接头-VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VHH-接头-VH1-接头-TRAV1-接头-

TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

10 在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

15 在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

25 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

30 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

40 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-
TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VH1-任选的接
头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中,所述功能结构域来源于抗体的CH3结构域。

45 在一些实施方案中，所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链；其中：所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-接头-TRBV1-接头的接头-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-任选的接头-CH3 (format 22-3)。

在一些实施方案中,所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链;其中:所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含:CH3-任选的接头-VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含:CH3-任选的接头-VL1。

50 在一些实施方案中,所述第一多肽链从N端到C端包含:VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-CH3,并且所述第二多肽链从N端到C端包含:VH1-任选的接头-CH3。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-CH3。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的

TRBV1-任选的接头-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VL1-任选的接头-CH3。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VH1-任选的接头-CH3。

5 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VH1-任选的接头-CH3。

在本发明第五方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述功能结构域来源于 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区; 并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端。

10 在一些实施方案中, 所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链; 其中: 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-TRBC (format 22-4)。

在一些实施方案中, 所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链; 其中: 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAC-任选的接头-VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBC-任选的接头-VL1。

15 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-TRBC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-TRAC。

20 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-TRAC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-TRBC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-TRBC。

25 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-TRAC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-TRAC。

30 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-VL1-任选的接头-TRBC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-VH1-任选的接头-TRBC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-VL1-任选的接头-TRAC。

35 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: scFv2-接头-VH1-任选的接头-TRAC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH-接头-VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-TRBC。

40 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH-接头-VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-TRBC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH-接头-VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-TRAC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-TRAC。

45 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH-接头-VL1-任选的接头-TRBC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH-接头-VH1-任选的接头-TRBC。

50 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH-接头-VL1-任选的接头-TRAC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH-接头-VH1-任选的接头-TRAC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VH1-接头-TRBV1-接头-

TRAV1-任选的接头- TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VL1-任选的接头- TRBC。

5 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VH1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头- TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VL1-任选的接头- TRBC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头- TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VH1-任选的接头- TRBC。

10 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VL1-接头-TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头- TRAC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VH1-任选的接头- TRBC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头- TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VL1-任选的接头- TRAC。

15 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VH1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头- TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VL1-任选的接头- TRAC。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头- TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-VH1-任选的接头- TRAC。

20 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL2-接头-VL1-接头-TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头- TRBC, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH2-VH1-任选的接头- TRAC。

25 在第六方面, 本发明提供了一种多特异性多肽分子, 所述多特异性多肽分子在三条多肽链上包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区,

其中所述第一结合区包含来源于与所述第一抗原-MHC 复合物结合的 T 细胞受体(TCR)的 α 链可变区(TRAV1)和 β 链可变区(TRBV1);

其中所述第二结合区包含来源于与所述第二抗原结合的抗体的重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1;

30 其中所述第一抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原, 且所述第二抗原为免疫细胞表面分子;

并且其中 VH1 或 VL1 所在肽链的 C 末端连接在所述 TCR 的 N 末端。

35 在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含至少一个能够延长所述多特异性多肽分子半衰期的功能结构域。在一些实施方案中, 所述延长半衰期的功能结构域选自以下的任意一种功能结构域。

在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含以下至少一种功能结构域:

- 1) 源于抗体的铰链区;
- 2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分;
- 3) 源于抗体的 CH3 结构域;
- 40 4) 白蛋白(Alb) 或其结合部分;
- 5) 源于 TCR 的恒定区或其片段。

在一些实施方案中, 所述 VH1 和 VL1 分别分布在所述多特异性多肽分子的两条多肽链上。

45 在一些实施方案中, 所述 TRAV1 和 TRBV1 分别分布在所述多特异性多肽分子的两条多肽链上。

在一些实施方案中, VH1 或 VL1 所在多肽链的 C 端通过接头与 TRAV1 或 TRBV1 所在多肽链的 N 端连接。

在一些实施方案中, 所述 VH1 和 VL1 分别分布在所述多特异性多肽分子的两条多肽链上, 所述 TRAV1 和 TRBV1 分别分布在所述多特异性多肽分子的两条多肽链上, 并且 VH1 或 VL1 所在多肽链的 C 端通过接头与 TRAV1 或 TRBV1 所在多肽链的 N 端连接。

50 在一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子的三条多肽链分别包含:

- VL1-TRBV1, VH1, 和 TRAV1; 或
- VH1-TRBV1, VL1, 和 TRAV1; 或
- VL1-TRAV1, VH1, 和 TRBV1; 或

VH1-TRAV1, VL1, 和 TRBV1。

在本发明第六方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和/或 TRBV1 的 C 端的选自以下的恒定结构域:

(1) TCR 恒定区或其片段,所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC);

(2) CH3, 所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域,优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变;

(3) CL 和 CH1, 所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域,并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TCR 恒定区或其片段。在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子包含通过任选的接头分别连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TRAC 和 TRBC。在一些实施方案中,所述多特异性多肽分子的三条多肽链分别包含:

VL1-TRBV1-TRBC, VH1, 和 TRAV1-TRAC; 或

VH1-TRBV1-TRBC, VL1, 和 TRAV1-TRAC; 或

VL1-TRAV1-TRAC, VH1, 和 TRBV1-TRBC; 或

VH1-TRAV1-TRAC, VL1, 和 TRBV1-TRBC。

在本发明第六方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含分别连接至所述 VH1 和 VL1 的 C 端的来源于抗体的 CH1 和 CL。

在本发明第六方面的多特异性多肽分子的实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含与第三抗原结合的第三结合区,所述第三结合区包含来源于与所述第三抗原-MHC 复合物结合的 TCR 的 α 链可变区(TRAV2)和 β 链可变区(TRBV2); 其中所述第三抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原,并且所述第三抗原与所述第一抗原相同或不同。在一些实施方案中,所述 TRAV2 与所述 TRAV1 相同。在一些实施方案中,所述 TRBV2 与所述 TRBV1 相同。

在本发明第六方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV2 和/或 TRBV2 的 C 端的选自以下的恒定结构域:

(1) TCR 恒定区或其片段,所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC);

(2) CH3, 所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域,优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变;

(3) CL 和 CH1, 所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域,并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

在本发明第六方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含与第四抗原结合的第四结合区,所述第四结合区包含来源于与所述第四抗原结合的抗体的重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2 或来源于与所述第四抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH); 其中所述第四抗原为免疫细胞表面分子,并且所述第四抗原与所述第二抗原相同或不同。在一些实施方案中,所述 VH2 与所述 VH1 相同。在一些实施方案中,所述 VL2 与所述 VL1 相同。

在本发明第六方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述功能结构域来源于白蛋白或其结合部分和任选的抗体的铰链区; 并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任一条多肽链的 C 末端或 N 末端,优选 C 末端。在一些实施方案中,所述功能结构域来源于白蛋白或其结合部分; 并且所述白蛋白或其结合部分通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任一条多肽链的 C 末端或 N 末端,优选 C 末端。在一些实施方案中,所述功能结构域来源于白蛋白或其结合部分和抗体的铰链区,所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任一条多肽链的 C 末端或 N 末端,优选 C 末端,并且白蛋白或其结合部分通过任选的接头连接在抗体的铰链区的任意一条链的 C 末端。

在本发明第六方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述功能结构域来源于抗体的铰链区和/或抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分和/或抗体的 CH3 结构域; 并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端,优选 C 末端。

在本发明第六方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述功能结构域来源于 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区; 并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端,优选 C 末端。

在一些实施方案中,所述功能结构域包含两条链,并且所述多特异性多肽分子的任意两条链通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。

在一些实施方案中,所述功能结构域包含两条链,并且所述第一结合区和第二结合区通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。

在一些实施方案中,所述功能结构域包含两条链,其中一条连接在 VH1 或 VL1 所在多肽链的 C 末端或 N 末端,优选 C 末端,另外一条连接在另外一条多肽链的 TRAV1 或 TRBV1 所在多肽链的 C 末端或 N 末端,优选 C 末端。

在本发明第六方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述多肽分子包含第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链;其中:

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3 (format 62-9)。

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: CH3-CH2-铰链区-任选的接头-VL1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: CH3-CH2-铰链区-任选的接头-VH1,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-Alb,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-任选的铰链区,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-任选的铰链区,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-Alb,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-任选的铰链区,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-任选的铰链区,并且所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-任选的铰链区-任选的接头-Alb。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-TRAV1-任选的接头-

在本发明第六方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述功能结构域来源于 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区；并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。在这种情况下，上述多特异性多肽分子的第一多肽链和第二多肽链中的抗体的铰链区和抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分替换为 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区。

在本发明第六方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述功能结构域来源于 CH3 或其片段和任选的抗体的铰链区；并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。在这种情况下，上述多特异性多肽分子的第一多肽链和第二多肽链中的抗体的铰链区和抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分替换为 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区。

在第七方面，本发明提供了一种多特异性多肽分子，所述多特异性多肽分子在两条多肽链上包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区，

其中所述第一结合区包含来源于与所述第一抗原-MHC 复合物结合的 T 细胞受体(TCR)的 α 链可变区(TRAV1)和 β 链可变区(TRBV1)；

其中所述第二结合区包含来源于与所述第二抗原结合的抗体的重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1 或来源于与所述第二抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH1)；

其中所述第一抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原，且所述第二抗原为免疫细胞表面分子；

其中所述 VH1 和 VL1 串联在一条多肽链上，并且 TRAV1 和 TRBV1 串联在另一条多肽链上。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含至少一种能够延长所述多特异性多肽分子半衰期的功能结构域，并且所述功能结构域包含两条多肽链，所述多特异性多肽分子的两条链通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含以下至少一种功能结构域：

- 1) 源于抗体的铰链区；
- 2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分；
- 3) 源于抗体的 CH3 结构域；
- 4) 源于 TCR 的恒定区或其片段；

并且其中所述多特异性多肽分子的两条链通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。

在一些实施方案中，所述 VH1 和 VL1 串联形成的多肽链与 TRAV1 和 TRBV1 串联形成多肽链不直接相连。所述“不直接相连”是指，两条多肽链不通过任何的形式连接形成一条多肽链。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：

TRBV1-TRAV1 和 VL1-VH1；或
TRBV1-TRAV1 和 VH1-VL1；或
TRAV1-TRBV1 和 VL1-VH1；或
TRAV1-TRBV1 和 VH1-VL1；或
TRBV1-TRAV1 和 VHH1；或
TRAV1-TRBV1 和 VHH1。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，相邻可变区之间通过接头连接。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和/或 TRBV1 的 C 端的选自以下的恒定结构域：

(1) TCR 恒定区或其片段，所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC)；

(2) CH3，所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域，优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变；

(3) CL 和 CH1，所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域，并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TCR 恒定区或其片段，所述 TCR 恒定区包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和 β 链恒定区(TRBC)。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述多特异性多肽分子的两条多肽链分别包含：

TRBV1-TRBC-TRAV1-TRAC 和 VL1-VH1；或

TRBV1-TRBC-TRAV1-TRAC 和 VH1-VL1; 或
TRAV1-TRAC-TRBV1-TRBC 和 VL1-VH1; 或
TRAV1-TRAC-TRBV1-TRBC 和 VH1-VL1; 或
TRBV1-TRBC-TRAV1-TRAC 和 VHH1; 或
5 TRAV1-TRAC-TRBV1-TRBC 和 VHH1。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含通过任
选的接头连接至 TRAV1 或 TRBV1 的 C 端的 TCR 恒定区或其片段, 例如 TRAC 或 TRBC。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子的两条多肽链
分别包含:

10 TRBV1-TRAV1-TRAC 和 VL1-VH1; 或
TRBV1-TRAV1-TRAC 和 VH1-VL1; 或
TRAV1-TRBV1-TRBC 和 VL1-VH1; 或
TRAV1-TRBV1-TRBC 和 VH1-VL1; 或
15 TRBV1-TRAV1-TRAC 和 VHH1; 或
TRAV1-TRBV1-TRBC 和 VHH1。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含分别连
接至所述 VH1 和 VL1 的来源于抗体的 CH1 和 CL, 其中所述 VH1、VL1、CH1 和 CL 形成单链
Fab1。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含与第三抗原
20 结合的第三结合区, 所述第三结合区包含来源于与所述第三抗原-MHC 复合物结合的 TCR 的 α 链可变
区(TRAV2)和 β 链可变区(TRBV2); 其中所述第三抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原
(TSA)、病毒抗原和自身抗原, 并且所述第三抗原与所述第一抗原相同或不同。在一些实施方案中,
所述 TRAV2 与所述 TRAV1 相同。在一些实施方案中, 所述 TRBV2 与所述 TRBV1 相同。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含通过任
25 选的接头连接至 TRAV2 和/或 TRBV2 的 C 端的选自以下的恒定结构域:

(1) TCR 恒定区或其片段, 所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区
(TRBC);

(2) CH3, 所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域, 优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含
至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变;

30 (3) CL 和 CH1, 所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域, 并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构
域。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含与第四
抗原结合的第四结合区, 所述第四结合区包含来源于与所述第四抗原结合的抗体的重链可变区 VH2
和轻链可变区 VL2 或来源于与所述第四抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH2); 其
35 中所述第四抗原为免疫细胞表面分子, 并且所述第四抗原与所述第二抗原相同或不同。在一些实施方
案中, 所述 VH2 与所述 VH1 相同。在一些实施方案中, 所述 VL2 与所述 VL1 相同。在一些实施方
案中, 所述 VHH2 与所述 VHH1 相同。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述多特异性多肽分子还包含分别连
接至所述 VH2 和 VL2 的来源于抗体的 CH1 和 CL, 其中所述 VH2、VL2、CH1 和 CL 形成单链
40 Fab2。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述功能结构域来源于抗体的铰链区
和/或抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分和/或抗体的 CH3 结构域; 并且所述功能结构域通过任选的接
头连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端。

45 在一些实施方案中, 所述功能结构域来源于抗体的铰链区和抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分。

在一些实施方案中, 所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链; 其中: 所述第一多肽链从 N 端
到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-
CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3 (format
60)。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-
50 TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含:
VH1-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-
TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含:

VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

5 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VHH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

10 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VHH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链；其中：所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3 (format 62-11)。

15 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

20 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH1-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

25 在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VHH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

在一些实施方案中，所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VHH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

30 在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述功能结构域来源于 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区；并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。在这种情况下，上述多特异性多肽分子的第一多肽链和第二多肽链中的抗体的铰链区和抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分替换为 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区。

35 在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中，所述功能结构域来源于 CH3 或其片段和任选的抗体的铰链区；并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端。在这种情况下，上述多特异性多肽分子的第一多肽链和第二多肽链中的抗体的铰链区和抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分替换为 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区。

40 在第八方面，本发明提供了一种多特异性多肽分子，所述多特异性多肽分子在四条多肽链上包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区，

其中所述第一结合区包含来源于与所述第一抗原-MHC 复合物结合的 T 细胞受体(TCR)的 α 链可变区(TRAV1)和 β 链可变区(TRBV1)；

其中所述第二结合区包含来源于与所述第二抗原结合的抗体的重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1；

45 其中所述 TRAV1、TRBV1、VH1 和 VL1 分别分布在不同的多肽链上；

其中所述第一抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原，且所述第二抗原为免疫细胞表面分子。

50 在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含至少一种能够延长所述多特异性多肽分子半衰期的功能结构域，并且所述功能结构域包含两条多肽链，所述多特异性多肽分子的第一结合区和第二结合区通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽分子还包含以下至少一种功能结构域：

1) 源于抗体的铰链区；

2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分；

3) 源于抗体的 CH3 结构域;

4) 源于 TCR 的恒定区或其片段;

并且其中所述多特异性多肽分子的第一结合区和第二结合区通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。

5 在一些实施方案中,所述功能结构域的一条链连接在 TRAV1 或 TRBV1 的 C 末端或 N 末端,优选 C 末端,另一条链连接在 VH1 或 VL1 的 C 末端或 N 末端,优选 C 末端。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和/或 TRBV1 的 C 端的选自以下的恒定结构域:

10 (1) TCR 恒定区或其片段,所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC);

(2) CH3,所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域,优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变;

(3) CL 和 CH1,所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域,并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

15 在本发明第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中,所述多特异性多肽分子的四条链包含: TRBV1-TRBC, TRAV1-TRAC, VL1, VH1。

在本发明第八方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含分别连接至所述 VH1 和 VL1 的来源于抗体的 CH1 和 CL。

20 在本发明第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中,所述多特异性多肽分子的四条链包含: TRBV1, TRAV1, VL1-CL, VH1-CH1。

在本发明第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中,所述多特异性多肽分子的四条链包含: TRBV1-TRBC, TRAV1-TRAC, VL1-CL, VH1-CH1。

25 在本发明第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含与第三抗原结合的第三结合区,所述第三结合区包含来源于与所述第三抗原-MHC 复合物结合的 TCR 的 α 链可变区(TRAV2)和 β 链可变区(TRBV2);其中所述第三抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原,并且所述第三抗原与所述第一抗原相同或不同。在一些实施方案中,所述 TRAV2 与所述 TRAV1 相同。在一些实施方案中,所述 TRBV2 与所述 TRBV1 相同。

在本发明第七方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV2 和/或 TRBV2 的 C 端的选自以下的恒定结构域:

30 (1) TCR 恒定区或其片段,所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC);

(2) CH3,所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域,优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变;

35 (3) CL 和 CH1,所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域,并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

40 在本发明第八方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含与第四抗原结合的第四结合区,所述第四结合区包含来源于与所述第四抗原结合的抗体的重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2 或来源于与所述第四抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH);其中所述第四抗原为免疫细胞表面分子,并且所述第四抗原与所述第二抗原相同或不同。在一些实施方案中,所述 VH2 与所述 VH1 相同。在一些实施方案中,所述 VL2 与所述 VL1 相同。

在本发明第八方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述多特异性多肽分子还包含分别连接至所述 VH2 和 VL2 的来源于抗体的 CH1 和 CL,可选的,所述 VH2、VL2、CH1 和 CL 形成单链 Fab2。

45 在本发明第八方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中,所述功能结构域来源于抗体的铰链区和/或抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分和/或抗体的 CH3 结构域;并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端,优选 C 末端。

在一些实施方案中,所述功能结构域来源于抗体的铰链区和抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分。

50 在一些实施方案中,所述多肽分子包含第一多肽链、第二多肽链、第三多肽链和第四多肽链;其中:所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含:VL1-任选的接头-CL,所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含:VH1-任选的接头-CH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,并且所述第四多肽链从 N 端到 C 端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3 (format 62-13)。

在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC,所述第二

5 在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-CL-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-CH1,并且所述第四多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC。

15 在一些实施方案中,所述多肽分子包含第一多肽链、第二多肽链、第三多肽链和第四多肽链;其中:所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含:TRBV1,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含:VL1,所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含:VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,并且所述第四多肽链从 N 端到 C 端包含:TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

20 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1, 并且所述第四多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1。

25 在一些实施方案中,所述多肽分子包含第一多肽链、第二多肽链、第三多肽链和第四多肽链;其中:所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含:TRBV1,所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含:VL1-任选的接头-CL,所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含:VH1-任选的接头-CH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,并且所述第四多肽链从 N 端到 C 端包含:TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

35 在一些实施方案中, 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-CL-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-CH1, 并且所述第四多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1。

在一些实施方案中,所述多肽分子包含第一多肽链、第二多肽链、第三多肽链和第四多肽链;其中:所述第一多肽链从N端到C端包含:TRBV1-任选的接头-TRBC,所述第二多肽链从N端到C端包含:VL1,所述第三多肽链从N端到C端包含:VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3,并且所述第四多肽链从N端到C端包含:TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

50 在一些实施方案中,所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1, 并且所述第四多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC。

60

-铰链区-CH2-CH3, 所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VL1, 所述第三多肽链从 N 端到 C 端包含: VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 并且所述第四多肽链从 N 端到 C 端包含: TRAV1-任选的接头-TRAC。

5 在本发明第八方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述功能结构域来源于 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区; 并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端。

10 在本发明第八方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述功能结构域来源于 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区; 并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的第一多肽链和第二多肽链中的抗体的铰链区和抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分替换为 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区。

15 在本发明第八方面的多特异性多肽分子的一些实施方案中, 所述功能结构域来源于 CH3 或其片段和任选的抗体的铰链区; 并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的两条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端。在这种情况下, 上述多特异性多肽分子的第一多肽链和第二多肽链中的抗体的铰链区和抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分替换为 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区。

20 在本发明第一方面至第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中, 所述白蛋白可以为任何哺乳动物来源的白蛋白, 例如人白蛋白、牛白蛋白、小鼠白蛋白等。在一些实施方案中, 所述白蛋白为血清白蛋白, 例如人血清白蛋白或牛血清白蛋白。在本文中, 白蛋白包括野生型白蛋白或其片段。在一些实施方案中, 白蛋白的片段可以是例如长度为 100-550、150-550、200-550、250-550、300-550、350-550、400-550、450-550、500-550、100-500、150-500、200-500、250-500、300-500、350-500、400-500、450-500、100-450、150-450、200-450、250-450、300-450、350-450、400-450、100-400、150-400、200-400、250-400、300-400、350-400、100-350、150-350、200-350、250-350、300-350、100-300、150-300、200-300、250-300、100-250、150-250、200-250、100-200、150-200、100-150 个氨基酸的片段。在优选的实施方案中, 白蛋白为人血清白蛋白, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

25 在本发明第一方面至第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中, 抗体的铰链区可包含抗体的野生型铰链序列的部分或全部或其具有一处或多处取代的变体。在一些实施方案中, 抗体的铰链区为人源抗体的铰链区。抗体的铰链区可以是任何同种型, 包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。例如, 抗体的铰链区可以源自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的铰链结构域或其部分。在一些实施方案中, 所述铰链区包含按照 EU 编号系统的 216-236 位氨基酸, 其中 IgG1 分子铰链区的氨基酸序列包含 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 124); IgG2 分子铰链区的氨基酸序列包含 ERKCCVECPPCAPPVAGP (SEQ ID NO: 125); IgG4 分子铰链区的氨基酸序列包含 ESKYGPPCPSCPAPEFLG (SEQ ID NO: 126)。

35 在本发明第一方面至第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中, 抗体的 Fc 结构域包含 CH2 和 CH3。在一些实施方案中, 抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分为人源抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分。抗体的 Fc 结构域可以是任何同种型, 包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4, 并且可以包含一个或多个突变或修饰。在一些实施方案中, 抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分源自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的 Fc 结构域或其部分。在一个实施方案中, Fc 结构域是 IgG1 同种型或由其衍生, 任选地具有一个或多个突变或修饰。在另一个实施方案中, Fc 结构域是 IgG4 同种型或由其衍生, 任选地具有一个或多个突变或修饰。在一个实施方案中, Fc 结构域是人 IgG1 Fc 或人 IgG4 Fc。

40 在一些实施方案中, 所述 Fc 结构域的 CH2 结构域包含按照 EU 编号系统的 237-340 位氨基酸, 其中

45 IgG1 分子 Fc 结构域的 CH2 结构域的氨基酸序列包含如下的 237-340 位氨基酸: GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO: 127);

IgG2 分子 Fc 结构域的 CH2 结构域的氨基酸序列包含如下的 237-340 位氨基酸: GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK (SEQ ID NO: 128);

50 IgG4 分子 Fc 结构域的 CH2 结构域的氨基酸序列包含如下的 237-340 位氨基酸: GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK (SEQ ID NO: 129)。

在一些实施方案中, 所述 Fc 结构域的 CH3 结构域包含按照 EU 编号系统的 341-447 位氨基酸,

其中

IgG1 分子 Fc 结构域的 CH3 结构域的氨基酸序列包含如下的 341-447 位氨基酸：
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 130);

5 IgG2 分子 Fc 结构域的 CH3 结构域的氨基酸序列包含如下的 341-447 位氨基酸
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 131);

10 IgG4 分子 Fc 结构域的 CH3 结构域的氨基酸序列包含如下的 341-447 位氨基酸
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 132)。

在一些实施方案中，所述功能结构域包含抗体的铰链区-CH2-CH3。在一些实施方案中，所述多
特异性多肽分子的两条多肽链均包含铰链区-CH2-CH3。

多特异性多肽分子的效力至少部分是由于铰链区和/或 Fc 区介导一种或更多种效应子功能的能
力。这些效应子功能是由于抗体和抗体-抗原复合物与免疫系统的细胞相互作用以刺激多种应答，包
15 括抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒性
(CDC)(Daeron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997) ; Ward 和 Ghetie,Therapeutic Immunol.2:77-
94(1995); 以及 Ravetch 和 Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991))。多种效应子功能是由 Fc 受体
(FcR)介导的。FcR 由其对于免疫球蛋白同种型的特异性定义，IgG 抗体的 Fc 受体称为 FcγR，IgE 抗
体的 Fc 受体称为 FcεR，IgA 抗体的 Fc 受体称为 FcαR，等等。抗体的铰链区和/或 Fc 区还介导独立于
20 抗原结合而起作用以及赋予循环中的持久性和通过胞吞作用穿过细胞屏障转移的能力的功能，例如与
FcRn 结合(Ward 和 Ghetie,Therapeutic Immunology 2:77-94(1995))。但是，抗体的铰链区和/或 Fc 区介
导的效应子功能在某些情况下可能造成不良副作用，因此，已经努力来设计具有降低的或沉默的效应
子功能的抗体。

在一些实施方案中，所述抗体的铰链区包含至少一个能够降低或消除所述多特异性分子与 FcR 受
25 体和/或 C1q 结合的氨基酸突变，例如，所述突变位点选自 233、234、235 和 236 的位置。在一些实
施方案中，所述突变选自 233P、234A、234V、235A、236 缺失突变和 236G。在一些实施方案中，所
述突变选自 234A235A。在一些实施方案中，所述突变位点为 233、234、235 和 236，优选为 233P、
234V、235A 和在位置 236 无残基或 G。

在一些实施方案中，为了消除铰链区和非铰链区之间形成二硫键，例如，当本发明第一方面至第
30 八方面的多特异性多肽分子中包含 CL 和/或 CH1 结构时，为了降低或消除铰链区与 CL 和/或 CH1 之
间形成二硫键，所述铰链区还包含在位点 220 处的突变，例如，C220S。

在一些实施方案中，所述铰链区的氨基酸序列选自 EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAG (SEQ ID NO:
133)、EPKSSDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 4)、EPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 134)、
PKSSDKTHTCPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 135)、PKSSDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 136)、
35 KSSDKTHTCPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 137)、KSSDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 138)、
SSDKTHTCPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 139)、SSDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 140)、
SDKTHTCPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 141)、SDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 142)、
DKTHTCPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 143)、DKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 144)、
KTHTCPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 145)、KTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 146)、
40 THTCPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 147)、THTCPPCPAPPV (SEQ ID NO: 148)、HTCPPCPAPPVAG
(SEQ ID NO: 149)、HTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 150)、TCPAPPVAG (SEQ ID NO: 151)、
TCPAPPVAG (SEQ ID NO: 152)、CPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 153)、CPPCPAPPVA (SEQ ID NO:
154)、PPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 155)、PPCPAPPVA (SEQ ID NO: 156)、CPAPPVAG (SEQ ID NO:
157)、CPAPPVA (SEQ ID NO: 158)、CPAPPVAG (SEQ ID NO: 159)或 PAPPVA (SEQ ID NO: 160); 或
45 其具有一个或多个取代(例如，1-6 个取代，例如 1-5、1-4、1、2、3、4、5 或 6 个取代)的变体。在优
选的实施实施方案中，所述铰链区的氨基酸序列包含 EPKSSDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 4)。

在一些实施方案中，所述 Fc 结构域中 CH2 结构域包含至少一个能够降低或消除所述多特异性分
子与 FcR 受体和/或 C1q 结合的氨基酸突变，例如，所述突变位点选自 237、250、252、254、256、
270、322、327、330 和 331 位置，优选的，所述突变选自 237A、250R、252Y、254T、256E、270、
50 322、327G、327A、330A、330S 和 331S。在一些实施方案中，所述突变位点选自 327、330、331。
在一些实施方案中，所述突变位点为 327G、330S、331S。在一些实施方案中，所述突变位点为
331S。在一些实施方案中，位点 327、330、331 处的氨基酸分别为 A、A、S。

另外，IgG 结合 C1q 和激活补体级联的能力还取决于位于两个 CH2 结构域之间的碳水化合物部分

(其通常锚定在 Asn297)的存在、不存在或修饰。(Ward and Ghetie, Therapeutic Immunology 2:77-94 (1995) at page 81.)。在一些实施方案中,所述 N297 突变选自 297A、297G 和 297Q。在优选的实施方案中,所述 N297 突变为 297Q。

5 在一些实施方案中,所述 Fc 结构域中 CH2 结构域的氨基酸序列包含选自以下的 237-340 位氨基酸:

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIIEKTISKAK (SEQ ID NO: 161);

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIIEKTISKAK (SEQ ID NO: 162);

10 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK (SEQ ID NO: 163); 或

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK (SEQ ID NO: 5)。

15 在优选的实施方案中,所述 Fc 结构域中 CH2 结构域的氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 5。在另一优选的实施方案中,所述 Fc 结构域中 CH2 结构域的氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 161。

20 在一些实施方案中,效应子功能沉默突变在铰链区和 CH2 结构域的以下一个或多个位置处: 233、234、235、236、237、297、327、330 和 331; 优选地,所述效应子功能沉默突变通过用衍生自 IgG2 或 IgG4 相应残基取代 233、234、235、236 和 331 位置的至少一个残基而产生。在一些实施方案中,效应子功能沉默突变包括例如以下突变中的一种或多种: 233P、234V、236 缺失突变或 236G、327G、327A、330A、330S、331S。在一些实施方案中,效应子功能沉默突变为 233P、234V、235A 和在位置 236 无残基或 G, 297Q、331S。在一些实施方案中,效应子功能沉默突变为 233P、234V、235A 和在 236 位置无残基或 G 以及 297Q、327G、330S 和 331S。在一些实施方案中,效应子功能沉默突变为 233P、234V、235A 和在位置 236 无残基或 G, 331S。在一些实施方案中,效应子功能沉默突变为 233P、234V、235A 和在 236 位置无残基或 G 以及 327G、330S 和 331S。

25 在一些实施方案中,所述 Fc 结构域中 CH3 结构域包含至少一个能够降低或消除所述多特异性分子与 FcR 受体和/或 C1q 结合的氨基酸突变,例如,所述突变位点选自 428 和 434。在一些实施方案中,所述突变选自 428L、434S、434A。

30 在一些具体的实施方案中,Fc 结构域包含能够降低或消除所述多特异性分子与 FcR 受体和/或 C1q 结合的氨基酸突变,所述突变为 252Y254T256E、428L434S 和 250R428L434A。

35 在一些实施方案中,所述多肽分子的任何一条多肽链或两条多肽链的 Fc 结构域中的 CH3 还包含为了促进所述多肽分子形成异二聚体的突变。

40 在一些实施方案中,所述多肽分子的任何一条多肽链或两条多肽链的 Fc 结构域中的 CH3 包含至少两个半胱氨酸残基突变以形成链间二硫键,例如 354C 和 349C 或 242C 和 334C。

45 在一些实施方案中,所述多肽分子的任何一条多肽链或两条多肽链的 Fc 结构域中的 CH3 包含能够使两条 CH3 链形成杵臼结构的突变,例如,所述 CH3 各自独立地包含位于选自氨基酸位置 366、368、405 和 407 的一个或多个位置的突变且两条 CH3 链不包含相同的突变。在一些实施方案中,所述杵臼结构突变选自 T366W 作为杵以及 T366'S、L368'A 和 Y407'V 作为臼;在另外一些实施方案中,所述杵臼结构突变选自 T366Y 作为杵,Y407'T 作为臼。

50 在一些实施方案中,所述 Fc 结构域中 CH3 结构域的氨基酸序列包含:

GQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 所示的臼结构 (Hole:包含 T366S、
L368A 和 Y407V 臼突变以及 Y349C 突变, SEQ ID NO: 6) 和
GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 所示的杵结构 (Knob:包含 T366W 杵突
变和 S354C 突变, SEQ ID NO: 7)。

55 在一些实施方案中,所述多肽分子的任何一条多肽链或两条多肽链的 Fc 结构域中的 CH3 包含能够改变 CH3 区域相互作用界面的氨基酸的电荷性质以促进异源二聚体形成的突变,例如,两条 CH3 链的突变位点各自独立的选自 Y391、K392、T393、T394、P395、P396、V397、L398、D399、S400、Q347、V348、Y349、T350、S354、R355、E356、E357、F405、Y407 和 K409 中的至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个。在一些实施方案中,一条 CH3 链上的突变包含 P395K、P396K、V397K; P395K、P396K、V397C; 或者 P395R、P396R、V397R; 另一条 CH3 链上的突变包含 T394D、P395D、P396D; T394C、P395D、P396D; 或者 T394E、P395E、P396E。在另外一些实施方案中,一条 CH3 链上的突变位点选自 K409、K392、K439 和 K370,取代氨基酸为带负电的氨基酸,例如,天

冬氨酸（D）或谷氨酸（E）；另一条 CH3 链上的突变位点选自 D399、D356 和 E357，取代为带正电的氨基酸，例如，赖氨酸（K）、组氨酸（H）或精氨酸（R）。

在本发明第一方面至第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中，抗体的 CH3 结构域来源于抗体 Fc 结构域。在一些实施方案中，抗体的 CH3 结构域为人源抗体的 CH3 结构域，例如，源自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的 CH3 结构域。

在一些实施方案中，所述抗体的 CH3 结构域的突变参照 Fc 结构域中 CH3 结构域的突变，为了避免不必要的重复，在此不再重复赘述。

在没有相反说明的情况下，本发明所公开的铰链区上的氨基酸位置、Fc 结构域上的氨基酸位置、Fc 结构域中 CH3 上的氨基酸位置或抗体 CH3 结构域上的氨基酸位置的突变位置编号均是根据 EU 编号系统进行的。

在本发明第一方面至第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中，CL 来源于抗体轻链 CL 结构域，并且 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。在一些实施方案中，CL 相对于野生型序列可以包含末端 NEC 缺失突变。在一些实施方案中，CH1 相对于野生型序列可以包含末端 VPRDC 缺失突变。

在本发明第一方面至第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中，所述 TCR 的恒定区或其片段为人源或鼠源。在一些实施方案中，TRAC 和 TRBC 为人源或鼠源的。

本发明中，TRAC 和 TRBC 可以是野生型的或其变体，例如截短变体、延长变体、插入变体、缺失变体、突变体。例如，变体 TRAC 可以相对于野生型序列包含 T48C、N113K、PESS 缺失突变、FFSPPESS 缺失突变中的一种或多种。例如，变体 TRBC 可以相对于野生型序列包含 S57C、C187A、N210D、FG 环缺失突变中的一种或多种。在优选的实施方案中，TRAC 和/或 TRBC 包含相对于野生型序列的至少一个半胱氨酸突变，以在 TRAC 和 TRBC 之间形成二硫键，更优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：野生型 TCR α 链恒定区第 48 位和野生型 TCR β 链恒定区第 57 位。在一些实施方案中，TRAC 中 N 端的 1-5 个氨基酸可以发生取代。在一些实施方案中，TRBC 中 N 端的 1-5 个氨基酸可以发生取代。

在一些实施方案中，TRAC 包含以下氨基酸序列中的一种：

>TRAC 包含 T48C、N113K（IMGT 编号系统）、FFSPPESS 缺失突变

NIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAV
AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT (SEQ ID NO: 8)

>TRAC 包含 T48C、N113K（IMGT 编号系统）、PESS 缺失突变

NIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAV
AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO: 9)

>TRAC 包含 T48C、N113K（IMGT 编号系统）突变

NIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAV
AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS (SEQ ID NO: 10)

在一些实施方案中，TRBC 包含以下氨基酸序列中的一种：

>TRBC2, 包含 S57C、C187A、N210D 突变

EDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLK
EQPALNDSRYALSSRLRVSAFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD
(SEQ ID NO: 11)

>TRBC2, 包含 S57C、C187A、N210D、FG 环缺失突变

EDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLK
EQPALNDSRYALSSRLRVSAFWQDPRNHFRQCQVQFQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO: 12)

>TRBC1, 包含 S57C、C187A、N210D 突变

EDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLK
EQPALNDSRYALSSRLRVSAFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD
(SEQ ID NO: 13)

>TRBC1, 包含 S57C、C187A、N210D、FG 环缺失突变

EDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLK
EQPALNDSRYALSSRLRVSAFWQDPRNHFRQCQVQFQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO: 14)

在一些实施方案中，所述多肽分子包含 TRAC 或其片段，其不通过接头与 TRAV1 顺势连接。优选地，TRAC 中 N 端的 1-5 个氨基酸可以发生取代。在一些实施方案中，所述多肽分子包含 TRBC 或其片段，其不通过接头与 TRBV1 顺势连接。优选地，TRBC 中 N 端的 1-5 个氨基酸可以发生取代。

本发明中，CL 和 CH1 可以是野生型的或其变体，例如截短变体、延长变体、插入变体、缺失变体、突变体。例如，变体 CL 可以相对于野生型序列包含 NEC 缺失突变。例如，变体 CH1 可以相对

于野生型序列包含 VPRDC 缺失突变。

在一些实施方案中，CL 包含以下氨基酸序列中的一种：

>CL

5 RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDS
TYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO: 15)

>CL(包含 NEC 缺失突变)

RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDS
TYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNR (SEQ ID NO: 16)

在一些实施方案中，CH1 包含以下氨基酸序列中的一种：

10 >CH1

AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS
SSVTVPPSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKI VPRDC (SEQ ID NO: 17)

>CH1 (包含 VPRDC 缺失突变)

15 AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS
SSVTVPPSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKI (SEQ ID NO: 18)

在本发明第一方面至第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中，所述多肽分子包含 CL 和 CH1 或他们的片段，其通过或不通过接头与 TRAV1 和 TRBV1，TRAV2 和 TRBV2，VH1 和 VL1、VH2 和 VL2 顺势连接。

20 在没有相反说明的情况下，术语“顺势连接”是指在天然状态下 TCR 恒定区与可变区的连接形态。

在本发明第一方面至第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中，TRAV1 和/或 TRAV2 可以是天然的 TRAV 或其功能衍生形式，只要该功能衍生形式保留结合靶抗原的能力即可。例如 TRAV1 和/或 TRAV2 可以是天然 TRAV 的截短衍生形式，例如 N 端或 C 端截短 8 个氨基酸的衍生形式。在一些实施方案中，TRBV1 和/或 TRBV2 可以是天然的 TRBV 或其功能衍生形式，只要该功能衍生形式保留结合靶抗原的能力即可。在一些实施方案中，TRAV1 和/或 TRAV2 是 $\alpha\beta$ TCR 的 TRAV；TRBV1 和/或 TRBV2 是 $\alpha\beta$ TCR 的 TRBV。在一些实施方案中，TRAV1 和/或 TRAV2 是 scTCR 的 TRAV；TRBV1 和/或 TRBV2 是 scTCR 的 TRBV。

30 在本发明第一方面至第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中，VH1 和 VL1 包含至少一个半胱氨酸突变，以在 VH1 和 VL1 之间形成二硫键，并且半胱氨酸在 VL 的情况下被引入 FR4，在 VH 的情况下被引入 FR2。在一些实施方案中，VH2 和 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变，以在 VH2 和 VL2 之间形成二硫键，并且半胱氨酸在 VL 的情况下被引入 FR4，在 VH 的情况下被引入 FR2。

在一些实施方案中，VH1 和 VL1 包含至少一个半胱氨酸突变以在 VH1 和 VL1 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：VH1 的第 44 位和 VL1 的第 100 位。

35 在一些实施方案中，VH2 和 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 VH2 和 VL2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：VH2 的第 44 位和 VL2 的第 100 位。

在一些实施方案中，所述 TRAV1 和 VL1 或 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRAV1 和 VL1 或 VL2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：TRAV1 的第 104 位和 VL1 或 VL2 的第 80 位。

40 在一些实施方案中，所述 TRAV2 和 VL1 或 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRAV2 和 VL1 或 VL2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：TRAV2 的第 104 位和 VL1 或 VL2 的第 80 位。

在一些实施方案中，所述 TRBV1 和 VL1 或 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRBV1 和 VL1 或 VL2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：TRBV1 的第 84 位和 VL1 或 VL2 的第 80 位。

45 在一些实施方案中，所述 TRBV2 和 VL1 或 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRBV2 和 VL1 或 VL2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：TRBV2 的第 84 位和 VL1 或 VL2 的第 80 位。

50 在一些实施方案中，所述 TRAV1 和 VH1 或 VH2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRAV1 和 VH1 或 VH2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：TRAV1 的第 104 位和 VH1 或 VH2 的第 89 位。

在一些实施方案中，所述 TRAV2 和 VH1 或 VH2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRAV2 和 VH1 或 VH2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：TRAV2 的第 104 位和 VH1 或 VH2 的第 89 位。

在本发明第一方面至第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中，所述多肽分子还包含能够增强其亲和力或生物学活性（例如，增强其溶解性、增强其聚集、增强其稳定性、延长其半衰期、降低其免疫原性）或减少其翻译后修饰（例如糖基化修饰）的一个或多个氨基酸突变、插入或缺失，例如1、2、3、4、5或更多个氨基酸突变、插入或缺失。突变、插入或缺失的氨基酸包括但不限于：(a)中性氨基酸：Ser、Gln；(b)酸性氨基酸：Asp；(c)长链脂肪族氨基酸：Ile；(d)短脂肪族氨基酸：Ala、Gly。在一些实施方案中，所述氨基酸突变、插入或缺失位于以下氨基酸位置处：TRAV、TRBV、VL、VH的开始、TRAV/TRAC的交界氨基酸、TRBV/TRBC的交界氨基酸、VL/CL的交界氨基酸、VH/CH1的交界氨基酸、铰链区或其临近氨基酸、CH2/CH3的交界氨基酸、CH3的C末端、接头附近的氨基酸。在一些实施方案中，所述氨基酸突变包括能够增强对FcRn的结合的突变和/或效应子功能沉默突变。

在一些实施方案中，效应子功能沉默突变在Fc区，例如CH2和CH3结构域。在一些实施方案中，Fc区中的CH2结构域包含至少一个能够降低或消除所述多特异性分子与FcR受体和/或C1q结合的氨基酸突变，例如，所述突变位点选自237、250、252、254、256、270、322、327、330和331位置，优选的，所述突变选自237A、250R、252Y、254T、256E、270、322、327G、327A、330A、330S和331S。在一些实施方案中，所述突变位点选自327、330、331。在一些实施方案中，所述突变位点为327G、330S、331S。在一些实施方案中，所述突变位点为331S。在一些实施方案中，位点327、330、331处的氨基酸分别为A、A、S。在一些实施方案中，Fc区中的CH3结构域包含至少一个能够降低或消除所述多特异性分子与FcR受体和/或C1q结合的氨基酸突变，例如，所述突变位点选自428和434。在一些实施方案中，所述突变选自428L、434S、434A。

在一些实施方案中，效应子功能沉默突变在铰链区。在一些实施方案中，所述抗体的铰链区包含至少一个能够降低或消除所述多特异性分子与FcR受体和/或C1q结合的氨基酸突变，例如，所述突变位点选自233、234、235和236的位置。在一些实施方案中，所述突变选自233P、234A、234V、235A、236缺失突变和236G。在一些实施方案中，所述突变选自234A235A。在一些实施方案中，所述突变位点为233、234、235和236，优选为233P、234V、235A和在位置236无残基或G。

在一些实施方案中，效应子功能沉默突变在铰链区和CH2结构域的以下一个或多个位置处：233、234、235、236、237、297、327、330和331；优选地，所述效应子功能沉默突变通过用衍生自IgG2或IgG4相应残基取代233、234、235、236和331位置的至少一个残基而产生。在一些实施方案中，效应子功能沉默突变包括例如以下突变中的一种或多种：233P、234V、236缺失突变或236G、327G、327A、330A、330S、331S。在一些实施方案中，效应子功能沉默突变为233P、234V、235A和在位置236无残基或G，297Q、331S。在一些实施方案中，效应子功能沉默突变为233P、234V、235A和在236位置无残基或G以及297Q、327G、330S和331S。在一些实施方案中，效应子功能沉默突变为233P、234V、235A和在位置236无残基或G，331S。在一些实施方案中，效应子功能沉默突变为233P、234V、235A和在236位置无残基或G以及327G、330S和331S。

在一些具体的实施方案中，Fc结构域包含能够降低或消除所述多特异性分子与FcR受体和/或C1q结合的氨基酸突变，所述突变为252Y254T256E、428L434S或250R428L434A。

在一些实施方案中，能够减少所述多肽分子翻译后修饰的氨基酸突变包括例如TRAC中的N113K和TRBC中的N210D。

在本发明第一方面至第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中，当所述多肽分子包含多于一个接头时，所述接头可以各自相同或不同。在一些实施方案中，所述多肽分子中的接头各自独立地选自由1-35个氨基酸组成的接头。

在一些实施方案中，所述多肽分子中的接头各自独立地选自S（SEQ ID NO: 19）、GS（LM3，SEQ ID NO: 20）、GGGS（SEQ ID NO: 21）、GGGGS（SEQ ID NO: 22）、GGGSGGGG（SEQ ID NO: 23）、GGSGGS（LM1，SEQ ID NO: 24）、GGSGGSGGS（SEQ ID NO: 25）、GGGSGGGGS（SEQ ID NO: 26）、GGGSGGGGSGGGGS（LM2，SEQ ID NO: 27）、GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 28）、GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 29）、GQPKAAP（SEQ ID NO: 30）、TVLRT（SEQ ID NO: 31）、TVSSAS（SEQ ID NO: 32）、GEGG（SEQ ID NO: 33）、GSEGGGS（SEQ ID NO: 34）、RTSGPGDGGKGGPGKGGEGTKGTGPGG（SEQ ID NO: 35）、GKGPGGEGTKGTGPGG（SEQ ID NO: 36）、TVLSSAS（SEQ ID NO: 37）、EDLKN（SEQ ID NO: 38）或其变体、EDLNK（SEQ ID NO: 39）或其变体和ANIQK（SEQ ID NO: 40）或其变体，或其任意组合。

在一些实施方案中，EDLKN的变体为EDLKN经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列；和/或EDLNK的变体为EDLNK经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列。

氨基酸序列；和/或 ANIQK 的变体为 ANIQK 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列。

优选地，EDLKN 的变体为 EDLKN 经过取代一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列；和/或 EDLNK 的变体为 EDLNK 经过取代一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列；和/或 ANIQK 的变体为 ANIQK 经过取代一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列。

优选地，EDLKN 的变体为 EDLKN 经过缺失一个或几个氨基酸所形成的由 1-3 个氨基酸组成的氨基酸序列；和/或 EDLNK 的变体为 EDLNK 经过缺失一个或几个氨基酸所形成的由 1-3 个氨基酸组成的氨基酸序列；和/或 ANIQK 的变体为 ANIQK 经过缺失一个或几个氨基酸所形成的由 1-3 个氨基酸组成的氨基酸序列。

优选地，EDLKN 的变体为 EDL、DL、L、ED、E、D；和/或 ANIQK 的变体为 ANI、NI、I、AN、N、A、PNI、P、PN。

优选地，EDLKN 的变体为 EDLKN 经过添加（优选在 N 端）一个或几个氨基酸所形成的由 6-35 个氨基酸组成的氨基酸序列；和/或 EDLNK 的变体为 EDLNK 经过添加（优选在 N 端）一个或几个氨基酸所形成的由 6-35 个氨基酸组成的氨基酸序列；和/或 ANIQK 的变体为 ANIQK 经过添加（优选在 N 端）一个或几个氨基酸所形成的由 6-35 个氨基酸组成的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述多肽分子中的接头各自独立地选自不超过 15 个氨基酸组成的接头。优选地，所述接头各自独立地选自 S、GS、GGGS、GGGGS、GGGSGGGG、GGSGGS、GGSGSGGS、GGGSGGGGS、GGGSGGGSGGGGS、EDLKN 或其变体、EDLNK 或其变体和 ANIQK 或其变体。在一些实施方案中，EDLKN 的变体为 EDLKN 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列；和/或 EDLNK 的变体为 EDLNK 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列；和/或 ANIQK 的变体为 ANIQK 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列。优选地，EDLKN 的变体为 EDLKN 经过取代一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列；和/或 EDLNK 的变体为 EDLNK 经过取代一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列；和/或 ANIQK 的变体为 ANIQK 经过取代一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列。优选地，EDLKN 的变体为 EDLKN 经过缺失一个或几个氨基酸所形成的由 1-3 个氨基酸组成的氨基酸序列；和/或 EDLNK 的变体为 EDLNK 经过缺失一个或几个氨基酸所形成的由 1-3 个氨基酸组成的氨基酸序列；和/或 ANIQK 的变体为 ANIQK 经过缺失一个或几个氨基酸所形成的由 1-3 个氨基酸组成的氨基酸序列。优选地，EDLKN 的变体为 EDLKN 经过添加（优选在 N 端）一个或几个氨基酸所形成的由 6-15 个氨基酸组成的氨基酸序列；和/或 EDLNK 的变体为 EDLNK 经过添加（优选在 N 端）一个或几个氨基酸所形成的由 6-15 个氨基酸组成的氨基酸序列；和/或 ANIQK 的变体为 ANIQK 经过添加（优选在 N 端）一个或几个氨基酸所形成的由 6-15 个氨基酸组成的氨基酸序列。优选地，EDLKN 的变体为 EDL、DL、L、ED、E、D；和/或 ANIQK 的变体为 ANI、NI、I、AN、N、A、PNI、P、PN。

在一些实施方案中，所述多肽分子中的接头各自独立地为 1 个或 2-3 个以上所述接头的组合。在一些实施方案中，所述多肽分子中的接头各自独立地为 1 个以上所述接头。在一些实施方案中，所述多肽分子中的接头各自独立的为 2 个以上所述接头的组合。在一些实施方案中，所述多肽分子中的接头各自独立地为 3 个以上所述接头的组合。

在本发明第一方面至第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中，所述多肽分子在一条或多条多肽链的 N 端还包含信号肽序列，优选在每一条链的 N 端包含信号肽序列，例如衍生自白蛋白或免疫球蛋白的信号肽序列，优选 MGWSLILLFLVAVATRVHS (SEQ ID NO: 164)。

在本发明第一方面至第八方面的多特异性多肽分子的实施方案中，所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的 TAA：黑色素瘤相关抗原（例如 gp100、MAGEA1、MAGEA3、MAGEA6、MAGEA4、MAGEA2、MAGEA12、MAGEA2B、MAGEA9B、MAGEA10、MAGEA11、MAGEB2、MAGEC1、MAGEC2）、IGF2BP1、GNGT1、PI4K2B、CCR8、NPSR1、COX7B2、ONECUT3、SMC1B、FOXI3、GAGE2A、FBXO43、BRDT、PAGE2、GAGE13、POU5F1B、CTAG1A 和内源性逆转录酶抗原。

在一些实施方案中，所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的 TSA：KRAS（例如 KRAS G12 突变抗原，如 G12D、G12V、G12C、G12R、G12A；G13D；Q61H；G125）、TP53（例如 R175H、R173H、R273C、R248W、R248Q、R282W、Y220C、V157F、G245S、Y163C、R249S）、PIK3CA（例如 E542K、E545K、H1047R）、CTNNB1（例如 S45P、T41A）、EGFR（例如 L858R、T790M）、BRAF（例如 V600E）和 GNAS（例如 R201C、R201H）。

在一些实施方案中，所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的病毒抗原：HPV 抗原（例如 HPV E6 或 E7 抗原）、CMV 抗原、HBV 抗原、EBV 抗原、疱疹病毒抗原、人类免疫缺陷病毒（HIV）抗原、流感病毒抗原和冠状病毒抗原。

在一些实施方案中,所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的自身抗原: AFP、CEA、CD19、CD20、BCMA、CD22、CD30、SLAMF7、CLDN18.2、GD2、间皮素、CD38、Her2、GPC3、MUC1、Ro52、Ro60、La、Jo-1、SRP、IFIH1、CENPA、CENPB、SNRPA1、SNRNP70、SNRNP78、RNAP3、TOPO1、Insulin、GAD65、IA2、Znt8、PL7、TARS、ARS、MI2、拓扑异构酶1、EXOSC9、EXOSC107、POLR3A、POLR3K、PTRN、GAD2、SLC30A8、AChR、MUSK、LRP4、PLA2R、THSD7A、TSHR、IFN- γ 、CHRNA1、MUSK、LRP4、AQP4、MOG、GRIN1、COL4A3、PLA2R、GM-SCF、PR3 和 MPO。

5 在一些实施方案中,所述第二抗原和第四抗原各自独立地选自 CD3 (例如 CD3 γ 、CD3 δ 和 CD3 ϵ 链)、CD4、CD8、CD10、CD11b、CD11c、CD14、CD16、CD18、CD25、CD32a、CD32b、CD41、CD41b、CD42a、CD42b、CD44、CD45RA、CD49、CD61、CD64、CD68、CD94、CD90、CD117、Nkp46、NKG2D、Fc ϵ RI、TCR α/β 、TCR γ/δ 、HLA-DR、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、ICOS(CD278)、2B4 (CD244)、HVEM、LAG3、DAP10、DAP12、CD27、CD40、GITR、LFA-1、MyD88、CD2、CD7、LIGHT、B7-H3、CTLA-4、PD-1、PD-L1、CD80、BTLA、TIM3、TIGIT 和 LAG-3。

15 在一些实施方案中,所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的 TAA: 黑色素瘤相关抗原 (例如 gp100、MAGEA1、MAGEA3、MAGEA6、MAGEA4、MAGEA2、MAGEA12、MAGEA2B、MAGEA9B、MAGEA10、MAGEA11、MAGEB2、MAGEC1、MAGEC2)、IGF2BP1、GNGT1、PI4K2B、CCR8、NPSR1、COX7B2、ONECUT3、SMC1B、FOXI3、GAGE2A、FBXO43、BRDT、PAGE2、GAGE13、POU5F1B、CTAG1A 和内源性逆转录酶抗原; 并且所述第二抗原和第四抗原各自独立地选自 CD3 (例如 CD3 γ 、CD3 δ 和 CD3 ϵ 链)、CD4、CD8、CD10、CD11b、CD11c、CD14、CD16、CD18、CD25、CD32a、CD32b、CD41、CD41b、CD42a、CD42b、CD44、CD45RA、CD49、CD61、CD64、CD68、CD94、CD90、CD117、Nkp46、NKG2D、Fc ϵ RI、TCR α/β 、TCR γ/δ 、HLA-DR、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、ICOS(CD278)、2B4 (CD244)、HVEM、LAG3、DAP10、DAP12、CD27、CD40、GITR、LFA-1、MyD88、CD2、CD7、LIGHT 和 B7-H3。

20 在一些实施方案中,所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的 TSA: KRAS (例如 G12D、G12V、G12C、G12R、G12A、G13D、Q61H、G12S)、TP53 (例如 R175H、R173H、R273C、R248W、R248Q、R282W、Y220C、V157F、G245S、Y163C、R249S)、PIK3CA (例如 E542K、E545K、H1047R)、CTNNB1 (例如 S45P、T41A)、EGFR (例如 L858R、T790M)、BRAF (例如 V600E) 和 GNAS (例如 R201C、R201H); 并且所述第二抗原和第四抗原各自独立地选自 CD3 (例如 CD3 γ 、CD3 δ 和 CD3 ϵ 链)、CD4、CD8、CD10、CD11b、CD11c、CD14、CD16、CD18、CD25、CD32a、CD32b、CD41、CD41b、CD42a、CD42b、CD44、CD45RA、CD49、CD61、CD64、CD68、CD94、CD90、CD117、Nkp46、NKG2D、Fc ϵ RI、TCR α/β 、TCR γ/δ 、HLA-DR、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、ICOS(CD278)、2B4 (CD244)、HVEM、LAG3、DAP10、DAP12、CD27、CD40、GITR、LFA-1、MyD88、CD2、CD7、LIGHT 和 B7-H3。

30 在一些实施方案中,所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的病毒抗原: HPV 抗原(例如 HPV E6 或 E7 抗原)、CMV 抗原、HBV 抗原、EBV 抗原、疱疹病毒抗原、人类免疫缺陷病毒(HIV) 抗原、流感病毒抗原和冠状病毒抗原; 并且所述第二抗原和第四抗原各自独立地选自 CD3 (例如 CD3 γ 、CD3 δ 和 CD3 ϵ 链)、CD4、CD8、CD10、CD11b、CD11c、CD14、CD16、CD18、CD25、CD32a、CD32b、CD41、CD41b、CD42a、CD42b、CD44、CD45RA、CD49、CD61、CD64、CD68、CD94、CD90、CD117、Nkp46、NKG2D、Fc ϵ RI、TCR α/β 、TCR γ/δ 、HLA-DR、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、ICOS(CD278)、2B4 (CD244)、HVEM、LAG3、DAP10、DAP12、CD27、CD40、GITR、LFA-1、MyD88、CD2、CD7、LIGHT 和 B7-H3。

35 在一些实施方案中,所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的自身抗原: AFP、CEA、CD19、CD20、BCMA、CD22、CD30、SLAMF7、CLDN18.2、GD2、间皮素、CD38、Her2、GPC3、MUC1、Ro52、Ro60、La、Jo-1、SRP、IFIH1、CENPA、CENPB、SNRPA1、SNRNP70、SNRNP78、RNAP3、TOPO1、Insulin、GAD65、IA2、Znt8、PL7、TARS、ARS、MI2、拓扑异构酶1、EXOSC9、EXOSC107、POLR3A、POLR3K、PTRN、GAD2、SLC30A8、AChR、MUSK、LRP4、PLA2R、THSD7A、TSHR、IFN- γ 、CHRNA1、MUSK、LRP4、AQP4、MOG、GRIN1、COL4A3、PLA2R、GM-SCF、PR3 和 MPO; 并且所述第二抗原和第四抗原各自独立地选自 CTLA-4、PD-1、CD80、BTLA、TIM3、TIGIT 和 LAG-3。

50 在一些实施方案中,第一抗原和第三抗原各自独立地选自黑色素瘤相关抗原 (例如 gp100、MAGEA1)、KRAS 和 HPV 抗原 (例如 HPV E7 抗原)。

在一些实施方案中，所述第一抗原和第三抗原各自独立地为 MAGE-A1。

在一些实施方案中，在所述多肽分子中，靶向 MAGE-A1 的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立地包含 RGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLN KKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAGSGGGTDKLIFGTGTRLQVFPN (SEQ ID NO: 41)。在一些实施方案中，在所述多肽分子中，靶向 MAGE-A1 的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地包含 GAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSDYQTCVTYEQGVKDK FLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSAREPGQGPFQYFGPGTRLTVTE (SEQ ID NO: 42)。

在一些实施方案中，所述第一抗原和第三抗原各自独立地为 HPV 抗原，例如 HPV E7。

在一些实施方案中，在所述多肽分子中，靶向 HPV E7 抗原的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立地包含 NSASQS (SEQ ID NO:43)所示的 CDR1，VYSSGN (SEQ ID NO:44)所示的 CDR2，和 AVISAGTALI (SEQ ID NO:45)所示的 CDR3；并且靶向 HPV E7 抗原的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地包含 SGHDT (SEQ ID NO:46)所示的 CDR1，YEEEE (SEQ ID NO:47)所示的 CDR2，和 ASSLGWRGGLYTEAF (SEQ ID NO:48)所示的 CDR3。在一些实施方案中，靶向 HPV E7 抗原的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立地包含

RKEVEQDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLNR ASQYISLLIRDSKLSDSATYLCAVISAGTALIFGKGTLLSVSS (SEQ ID NO:49)的氨基酸序列。在一些实施方案中，靶向 HPV E7 抗原的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立的包含 DAGVTQSPHLLIKTRGQQVTLRCSPKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQGNFPDRFSGH QFPNYSSELNVNALLGDSALYLCASSLGWRGGLYTEAFFGQGTRLTVV (SEQ ID NO:50)的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述第一抗原和第三抗原各自独立地为 KRAS，例如，G12V、G12D。

在一些实施方案中，在所述多肽分子中，靶向 KRAS 的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立地包含 YGATPY (SEQ ID NO:51)所示的 CDR1，YFSGDTLV (SEQ ID NO:52)所示的 CDR2，和 AVGVPPGGYNKLI (SEQ ID NO:53)所示的 CDR3；并且靶向 KRAS 的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地包含 SGHVS (SEQ ID NO:54)所示的 CDR1，FQNEAQ (SEQ ID NO:55)所示的 CDR2，和 ASSLDRGNTIY (SEQ ID NO:56)所示的 CDR3。在一些实施方案中，在所述多肽分子中，靶向 KRAS 的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立地包含 AQSVTQPDIIHITVSEGASLELRCNYSYGATPYLFWYVQSPGQGLQLLLKYFSGDTLVQGIKGFEEAEFK RSQSSFNLKPSVHWSDAAEYFCAVGVPGGYNKLIIFAGTRLAVHP (SEQ ID NO:57)的氨基酸序列。在一些实施方案中，靶向 KRAS 的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地包含 GAGVSQSPRYKVAKRGQDVALRCDPISGHVSLFWYQQALGQGPFLTYFQNEAQLDKSGLPSDRFF AERPEGSVSTLKIQRITQQEDSAVYLCASSLDRGNTIYFGEGSWLTVV (SEQ ID NO:58)的氨基酸序列。

在一些实施方案中，在所述多肽分子中，靶向 KRAS 的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立地包含 VSGNPY (SEQ ID NO:59)所示的 CDR1，YITGDNLV (SEQ ID NO:60)所示的 CDR2，和 AVRDIAGAGNNRKLII (SEQ ID NO:61)所示的 CDR3；并且靶向 KRAS 的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地包含 SGHNS (SEQ ID NO:62)所示的 CDR1，FNNNVP (SEQ ID NO:63)所示的 CDR2，和 ASSEGFYTEAF (SEQ ID NO:64)所示的 CDR3。在一些实施方案中，在所述多肽分子中，靶向 KRAS 的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立地包含 AQSVAQPEDQVNVAEGNPLTVKCTYSVSGNPYLFWYVQYPNRLQFLKYITGDNLVKGSYGFEAE FNKSQTSFHLKKPSALVSDSALYFCAVRDIAGAGNNRKLIIWGLGTSLAVNP (SEQ ID NO:65)的氨基酸序列。在一些实施方案中，在所述多肽分子中，靶向 KRAS 的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地包含 DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSK KMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSEGFYTEAFFGQGTRLTVV (SEQ ID NO:66)的氨基酸序列。

在一些实施方案中，在所述多肽分子中，靶向 KRAS 的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立地包含 NSASDY (SEQ ID NO:67)所示的 CDR1，IRSNMDK (SEQ ID NO:68)所示的 CDR2，和 AENS DGTSYGKLT (SEQ ID NO:69)所示的 CDR3；并且靶向 KRAS 的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地包含 SGHAT (SEQ ID NO:70)所示的 CDR1，FQNGV (SEQ ID NO:71)所示的 CDR2，和 ASSLVGSPDYEY (SEQ ID NO:72)所示的 CDR3。在一些实施方案中，在所述多肽分子中，靶向 KRAS 的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立地包含 GESVGLHLPTLGVQEGDNSIINCAYSNSASDYFIWYKQESGKGPQFIIDIRSNMDKRQGGQRVTLLNK TVKHLSLQIAATQPGDSAVYFCAENS DGTSYGKLTFGQGTLTVHP (SEQ ID NO:73)的氨基酸序列。在一些实施方案中，在所述多肽分子中，靶向 KRAS 的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地包含

EAGVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSA
ERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSLVGSPDYEYFGPGTRTLTVT(SEQ ID NO:74)的氨基酸序
列。

5 在一些实施方案中,在所述多肽分子中,靶向 KRAS 的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立地包含
DRGSQS(SEQ ID NO:75)所示的 CDR1, IYSGND(SEQ ID NO:76)所示的 CDR2, 和
AVNLGAAGNKLT(SEQ ID NO:77)所示的 CDR3; 并且靶向 KRAS 的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地
包含 SGHAT(SEQ ID NO:78)所示的 CDR1, FQNGV(SEQ ID NO:79)所示的 CDR2, 和
ASSFSDSYNSPLH(SEQ ID NO:80)所示的 CDR3。在一些实施方案中,在所述多肽分子中,靶向
KRAS 的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立地包含
10 QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSGNDKEDGRFTAQLNKA
SQYVSLLRDSQPSDSATYLCVNLGAAGNKLTFGGGTRVLVVKP(SEQ ID NO:81)的氨基酸序列。在
一些实施方案中,在所述多肽分子中,靶向 KRAS 的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地包含
EAGVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSA
ERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSFSDSYNSPLHFGNGTRTLTVT(SEQ ID NO:82)的氨基酸序
15 列。

在一些实施方案中,在所述多肽分子中,靶向 KRAS 的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立的包含
NSASQS(SEQ ID NO:83)所示的 CDR1, VYSSGN(SEQ ID NO:84)所示的 CDR2, 和 VVTNARLM(SEQ
ID NO:85)所示的 CDR3; 并且靶向 KRAS 的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地包含 MNHEY(SEQ ID
NO:86)所示的 CDR1, SMNVEV(SEQ ID NO:87)所示的 CDR2, 和 ASTSIVSSGRGEQF(SEQ ID NO:88)
20 所示的 CDR3。在一些实施方案中,在所述多肽分子中,靶向 KRAS 的 TRAV1 和 TRAV2 各自独
立地包含
RKEVEQDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLNR
ASQYISLLLRDSKLSDSATYLCVVTNARLMFGDGTQLVVKP(SEQ ID NO:89)的氨基酸序列。在
一些实施方案中,在所述多肽分子中,靶向 KRAS 的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地包含
EAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYK
25 VSRKEKRNFLILESPSPNQTSLYFCASTSIVSSGRGEQFFGPGTRTLTVL(SEQ ID NO:90)的氨基酸序
列。

在一些实施方案中,所述第一抗原和第三抗原各自独立地为 gp100。

在一些实施方案中,在所述多肽分子中,靶向 gp100 的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立地包含
30 SQQGEEDPQALSIQEGENATMNC SYKTSINNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGLRLRVTLDT
KKSSSLLITASRAADTASYFCATDGSTPMQFGKGTSLVI(SEQ ID NO:91)的氨基酸序列,并且靶向
gp100 的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地包含
DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWAQGDFQKGDIAEGYS
VSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWGAPYEYFGPGTRTLTVT(SEQ ID NO:92)的氨基酸序
35 列。在一些实施方案中,靶向 gp100 的 TRAV1 和 TRAV2 各自独立地包含
SQQGEEDPQALSIQEGENATMNC SYKTSINNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGLRLRVTLDT
KKSSSLLITASRACDTASYFCATDGSTPMQFGKGTSLVI(SEQ ID NO:93)的氨基酸序列; 并且靶向
gp100 的 TRBV1 和 TRBV2 各自独立地包含
DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWAQGDFQKGDIAEGYS
40 VSREKKESFPLTVTSAQKCPTAFYLCASSWGAPYEYFGPGTRTLTVT(SEQ ID NO:94)的氨基酸序
列。

在一些实施方案中,第二抗原和第四抗原不同且各自独立地为 CD3、CD28、4-1BB(CD137)、或
PD1。在一些实施方案中,第二抗原为 CD3。在一些实施方案中,第四抗原为 CD28。在一些实施方
案中,第二抗原或第四抗原为 4-1BB(CD137)。在一些实施方案中,第二抗原为 CD3,且第四抗原为
45 CD28。在一些实施方案中,第二抗原为 CD3 或 CD28,且第四抗原为 4-1BB(CD137)。在一些实施方
案中,第二抗原为 4-1BB(CD137),且第四抗原为 CD3 或 CD28。在一些实施方案中,第二抗原为
CD3 或 CD28,且第四抗原为 PD1。

在一些实施方案中,第二抗原和第四抗原相同且均为 CD3。在一些实施方案中,第二抗原和
第四抗原均为 CD3,并且第二结合区和第四结合区各自独立地包含来源于选自但不限于以下的抗 CD3
50 抗体的 VH 和 VL: OKT3、UCHT-1、BMA031 和 12F6。

在一些实施方案中,所述第二结合区和第四结合区各自独立地包含以下抗体的 VH 和 VL:

VH

>VH(抗 CD3 抗体 huUCHT1,包含 G44C 突变)

- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYTMNWVRQAPGKCLEWVALINPYKGVSTYNQK
FKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYGDSWDYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID
NO: 95)
>VH(抗 CD3 抗体 huUCHT1, 包含 G44C、E89C 突变)
- 5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYTMNWVRQAPGKCLEWVALINPYKGVSTYNQK
FKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRACDTAVYYCARSGYGDSWDYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID
NO: 96)
>VH(抗 CD28 抗体, 包含 C50Y 突变)
- 10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGYIYPGNVNTNYNEK
FKDRATLTVDTISISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:
97)
>VH(抗 CD28 抗体, 包含 C50Y、D89C 突变)
- 15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGYIYPGNVNTNYNEK
FKDRATLTVDTISISTAYMELSRLRSCDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:
98)
>VH-BB1(抗 4-1BB 抗体, 单价)
- EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADS
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDARNSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID
NO: 99)
- 20 >VH-BB2(抗 4-1BB 抗体, 双价)
EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCTASGFLNDYWMWVRQAPGKGLEWVGIDVGGSLYYAAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 100)
- VL**
- 25 >VL(抗 CD3 抗体 huUCHT1, 包含 E100C 突变)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTSRLESGVPSRFGS
GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO: 101)
>VL(抗 CD3 抗体 huUCHT1, 包含 E80C、E100C 突变)
- 30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTSRLESGVPSRFGS
GSGTDYTLTISSLQPCDFATYYCQQGNTLPWTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO: 102)
>VL(抗 CD28 抗体)
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFGS
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 103)
>VL(抗 CD28 抗体, 包含 E80C 突变)
- 35 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFGS
SGSGTDFTLTISSLQPCDFATYYCQQGQTYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 104)
>VL-BB1(抗 4-1BB 抗体, 单价)
- QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPRFSGS
KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 105)
- 40 >VL- BB2(抗 4-1BB 抗体, 双价)
DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKPGKAPKRLLIYGASDLASGVPSRFSAS
GSGTDYFTISSLQPEDATYYCHYYATISGLGVAFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 106)。
在优选的实施方案中, 本发明提供的多特异性多肽分子包含:
- 第一多肽链: TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-铰链区-CH2-CH3, 和第二多肽链:
45 TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3 (format 62); 或
第一多肽链: TRAV1-TRAC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-铰链区-CH2-CH3, 和第二多肽链:
TRBV1-TRBC-铰链区-CH2-CH3 (format 62-LJH1); 或
第一多肽链: TRBV1-TRBC-第一接头-VH1-第二接头-VL1-铰链区-CH2-CH3, 和第二多肽链:
TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3 (format 62-LJH2); 或
50 第一多肽链: TRAV1-TRAC-第一接头-VH1-第二接头-VL1-铰链区-CH2-CH3, 并且第二多肽链:
TRBV1-TRBC-接头-铰链区-CH2-CH3 (format 62-LJH3); 或
第一多肽链: VH1-第一接头-TRAV1-第十一接头-TRBV1-铰链区-CH2-CH3, 和第二多肽链:
VL1-铰链区-CH2-CH3 (format 62-2); 或

- 第一多肽链：TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-第三接头-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-TRAC-第四接头-CH2-CH3（format 62-3）；或
- 第一多肽链：TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-铰链区-TRBC，和第二多肽链：TRAV1-TRAC-铰链区-TRAC（format 62-5）；或
- 5 第一多肽链：TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-铰链区，和第二多肽链：TRAV1-TRAC-铰链区-Alb（format 62-6）；或
- 第一多肽链：TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-第五接头-Alb，和第二多肽链：TRAV1-TRAC（format 62-7）；或
- 第一多肽链：TRBV1-CH3-第一接头-VL1-第二接头-VH1-第三接头-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-CH3-第四接头-CH2-CH3（format 62-8）；或
- 10 第一多肽链：TRBV1-TRBC-第一接头-VL1，第二多肽链：VH1-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3（format 62-1）；或
- 第一多肽链：TRBV1-TRBC，第二多肽链：VL1-第二接头-VH1-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3（format 59）；或
- 15 第一多肽链：第一多肽链：TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第六接头-TRAV2-第七接头-TRBV2-第八接头-VH1-铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3（format 58-2）；或
- 第一多肽链：VL2-第九接头-VH2-第十接头-TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3（format 72）；或
- 第一多肽链：第一多肽链：VL2-第九接头-VH2-第十接头-TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第六接头-TRAV2-第七接头-TRBV2-第八接头-VH1-铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3（format 50-2）。
- 20 在一些实施方案中，TRAC包含如SEQ ID NO: 8所示的氨基酸序列。在一些实施方案中，TRBC包含如SEQ ID NO: 11所示的氨基酸序列。
- 25 在一些实施方案中，所述TRAV1和TRBV1为抗MAGE-A1 TCR的TRAV1和TRBV1、抗HPV E7 TCR的TRAV1和TRBV1、抗KRAS TCR的TRAV1和TRBV1，或抗gp100 TCR的TRAV1和TRBV1。在一些实施方案中，所述TRAV1和TRBV1分别包含如SEQ ID NO: 41和42所示的氨基酸序列；如SEQ ID NO: 49和50所示的氨基酸序列；如SEQ ID NO: 57和58所示的氨基酸序列；如SEQ ID NO: 65和66所示的氨基酸序列；如SEQ ID NO: 73和74所示的氨基酸序列；如SEQ ID NO: 81和82所示的氨基酸序列；如SEQ ID NO: 89和90所示的氨基酸序列；或如SEQ ID NO: 91和92所示的氨基酸序列。
- 30 在一些实施方案中，所述TRAV2和TRBV2为抗MAGE-A1 TCR的TRAV2和TRBV2、抗HPV E7 TCR的TRAV2和TRBV2、抗KRAS TCR的TRAV2和TRBV2、抗gp100 TCR的TRAV2和TRBV2。在一些实施方案中，所述TRAV2和TRBV2分别包含如SEQ ID NO: 41和42所示的氨基酸序列；如SEQ ID NO: 49和50所示的氨基酸序列；如SEQ ID NO: 57和58所示的氨基酸序列；如SEQ ID NO: 65和66所示的氨基酸序列；如SEQ ID NO: 73和74所示的氨基酸序列；如SEQ ID NO: 81和82所示的氨基酸序列；如SEQ ID NO: 89和90所示的氨基酸序列；或如SEQ ID NO: 91和92所示的氨基酸序列。
- 35 在一些实施方案中，所述VH1和VL1为抗CD3抗体UCHT-1的VH和VL。在一些实施方案中，所述VH1包含如SEQ ID NO: 95所示的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述VL1包含如SEQ ID NO: 101所示的氨基酸序列。
- 40 在一些实施方案中，所述VH2和VL2为抗CD28抗体的VH和VL。在一些实施方案中，所述VH2包含如SEQ ID NO: 97所示的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述VL2包含如SEQ ID NO: 103所示的氨基酸序列。
- 45 在一些实施方案中，所述Alb为人血清白蛋白，其氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。
- 在一些实施方案中，所述铰链区包含如SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列。
- 在一些实施方案中，所述CH2结构域包含如SEQ ID NO: 5或161所示的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽分子的一条链中的CH3结构域包含如SEQ ID NO: 6所示的氨基酸序列，另一条链中的CH3结构域包含如SEQ ID NO: 7所示的氨基酸序列。
- 50 在一些实施方案中，所述第一接头选自GGSGGS（LM1，SEQ ID NO: 24）、GGGSGGGSGGGGS（LM2，SEQ ID NO: 27）和GS（LM3，SEQ ID NO: 20）。在更为优选的实施方案中，所述第一接头为GGGSGGGSGGGGS（LM2，SEQ ID NO: 27）。
- 在一些实施方案中，所述第二接头、第三接头、第四接头、第五接头、第六接头、第七接头、第八接头、第九接头、第十接头和第十一接头各自独立地选自GGGS（SEQ ID NO: 22）和GGGSGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 27）。在一优选的实施方案中，所述第二接头为GGGSGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 27）。在一优选的实施方案中，所述第三接头为GGGS（SEQ

ID NO: 22)。在一优选的实施方案中,所述第四接头为GGGGS (SEQ ID NO: 22)。在一优选的实施方案中,所述第五接头为GGGGS (SEQ ID NO: 22)。在一优选的实施方案中,所述第六接头为GGGGS (SEQ ID NO: 22)。在一优选的实施方案中,所述第七接头为GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 27)。在一优选的实施方案中,所述第八接头为GGGGS (SEQ ID NO: 22)。在一优选的实施方案中,所述第九接头为GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 27)。在一优选的实施方案中,所述第十接头为GGGGS (SEQ ID NO: 22)。在一优选的实施方案中,所述第十一接头为GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 27)。

在第九方面,本发明提供了核酸,其包含编码本发明第一方面至第八方面任一项的多特异性多肽分子的每一条链的核苷酸序列。

10 在第十方面,本发明提供了载体,其包含本发明第八方面的核酸。

任何合适的载体均可用于本发明。载体的实例包括但不限于质粒、病毒载体(包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、牛痘病毒载体、多瘤病毒载体和腺病毒相关载体(AAV))、噬菌体、噬菌粒、粘粒和人工染色体(包括BAC和YAC)。载体本身通常是核苷酸序列,通常是包含插入物(转基因)的DNA序列和作为载体“骨架”的较大序列。工程化载体通常包含在宿主细胞中自主复制的起点(如果需要多核苷酸的稳定表达)、选择标记和限制酶切割位点(如多克隆位点, MCS)。载体可另外包含启动子、遗传标记、报告基因、靶向序列和/或蛋白质纯化标签。如本领域技术人员已知的,大量合适的载体是本领域技术人员已知的,并且许多可商购获得。在J.Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(第4版), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York(2012)中提供了合适载体的实例,其通过引用整体并入本文。

20 在一些实施方案中,载体优选选自慢病毒载体、逆转录病毒载体、质粒、DNA载体、mRNA载体、基于转座子的载体和人工染色体。

在第十一方面,本发明提供了载体系统,其在一个或多个载体上包含编码本发明第一方面至第八方面任一项的多特异性多肽分子的每一条链的核苷酸序列。

25 在第十二方面,本发明提供了宿主细胞,其包含本发明第九方面的核酸、第十方面的载体或第十一方面的载体系统。

任何细胞都可以用作本发明的核酸或载体的宿主细胞。细胞可以为真核细胞,例如,植物(不具有发育成植株的潜能)、动物、真菌或藻类,或可以为原核细胞,例如,细菌或原生动物。细胞可以为培养的细胞或原代细胞,即直接分离自生物体,例如人。细胞可以为贴壁细胞或悬浮细胞,即悬浮生长的细胞。合适的宿主细胞为本领域已知的并且包括,例如, DH5 α 大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞等。为了产生本公开的多肽分子的目的,细胞优选为哺乳动物细胞。最优选地,宿主细胞为人细胞。

30 在一些实施方案中,所述细胞选自淋巴细胞(例如T细胞、NK细胞)、单核细胞(例如PBMC)和干细胞。例如,干细胞可以是淋巴祖细胞、诱导多能干细胞(iPSC)或造血干细胞(HSC)。在一些实施方案中,干细胞不包括通过破坏人类胚胎获得的胚胎干细胞,和/或不包括用于发育并形成动物个体的全能性干细胞。

35 在第十三方面,本发明提供了缀合物,其包含本发明第一方面至第八方面任一项的多特异性多肽分子,以及与所述多特异性多肽分子缀合的化学部分。

在一些实施方案中,所述化学部分选自治疗剂、免疫刺激分子和可检测标记。

40 在一些实施方案中,治疗剂包括但不限于免疫调节剂、激动剂、放射性化合物、酶(例如穿孔素)、化学治疗剂(例如顺铂)或毒素。在一些实施方案中,治疗剂可以是例如美登素、格尔德霉素、微管蛋白抑制剂例如微管蛋白结合剂(例如奥瑞他汀类)或小沟结合剂例如加利车霉素(calicheamicin)。

其他合适的治疗剂包括例如小分子细胞毒剂,即具有杀死哺乳动物细胞能力的分子量小于700道尔顿的化合物。这样的化合物还可包含能够具有细胞毒性作用的有毒金属。此外,应当理解,这些小分子细胞毒剂还包括药物前体,即在生理条件下分解或转化以释放细胞毒剂的化合物。此类药剂的实例包括顺铂、美登素衍生物、雷切霉素、加利车霉素、多西他赛、依托泊苷、吉西他滨、异环磷酰胺、伊立替康、美法仑、米托蒽醌、sorfimer 吡啶钠 II、替莫唑胺、托泊替康、三甲双胍、奥瑞他汀E、长春生物碱和多柔比星;肽细胞毒素,即具有杀死哺乳动物细胞能力的蛋白质或其片段,例如蓖麻毒素、白喉毒素、假单胞菌细菌外毒素A、DNA酶和RNA酶;放射性核素,即随着 α 或 β 粒子或 γ 射线的一种或多种的同时发射而衰变的元素的不稳定同位素,例如碘-131、铈-186、铟-111、钇-90、铋-210、铋-213、铜-225和铈-213;螯合剂,其可用于促进这些放射性核素与分子或其多聚体的结合。

50 在一些实施方案中,免疫刺激分子是激发免疫应答的免疫效应分子。例如,免疫刺激分子可以是细胞因子如IL-2和IFN- γ 、趋化因子如IL-8、血小板因子4、黑色素瘤生长刺激蛋白、补体激活剂;

病毒/细菌蛋白结构域,或病毒/细菌肽。在优选的实施方案中,免疫刺激分子选自细胞因子、趋化因子、血小板因子和补体启动剂。

在一些实施方案中,可检测标记可以选自生物素、链霉抗生物素蛋白、酶或其催化活性片段、放射性核素、纳米颗粒、顺磁性金属离子或荧光、磷光,或化学发光分子。用于诊断目的的可检测部分包括例如荧光标记、放射性标记、酶、核酸探针和造影剂。

在第十四方面,本发明提供了药物组合物,其包含本发明第一方面至第八方面任一项的多特异性多肽分子、本发明第九方面的核酸、本发明第十方面的载体、本发明第十一方面的载体系统、本发明第十二方面的宿主细胞、本发明第十三方面的缀合物,以及药学上可接受的赋形剂。

本发明的药物组合物特别适合施用于人;然而,其也适合施用于非人动物。所述组合物及其组分(即活性剂和任选的赋形剂)优选为药物上可接受的,即在接受者中能够引发所需的治疗效果而不会引起任何不希望的局部或全身作用。本发明的药物组合物可以是例如无菌的。

赋形剂的实例包括但不限于填充剂、粘合剂、崩解剂、包衣剂、吸附剂、抗粘附剂、助流剂、防腐剂、抗氧化剂、调味剂、着色剂、甜味剂、溶剂、共溶剂、缓冲剂、螯合剂、粘度赋予剂、表面活性剂、稀释剂、润湿剂、载体、稀释剂、防腐剂、乳化剂、稳定剂和张力调节剂。本领域技术人员已知选择合适的赋形剂以制备本发明的药物组合物。用于本发明的药物组合物中的示例性载体包括盐水、缓冲盐水、葡萄糖和水。通常,合适的赋形剂的选择尤其取决于所使用的活性剂、待治疗的疾病和组合物的期望剂型。

根据所采用的活性剂,可将本发明的药物组合物制备成各种形式,如固态、液态、气态或冻干形式,特别可以是软膏剂、乳膏剂、透皮贴剂、凝胶剂、粉剂、片剂、溶液剂、气雾剂、颗粒剂、丸剂、混悬剂、乳剂、胶囊剂、糖浆剂、液体剂、酏剂、浸膏剂、酹剂或流浸膏提取物的形式,或者是特别适用于所需施用方法的形式。本发明已知的用于生产药物的过程在第22版的Remington's Pharmaceutical Sciences(Ed.MaackPublishing Co, Easton, Pa., 2012)中显示,并可包括例如常规混合、溶解、制粒、制糖衣、研磨、乳化、包封、包埋或冻干过程。

在一些实施方案中,所述药物组合物还包含第二治疗剂,优选地,所述第二治疗剂选自抗体、化疗剂和小分子药物。

第二治疗剂的优选实例包括已知的抗癌药物,例如顺铂、美登素衍生物、雷查霉素(rachelmycin)、卡里奇霉素(calicheamicin)、多西紫杉醇、依托泊苷、吉西他滨、异环磷酰胺、伊立替康、美法仑、米托蒽醌、sorfiner吡啶钠II(sorfiner sodiumphotofrin II)、替莫唑胺、拓扑替康、葡萄糖醛酸曲美沙特(trimetreate glucuronate)、奥利斯他汀E(auristatin E)、长春新碱和阿霉素;和肽细胞毒素,例如蓖麻毒素、白喉毒素、假单胞菌细菌外毒素A、DNA酶和RNA酶;放射性核素,例如碘131、铈186、钆111、铟90、铋210和213、镭225和钷213;前药,例如抗体定向的酶前药;免疫刺激剂,例如IL-2,趋化因子例如IL-8、血小板因子4;抗体或其片段,例如抗CD3抗体或其片段;补体活化剂;病毒/细菌蛋白结构域和病毒/细菌肽。

在第十五方面,本发明提供了预防或治疗受试者的疾病的方法,其包括向所述受试者施用有效量的本发明第一方面至第八方面任一项的多特异性多肽分子、本发明第九方面的核酸、本发明第十方面的载体、本发明第十一方面的载体系统、本发明第十二方面的宿主细胞、本发明第十三方面的缀合物、或本发明第十四方面的药物组合物,其中所述疾病选自癌症、感染性疾病、自身免疫病和炎症疾病。

癌症可为任何癌症,例如血液系统的癌症、中枢和外周神经系统的癌症、淋巴谱系的癌症、骨髓谱系的癌症、间充质来源的癌症、实体瘤等。癌症的实例包括但不限于急性淋巴细胞性癌症、急性骨髓性白血病、腺泡状横纹肌肉瘤、骨癌、脑癌、乳腺癌、肛门癌、肛管癌或直肠肛门癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻咽癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、阴道癌、外阴癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性癌症、结肠癌、食管癌、宫颈癌、胃肠道类癌肿瘤、胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌、恶性间皮瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、卵巢癌、阴茎癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、输尿管癌和膀胱癌。

感染性疾病是由病原体感染所导致的疾病,包括传染性疾病和非传染性疾病。引起感染性疾病的病原体包括病毒、细菌、支原体、衣原体、立克次体、朊粒、真菌、螺旋体和寄生虫等。病毒的实例包括但不限于 HPV、CMV、HBV、EBV、疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、流感病毒和冠状病毒。

常见的自身免疫病和炎症疾病包括但不限于类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、银屑病关节炎、自身免疫破坏胰岛导致的糖尿病、干燥综合征、桥本甲状腺炎、Graves'甲状腺炎、毒性弥漫性甲状腺肿、自身免疫性溶血性贫血、特发性血小板减少性紫癜、炎症肠病(例如溃疡性结肠

炎和克罗恩病)、牛皮癣、肾小球肾炎、肾病综合征、抗肾小球基底膜病、膜性肾病、系统性硬化症、多发性肌炎、重症肌无力、银屑病、天疱疮、白癫风、中枢神经系统的自身免疫性疾病、乳糜泻、自身免疫性胃炎、原发性胆道胆管炎、自身免疫性肝炎、肺出血-肾炎综合征、自身免疫性卵巢炎、自身免疫性睾丸炎、特发性白细胞减少症、原发性肾上腺皮质萎缩、抗磷脂抗体综合征、感染后纤维化、心肌梗死后纤维化、肝纤维化、瘢痕增生。

5 在一些实施方案中,施用于受试者的剂量可随实施方案、所用药物、给药方法以及被治疗的部位和受试者而变化。然而,剂量应足以提供治疗反应。临床医生可以确定给予人或其他受试者以治疗医学病症的有效量。治疗有效所需的精确量可取决于许多因素,例如活性剂的活性和给药途径。

10 本发明的多肽分子、缀合物或药物组合物的剂量可以在合适的时间段内一次性或以一系列亚剂量的形式施用于哺乳动物,例如根据需要,每天、每半周、每周、每两周、每半月、每两月、每半年或每年施用一次。包含有效量的多肽分子、缀合物或药物组合物的剂量单位可以以单剂量给药,或者总日剂量可以根据需要以每日给药的两个、三个、四个或更多个分剂量给药。

15 合适的给药方式可由医生选择。给药途径可以是肠胃外给药,例如通过注射给药、经鼻给药、经肺给药或经皮给药。可以通过静脉内注射、肌内注射、腹膜内注射、皮下注射进行全身或局部给药。在一些实施方案中,选择多肽分子、缀合物或药物组合物用于肠胃外递送、吸入或通过消化道递送,例如口服。给药剂量和方法可以根据受试者的重量、年龄、条件等而变化,并且可以适当地选择。

在一些实施方案中,所述方法还包括向所述受试者施用第二治疗剂。在某些实施方案中,在施用第二治疗剂之前、基本上同时或之后施用本发明的多肽分子、缀合物或药物组合物。优选地,第二治疗剂选自抗体、化疗剂和小分子药物。第二治疗剂的优选实例如上文所述。

20 在第十六方面,本公开提供了检测(例如诊断)受试者中的疾病的方法,其中所述方法包括(i)使从受试者获得的样品与本发明的多肽分子或缀合物接触;和(ii)检测所述样品中靶抗原的存在,其中所述靶抗原的存在指示受试者患有相应疾病。

25 靶抗原可以选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原。疾病可以选自癌症、感染性疾病、自身免疫病和炎性疾病。所述癌症、感染性疾病、自身免疫病和炎性疾病如上文所定义。

30 在一些实施方案中,从受试者获得的样品可以是血液样品、尿液样品、组织样品或细胞样品。在某些实施方案中,所述方法在体外进行。在一些实施方案中,所述方法包括(i)使从受试者获得的样品与本发明的缀合物接触,其中该缀合物包含可检测标记;和(ii)通过检测可检测标记来检测所述样品中靶抗原的存在。可检测标记的实例包括但不限于生物素、链霉抗生物素蛋白、酶或其催化活性片段、放射性核素、纳米颗粒、顺磁性金属离子、核酸探针、造影剂、和荧光、磷光或化学发光分子;优选酶或其催化活性片段、放射性核素、荧光、磷光或化学发光分子。

35 在第十七方面,本公开提供了试剂盒,其包含本公开的多肽分子或缀合物,所述试剂盒用于检测待测样品中靶抗原的存在。

40 在一些实施方案中,所述试剂盒为用于检测(例如诊断)受试者中的疾病的试剂盒,其包含本公开的多肽分子或缀合物。靶抗原可以选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原。疾病可以选自癌症、感染性疾病、自身免疫病和炎性疾病。所述癌症、感染性疾病、自身免疫病和炎性疾病如上文所定义。

45 在一些实施方案中,所述缀合物包含可检测标记。可检测标记的实例包括但不限于生物素、链霉抗生物素蛋白、酶或其催化活性片段、放射性核素、纳米颗粒、顺磁性金属离子、核酸探针、造影剂、和荧光、磷光或化学发光分子;优选酶或其催化活性片段、放射性核素、荧光、磷光或化学发光分子。在一些实施方案中,试剂盒还可以包含如何使用该试剂盒的说明书。

在第十八方面,本公开提供了本发明第一方面至第八方面任一项的多特异性多肽分子、本发明第九方面的核酸、本发明第十方面的载体、本发明第十一方面的载体系统、本发明第十二方面的宿主细胞、本发明第十三方面的缀合物、或本发明第十四方面的药物组合物在制备用于治疗或预防受试者中的疾病的药物中的用途。

50 在第十九方面,本公开提供了本发明第一方面至第八方面任一项的多特异性多肽分子、本发明第九方面的核酸、本发明第十方面的载体、本发明第十一方面的载体系统、本发明第十二方面的宿主细胞、本发明第十三方面的缀合物、或本发明第十四方面的药物组合物,其用于治疗或预防受试者中的疾病。

在第二十方面,本公开提供了本发明第一方面至第八方面任一项的多特异性多肽分子或本发明第十三方面的缀合物在制备用于检测待测样品中靶抗原的存在的试剂盒中的用途。

在一些实施方案中,本公开提供了本发明第一方面至第八方面任一项的多特异性多肽分子或本发明第十三方面的缀合物在制备用于检测(例如诊断)受试者中的疾病的试剂盒中的用途。

在第二十一方面，本公开提供了本发明第一方面至第八方面任一项的多特异性多肽分子或本发明第十二方面的缀合物，其用于检测待测样品中靶抗原的存在。

在本公开的用途的一些实施方案中，靶抗原可以选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原。疾病可以选自癌症、感染性疾病、自身免疫病和炎性疾病。所述癌症、感染性疾病、自身免疫病和炎性疾病如上文所定义。

5 本公开提供了以下优选实施方案：

1. 一种多特异性多肽分子，所述多特异性多肽分子包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区，

10 其中所述第一结合区包含来源于与所述第一抗原-MHC 复合物结合的 T 细胞受体(TCR)的 α 链可变区(TRAV1)和 β 链可变区(TRBV1)；

其中所述第二结合区包含来源于与所述第二抗原结合的抗体的重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1 或来源于与所述第二抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH1)；

其中所述第一抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原，且所述第二抗原为免疫细胞表面分子；

15 其中所述抗体的 N 端连接在所述 TCR 的 C 端；

其中所述多特异性多肽分子还包含以下至少一种功能结构域：

1) 源于抗体的铰链区；

2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分；

3) 源于抗体的 CH3 结构域；

20 4) 白蛋白(Alb)或其结合部分；

5) 源于 TCR 的恒定区或其片段。

2. 根据实施方案 1 所述的多特异性多肽分子，其中 TRAV1 和 TRBV1 分布在不同的多肽链上；和/或

25 所述 VH1 和 VL1 分布在一条多肽链上（例如形成 scFv1）；且所述 TRAV1 和 TRBV1 分布在不同多肽链上。

3. 根据实施方案 1 或 2 所述的多特异性多肽分子，其中所述多特异性多肽分子在两条多肽链上包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区；

30 优选的，TRAV1 和 TRBV1 分布在不同多肽链上，所述 VHH1 或所述 VH1 和 VL1 分布在一条多肽链上（例如形成 scFv1）并连接在所述 TCR 的 C 端；或 TRAV1 和 TRBV1 分布在不同多肽链上，所述 VH1 和 VL1 分布在不同多肽链上，且所述 VH1 和 VL1 中的一个所在多肽链连接在所述 TRAV1 所在多肽链的 C 端，另一个所在多肽链连接在所述 TRBV1 所在多肽链的 C 端；

或者，

所述多特异性多肽分子在三条多肽链上包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区；

35 优选的，TRAV1 和 TRBV1 分布在不同多肽链上，所述 VH1 和 VL1 分布在不同多肽链上，VH1 或 VL1 所在多肽链连接在 TRBV1 或 TRAV1 所在多肽链的 C 端。

4. 根据实施方案 1-3 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述多特异性多肽分子的多肽链分别包含：

40 TRBV1-scFv1 和 TRAV1；或

TRAV1-scFv1 和 TRBV1；或

TRBV1-VHH1 和 TRAV1；或

TRAV1-VHH1 和 TRBV1；或

TRBV1-VL1 和 TRAV1-VH1；或

45 TRAV1-VL1 和 TRBV1-VH1；或

TRBV1-VL1-VH1 和 TRAV1；或

TRBV1-VH1-VL1 和 TRAV1；或

TRAV1-VH1-VL1 和 TRBV1；或

50 TRBV1-VL1，VH1，和 TRAV1；或

TRBV1-VH1，VL1，和 TRAV1；或

TRAV1-VL1，VH1，和 TRBV1；或

TRAV1-VH1，VL1，和 TRBV1。

5. 根据实施方案 1-4 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述多特异性多肽分子还包含与第

三抗原结合的第三结合区, 所述第三结合区包含来源于与所述第三抗原-MHC 复合物结合的 TCR 的 α 链可变区(TRAV2)和 β 链可变区(TRBV2); 其中所述第三抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原, 并且所述第三抗原与所述第一抗原相同或不同。

5 6. 根据实施方案 5 所述的多特异性多肽分子, 其中所述 TRAV2 与所述 TRAV1 相同, 和/或所述 TRBV2 与所述 TRBV1 相同。

7. 根据实施方案 5 或 6 所述的多特异性多肽分子, 其中所述 TRAV2 和所述 TRBV2 通过接头连接在同一条多肽链上, 并优选连接在 VH1 和 VL1 之间。

8. 根据实施方案 7 所述的多特异性多肽分子, 其中所述多特异性多肽分子包含两条多肽链, 所述两条多肽链分别包含:

10 TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 TRAV1; 或
TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 TRAV1; 或
TRBV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 TRAV1; 或
TRBV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 TRAV1; 或
15 TRAV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 TRBV1; 或
TRAV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 TRBV1; 或
TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 TRBV1; 或
TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 TRBV1。

9. 根据实施方案 1-8 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述多特异性多肽分子还包含与第四抗原结合的第四结合区, 所述第四结合区包含来源于与所述第四抗原结合的抗体的重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2 或来源于与所述第四抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH2); 其中所述第四抗原为免疫细胞表面分子, 并且所述第四抗原与所述第二抗原相同或不同。

20 10. 根据实施方案 9 所述的多特异性多肽分子, 其中所述 VH2 与所述 VH1 相同, 和/或所述 VL2 与所述 VL1 相同, 和/或所述 VHH2 与所述 VHH1 相同。

25 11. 根据实施方案 9 或 10 所述的多特异性多肽分子, 其中所述 VHH2 或所述 VH2 和 VL2 串联在一条多肽链上(例如, 形成 scFv2 或 Fab2)连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 N 端, 或者所述 VH2 和 VL2 中的一个连接在所述 TRAV1 的 N 端, 另一个连接在所述 TRBV1 的 N 端。

12. 根据实施方案 11 所述的多特异性多肽分子, 其中所述多特异性多肽分子包含两条多肽链, 所述两条多肽链分别包含:

30 scFv2-TRBV1-scFv1 和 TRAV1; 或
scFv2-TRAV1-scFv1 和 TRBV1; 或
scFv2-TRBV1-VHH1 和 TRAV1; 或
scFv2-TRAV1-VHH1 和 TRBV1; 或
scFv2-TRBV1-VL1 和 TRAV1-VH1; 或
scFv2-TRAV1-VL1 和 TRBV1-VH1; 或
35 TRBV1-scFv1 和 scFv2-TRAV1; 或
TRAV1-scFv1 和 scFv2-TRBV1; 或
TRBV1-VHH1 和 scFv2-TRAV1; 或
TRAV1-VHH1 和 scFv2-TRBV1; 或
TRBV1-VL1 和 scFv2-TRAV1-VH1; 或
40 TRAV1-VL1 和 scFv2-TRBV1-VH1; 或
VHH2-TRBV1-scFv1 和 TRAV1; 或
VHH2-TRAV1-scFv1 和 TRBV1; 或
VHH2-TRBV1-VHH1 和 TRAV1; 或
VHH2-TRAV1-VHH1 和 TRBV1; 或
45 VHH2-TRBV1-VL1 和 TRAV1-VH1; 或
VHH2-TRAV1-VL1 和 TRBV1-VH1; 或
TRBV1-scFv1 和 VHH2-TRAV1; 或
TRAV1-scFv1 和 VHH2-TRBV1; 或
TRBV1-VHH1 和 VHH2-TRAV1; 或
50 TRAV1-VHH1 和 VHH2-TRBV1; 或
TRBV1-VL1 和 VHH2-TRAV1-VH1; 或
TRAV1-VL1 和 VHH2-TRBV1-VH1; 或
VL2-TRBV1-scFv1 和 VH2-TRAV1; 或

5 VH2-TRBV1-scFv1 和 VL2-TRAV1; 或
 VL2-TRAV1-scFv1 和 VH2-TRBV1; 或
 VH2-TRAV1-scFv1 和 VL2-TRBV1; 或
 VL2-TRBV1-VHH1 和 VH2-TRAV1; 或
 VH2-TRBV1-VHH1 和 VL2-TRAV1; 或
 VL2-TRAV1-VHH1 和 VH2-TRBV1; 或
 VH2-TRAV1-VHH1 和 VL2-TRBV1; 或
 10 VL2-TRBV1-VL1 和 VH2-TRAV1-VH1; 或
 VH2-TRBV1-VL1 和 VL2-TRAV1-VH1; 或
 VL2-TRAV1-VL1 和 VH2-TRBV1-VH1; 或
 VH2-TRAV1-VL1 和 VL2-TRBV1-VH1。

13. 根据实施方案 11 所述的多特异性多肽分子, 其中所述多特异性多肽分子包含第一结合区、第二结合区、第三结合区和第四结合区, 并且所述多特异性多肽分子包含两条多肽链, 所述两条多肽链分别包含:

15 scFv2-TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 TRAV1; 或
 scFv2-TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 TRAV1; 或
 scFv2-TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 TRAV1; 或
 scFv2-TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 TRAV1; 或
 20 scFv2-TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 TRBV1; 或
 scFv2-TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 TRBV1; 或
 scFv2-TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 TRBV1; 或
 scFv2-TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 TRBV1; 或
 TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 scFv2-TRAV1; 或
 TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 scFv2-TRAV1; 或
 25 TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 scFv2-TRAV1; 或
 TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 scFv2-TRAV1; 或
 TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 scFv2-TRBV1; 或
 TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 scFv2-TRBV1; 或
 30 TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 scFv2-TRBV1; 或
 TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 scFv2-TRBV1; 或
 VHH2-TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 TRAV1; 或
 VHH2-TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 TRAV1; 或
 VHH2-TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 TRAV1; 或
 VHH2-TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 TRAV1; 或
 35 VHH2-TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 TRBV1; 或
 VHH2-TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 TRBV1; 或
 VHH2-TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 TRBV1; 或
 VHH2-TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 TRBV1; 或
 TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 VHH2-TRAV1; 或
 40 TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 VHH2-TRAV1; 或
 TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 VHH2-TRAV1; 或
 TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 VHH2-TRAV1; 或
 TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 VHH2-TRBV1; 或
 TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 VHH2-TRBV1; 或
 45 TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 VHH2-TRBV1; 或
 VL2-TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 VH2-TRAV1; 或
 VL2-TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 VH2-TRAV1; 或
 VH2-TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 VL2-TRAV1; 或
 50 VH2-TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 VL2-TRAV1; 或
 VL2-TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 VH2-TRAV1; 或
 VL2-TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 VH2-TRAV1; 或
 VH2-TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 VL2-TRAV1; 或

- VH2-TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 VL2-TRAV1; 或
VL2-TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 VH2-TRBV1; 或
VL2-TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 VH2-TRBV1; 或
VH2-TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 VL2-TRBV1; 或
5 VH2-TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 VL2-TRBV1; 或
VL2-TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 VH2-TRBV1; 或
VL2-TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 VH2-TRBV1; 或
VH2-TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 VL2-TRBV1; 或
VH2-TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 VL2-TRBV1。
- 10 14 根据实施方案 1-13 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述功能结构域来源于白蛋白或其结合部分和任选的抗体的铰链区; 并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任一条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端。
- 15 15. 根据实施方案 14 所述的多特异性多肽分子, 其中所述白蛋白为血清白蛋白, 优选为人血清白蛋白; 和/或
- 16 所述抗体的铰链区为人源, 例如, 源自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的铰链结构域或其部分。
- 17 16. 根据实施方案 1-13 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述功能结构域来源于抗体的铰链区和/或抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分和/或抗体的 CH3 结构域; 并且所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接;
- 20 优选的, 所述功能结构域的两条链通过任选的接头分别连接在所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端; 或
- 所述第一结合区和所述第二结合区通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。
17. 根据实施方案 16 所述的多特异性多肽分子, 其中所述抗体的铰链区为人源, 例如, 源自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的铰链结构域或其部分; 和/或
- 25 所述抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分为人源, 例如, 源自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的 Fc 结构域或其部分。
18. 根据实施方案 16 或 17 所述的多特异性多肽分子, 其中所述抗体的铰链区包含至少一个能够降低或消除所述多特异性分子与 FcR 受体和/或 C1q 结合的氨基酸突变, 例如, 所述突变位点选自 233、234、235 和 236 的位置; 和/或
- 30 所述抗体的铰链区包含至少一个能够降低或消除铰链区和非铰链区之间形成二硫键的突变, 例如, 突变位点为 220; 和/或
- 所述 Fc 结构域中 CH2 结构域包含至少一个能够降低或消除所述多特异性分子与 FcR 受体和/或 C1q 结合的氨基酸突变; 例如, 所述突变位点选自 237、250、252、254、256、270、297、322、327、330 和 331 位置; 和/或
- 35 所述 Fc 结构域中 CH3 结构域包含至少一个能够降低或消除所述多特异性分子与 FcR 受体和/或 C1q 结合的氨基酸突变; 例如, 所述突变位点选自 428 和 434 位置;
- 所述 Fc 结构域中的 CH3 包含以下至少一种能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变:
- a) 包含至少两个半胱氨酸残基突变以形成链间二硫键, 例如 354C 和 349C 或 242C 和 334C;
- 40 b) 包含能够使两个 CH3 形成杆状结构的突变, 例如, 所述 CH3 各自独立地包含位于选自氨基酸位置 366、368、405 和 407 的一个或更多个位置的突变, 优选地, 所述 CH3 中的一个包含 366W 突变且另一个包含 366S、368A 和 407V 突变;
- c) 包含能够改变 CH3 区域相互作用界面的氨基酸的电荷性质以促进异源二聚体形成的突变, 例如, 两条 CH3 链的突变位点各自独立的选自 Y391、K392、T393、T394、P395、P396、V397、L398、D399、S400、Q347、V348、Y349、T350、S354、R355、E356、E357、F405、Y407 和 K409
- 45 中的至少一个。
19. 根据实施方案 16 或 17 所述的多特异性多肽分子, 其中所述抗体的 CH3 结构域为人源, 例如, 源自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的 CH3 结构域; 和/或
- 所述 CH3 结构域包含以下至少一种能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变:
- a) 包含至少两个半胱氨酸残基突变以形成链间二硫键, 例如 354C 和 349C 或 242C 和 334C;
- 50 b) 包含能够使两个 CH3 形成杆状结构的突变, 例如, 所述 CH3 各自独立地包含位于选自氨基酸位置 366、368、405 和 407 的一个或更多个位置的突变, 优选地, 所述 CH3 中的一个包含 366W 突变且另一个包含 366S、368A 和 407V 突变;
- c) 包含能够改变 CH3 区域相互作用界面的氨基酸的电荷性质以促进异源二聚体形成的突变, 例

如, 两条 CH3 链的突变位点各自独立的选自 Y391、K392、T393、T394、P395、P396、V397、L398、D399、S400、Q347、V348、Y349、T350、S354、R355、D356、E357、K370、F405、Y407、K409 和 K439 中的至少一个。

20. 根据实施方案 1-13 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述功能结构域来源于 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区; 并且所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接;

优选的, 所述功能结构域的两条链通过任选的接头分别连接在所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端; 或

所述第一结合区和所述第二结合区通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。

21. 根据实施方案 20 所述的多特异性多肽分子, 其中所述抗体的铰链区为人源, 例如, 源自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的铰链结构域或其部分; 和/或

所述 TCR 的恒定区或其片段是人源或鼠源的, 并且选自 TCR α 链恒定区(TRAC)和 TCR β 链恒定区(TRBC); 优选地, 所述 TRAC 和/或 TRBC 包含相对于野生型序列的至少一个半胱氨酸突变, 以在 TRAC 和 TRBC 之间形成二硫键, 更优选地, 所述半胱氨酸突变在以下位置处: 野生型 TCR α 链恒定区第 48 位和野生型 TCR β 链恒定区第 57 位。

22. 根据实施方案 1-21 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和/或 TRBV1 的 C 端的选自以下的恒定结构域:

(1) TCR 恒定区或其片段, 所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC);

优选地, 所述 TRAC 和/或 TRBC 包含相对于野生型序列的至少一个半胱氨酸突变, 以在 TRAC 和 TRBC 之间形成二硫键, 更优选地, 所述半胱氨酸突变在以下位置处: 野生型 TCR α 链恒定区第 48 位和野生型 TCR β 链恒定区第 57 位;

(2) CH3, 所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域, 优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变;

优选地, 所述 CH3 各自独立地包含位于选自氨基酸位置 366、368、405 和 407 的一个或多个位置的突变且两个 CH3 不包含相同的突变, 更优选地, 所述 CH3 中的一个包含 T366W 突变且另一个包含 T366S、L368A 和 Y407V 突变;

(3) CL 和 CH1, 所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域, 并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。

23. 根据实施方案 22 所述的多特异性多肽分子, 其中所述多特异性多肽分子包含通过任选的接头分别连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TRAC 和 TRBC。

24. 根据实施方案 1-23 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述多特异性多肽分子还包含分别连接至所述 VH1 和 VL1 的来源于抗体的 CH1 和 CL, 其中所述 VH1、VL1、CH1 和 CL 形成单链 Fab 并通过接头连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 C 端。

25. 根据实施方案 1-4 和 14-24 中任一项的多特异性多肽分子, 其中所述多肽分子的多肽链从 N 端到 C 端分别包含:

第一多肽链: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 和第二多肽链: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3; 或

第一多肽链: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 和第二多肽链: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3; 或

第一多肽链: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 和第二多肽链: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3; 或

第一多肽链: TRAV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3, 和第二多肽链: TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3; 或

第一多肽链: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-接头-CH2-CH3, 和第二多肽链: TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-CH2-CH3; 或

第一多肽链: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH3, 和第二多肽链: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH3; 或

第一多肽链: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-TRBC, 和第二多肽链: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-TRAC; 或

第一多肽链: TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区, 和第二多肽链: TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-Alb; 或

- 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-接头-Alb，和第二多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC；或
- 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-CH3-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRBV1-任选的接头-CH3-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或
- 5 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-CH1-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRBV1-任选的接头-CL-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或
- 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VHH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；
- 10 所述抗体是抗体 Fab，并且其中第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-CL-接头-VH1-CH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；
- 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1，第二多肽链：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；
- 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1，第二多肽链：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；
- 15 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1，第二多肽链：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。
- 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1，第二多肽链：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；
- 20 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，第二多肽链：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC；
- 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，第二多肽链：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC；
- 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，第二多肽链：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC；
- 25 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，第二多肽链：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC。
26. 根据实施方案 5-8 和 14-24 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链；其中：
- 30 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。
27. 根据实施方案 9-12 和 14-24 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链；其中：
- 35 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL2-接头-VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；或
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL2-接头-TRBV1-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH2-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；或
- 40 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH2-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。
28. 根据实施方案 13-24 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链；其中：
- 45 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL2-接头-VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。
29. 根据实施方案 1-28 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中
- 50 所述 VH1 和 VL1 包含至少一个半胱氨酸突变以在 VH1 和 VL1 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：VH1 的第 44 位和 VL1 的第 100 位；和/或
- 所述 VH2 和 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 VH2 和 VL2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：VH2 的第 44 位和 VL2 的第 100 位；和/或

所述 TRAV1 和 VL1 或 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRAV1 和 VL1 或 VL2 之间形成二硫键, 优选地, 所述半胱氨酸突变在以下位置处: TRAV1 的第 104 位和 VL1 或 VL2 的第 80 位; 和/或

5 所述 TRAV2 和 VL1 或 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRAV2 和 VL1 或 VL2 之间形成二硫键, 优选地, 所述半胱氨酸突变在以下位置处: TRAV2 的第 104 位和 VL1 或 VL2 的第 80 位; 和/或

所述 TRBV1 和 VL1 或 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRBV1 和 VL1 或 VL2 之间形成二硫键, 优选地, 所述半胱氨酸突变在以下位置处: TRBV1 的第 84 位和 VL1 或 VL2 的第 80 位; 和/或

10 所述 TRBV2 和 VL1 或 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRBV2 和 VL1 或 VL2 之间形成二硫键, 优选地, 所述半胱氨酸突变在以下位置处: TRBV2 的第 84 位和 VL1 或 VL2 的第 80 位; 和/或

所述 TRAV1 和 VH1 或 VH2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRAV1 和 VH1 或 VH2 之间形成二硫键, 优选地, 所述半胱氨酸突变在以下位置处: TRAV1 的第 104 位和 VH1 或 VH2 的第 89 位; 和/或

15 所述 TRAV2 和 VH1 或 VH2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRAV2 和 VH1 或 VH2 之间形成二硫键, 优选地, 所述半胱氨酸突变在以下位置处: TRAV2 的第 104 位和 VH1 或 VH2 的第 89 位。

30. 根据实施方案 1-29 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述多肽分子还包含能够增强其亲和力或生物学活性、增强其稳定性、延长其半衰期、降低其免疫原性或减少其翻译后修饰的一个或多个氨基酸突变、插入或缺失; 例如, 所述氨基酸突变包括能够增强对 FcRn 的结合的突变和/或效应子功能沉默突变。

20 31. 根据实施方案 1-30 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述多肽分子中的接头各自独立地选自自由 1-35 个氨基酸组成的接头;

优选地, 所述接头各自独立地选自 S、GS、GGGS、GGGGS、GGGSGGGG、GGSGGS、GGSGGSGGS、GGGGSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS、GQPKAAP、TVLRT、TVSSAS、GGEGG、GSEGGGS、RTSGPGDGGKGGPGKGGPGGEGTKGTGPGG、GKGGPGGEGTKGTGPGG、TVLSSAS、EDLKN 或其变体、EDLNK 或其变体和 ANIQK 或其变体, 或其任意组合;

优选地, EDLKN 的变体为 EDLKN 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列; 和/或 EDLNK 的变体为 EDLNK 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列; 和/或 ANIQK 的变体为 ANIQK 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列。

30 32. 根据实施方案 1-31 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述多肽分子中的接头各自独立地选自自由不超过 15 个氨基酸组成的接头;

优选地, 所述接头各自独立地选自 S、GS、GGGS、GGGGS、GGGSGGGG、GGSGGS、GGSGGSGGS、GGGGSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGGS、EDLKN 或其变体、EDLNK 或其变体和 ANIQK 或其变体;

35 优选地, EDLKN 的变体为 EDLKN 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列; 和/或 EDLNK 的变体为 EDLNK 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列; 和/或 ANIQK 的变体为 ANIQK 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列。

33. 根据实施方案 1-32 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述多肽分子在一条或多条多肽链的 N 端还包含信号肽序列, 优选在每一条链的 N 端包含信号肽序列, 例如衍生自白蛋白或免疫球蛋白的信号肽序列, 优选 MGWSLILLFLVAVATRVHS。

40 34. 根据权利要 1-33 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的 TAA: 黑色素瘤相关抗原 (例如 gp100、MAGEA1、MAGEA3、MAGEA6、MAGEA4、MAGEA2、MAGEA12、MAGEA2B、MAGEA9B、MAGEA10、MAGEA11、MAGEB2、MAGEC1、MAGEC2)、IGF2BP1、GNGT1、PI4K2B、CCR8、NPSR1、COX7B2、ONECUT3、SMC1B、FOXI3、GAGE2A、FBXO43、BRDT、PAGE2、GAGE13、POU5F1B、CTAG1A 和内源性逆转录酶抗原; 或者

其中所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的 TSA: KRAS 抗原 (例如, KRAS G12 突变抗原)、TP53、PIK3CA、CTNNB1、EGFR、BRAF 和 GNAS; 或者

50 其中所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的病毒抗原: HPV 抗原 (例如 HPV E6 或 E7 抗原)、CMV 抗原、HBV 抗原、EBV 抗原、疱疹病毒抗原、人类免疫缺陷病毒 (HIV) 抗原、流感病毒抗原和冠状病毒抗原; 或者

所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的自身抗原: AFP、CEA、CD19、CD20、BCMA、CD22、CD30、SLAMF6、CLDN18.2、GD2、间皮素、CD38、Her2、GPC3、MUC1、Ro52、

Ro60、La、Jo-1、SRP、IFIH1、CENPA、CENPB、SNRPA1、SNRNP70、SNR-PD3、RNAP3、TOPO1、Insulin、GAD65、IA2、Znt8、PL7、TARS、ARS、MI2、拓扑异构酶 1、EXOSC9、EXOSC107、POLR3A、POLR3K、PTRN、GAD2、SLC30A8、AChR、MUSK、LRP4、PLA2R、THSD7A、TSHR、IFN- γ 、CHRNA1、MUSK、LRP4、AQP4、MOG、GRIN1、COL4A3、PLA2R、GM-SCF、PR3 和 MPO。

35. 根据实施方案 1-34 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述第二抗原和所述第四抗原各自独立地选自 CD3 (例如 CD3 γ 、CD3 δ 和 CD3 ϵ 链)、CD4、CD8、CD10、CD11b、CD11c、CD14、CD16、CD18、CD25、CD32a、CD32b、CD41、CD41b、CD42a、CD42b、CD44、CD45RA、CD49、CD61、CD64、CD68、CD94、CD90、CD117、Nkp46、NKG2D、Fc ϵ RI、TCR α/β 、TCR γ/δ 、HLA-DR、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、ICOS(CD278)、2B4 (CD244)、HVEM、LAG3、DAP10、DAP12、CD27、CD40、GITR、LFA-1、MyD88、CD2、CD7、LIGHT、B7-H3、CTLA-4、PD-1、PD-L1、CD80、BTLA、TIM3、TIGIT 和 LAG-3。

36. 根据实施方案 1-35 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地选自黑色素瘤相关抗原 (例如 gp100、MAGEA1)、KRAS 抗原 (例如，KRAS G12 突变抗原) 和 HPV 抗原 (例如 HPV E7 抗原)，和/或所述第二抗原和所述第四抗原各自独立地选自 CD3、CD28、4-1BB(CD137)、PD-1 和 PD-L1。

37. 核酸，其包含编码实施方案 1-36 中任一项所述的多特异性多肽分子的每一条链的核苷酸序列。

38. 载体，其包含实施方案 37 所述的核酸。

39. 载体系统，其在一个或多个载体上包含编码实施方案 1-36 中任一项所述的多特异性多肽分子的每一条链的核苷酸序列。

40. 宿主细胞，其包含实施方案 37 所述的核酸、实施方案 38 所述的载体或实施方案 39 所述的载体系统。

41. 缀合物，其包含实施方案 1-36 中任一项所述的多特异性多肽分子，以及与所述多特异性多肽分子缀合的化学部分。

42. 根据实施方案 41 所述的缀合物，其中所述化学部分选自治疗剂、免疫刺激分子和可检测标记；

优选地，所述治疗剂选自免疫调节剂、激动剂、放射性化合物、酶、化学治疗剂和毒素。

优选地，所述免疫刺激分子选自细胞因子、趋化因子、血小板因子和补体启动剂；

优选地，所述可检测标记选自生物素、链霉抗生物素蛋白、酶或其催化活性片段、放射性核素、纳米颗粒、顺磁性金属离子、核酸探针、造影剂、和荧光、磷光或化学发光分子。

43. 药物组合物，其包含实施方案 1-36 中任一项所述的多特异性多肽分子、实施方案 37 所述的核酸、实施方案 38 所述的载体、实施方案 39 所述的载体系统、实施方案 40 所述的宿主细胞、实施方案 41 或 42 所述的缀合物，以及药学上可接受的赋形剂。

44. 根据实施方案 43 所述的药物组合物，其中所述药物组合物还包含第二治疗剂，优选地，所述第二治疗剂选自抗体、化疗剂和小分子药物。

45. 预防或治疗受试者的疾病的方法，其包括向所述受试者施用有效量的实施方案 1-36 中任一项所述的多特异性多肽分子、实施方案 37 所述的核酸、实施方案 38 所述的载体、实施方案 39 所述的载体系统、实施方案 40 所述的宿主细胞、实施方案 41 或 42 所述的缀合物、或实施方案 43 或 44 所述的药物组合物，其中所述疾病选自癌症、感染性疾病、自身免疫病和炎症疾病。

46. 根据实施方案 45 所述的方法，其还包括向所述受试者施用第二治疗剂，优选地，所述第二治疗剂选自抗体、化疗剂和小分子药物。

附图说明

图1显示了本发明的format 62的一种具体形式的结构示意图。

图2显示了本发明的format 58-2的一种具体形式的结构示意图。

图3显示了本发明的format 72的一种具体形式的结构示意图。

图4显示了本发明的format 50-2的一种具体形式的结构示意图。

图5显示了本发明的format 62-1的一种具体形式的结构示意图。

图6显示了本发明的format 62-2的一种具体形式的结构示意图。

图7显示了本发明的format 62-3的一种具体形式的结构示意图。

图8显示了本发明的format 62-4的一种具体形式的结构示意图。

图9显示了本发明的format 62-5的一种具体形式的结构示意图。

图10显示了本发明的format 62-6的一种具体形式的结构示意图。
图11显示了本发明的format 62-7的一种具体形式的结构示意图。
图12显示了本发明的format 62-8的一种具体形式的结构示意图。
图13显示了本发明的format 62-9的一种具体形式的结构示意图。
图14显示了本发明的format 62-11的一种具体形式的结构示意图。
图15显示了本发明的format 62-12的一种具体形式的结构示意图。
图16显示了本发明的format 62-13的一种具体形式的结构示意图。
图17显示了本发明的format 72-1的一种具体形式的结构示意图。
图18显示了本发明的format 72-2的一种具体形式的结构示意图。
图19显示了本发明的format 72-3的一种具体形式的结构示意图。
图20显示了本发明的format 59的一种具体形式的结构示意图。
图21显示了本发明的format 22-3的一种具体形式的结构示意图。
图22显示了本发明的format 22-4的一种具体形式的结构示意图。
图23显示了对照format 14的一种具体形式的结构示意图。
图24显示了对照format 14-1的一种具体形式的结构示意图。
图25显示了对照format 14-2的一种具体形式的结构示意图。
图26A显示了以gp100作为靶肽时本发明的format 62、62-LJH1、62-LJH2、62-LJH3、62-LM1、62-LM2、62-LM3的ELISPOT测定结果图。
图26B显示了以gp100作为靶肽时本发明的format 62、62-1、62-2、62-3、62-5、62-6、62-7、62-8的ELISPOT测定结果图。
图26C显示了以gp100作为靶肽时本发明的format 72的ELISPOT测定结果图。
图26D显示了以gp100作为靶肽时本发明的format 59的ELISPOT测定结果图。
图26E显示了以gp100作为靶肽时本发明的format 22-4的ELISPOT测定结果图。
图26F显示了以gp100作为靶肽时对照format 14（KIMMTRAK）、14-1、14-2的ELISPOT测定结果图。
图27显示了通过SEC测量的本发明的format 62在4°C、25°C和40°C下储存15天后的单体和聚体含量及纯度。

具体实施方式

通过下面的具体实施例进一步阐述本发明。应当理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。以下实施例中未注明具体条件的实验方法，通过按照本领域的常规条件，例如，Sambrook和Russell等人，分子克隆：实验室手册（第三版）（2001），CSHL出版社中所述的条件，或按照制造商所建议的条件。除非另有说明，否则以下实施例中所用的实验材料和试剂均可商购获得。

以下实施例所述涉及的format中使用的组件的氨基酸序列如下所示：

TRAV
>gp100 特异性 TCR 的 TRAV
SQQGEEDPQALSIQEGENATMNCYSYKTSINNQLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRVTL
DTSKKSSSLLITASRAADTASYFCATDGTGTPMQFGKGTRLSVI (SEQ ID NO:91)
>gp100 特异性 TCR 的 TRAV，包含 A104C 突变
SQQGEEDPQALSIQEGENATMNCYSYKTSINNQLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRVTL
DTSKKSSSLLITASRACDTASYFCATDGTGTPMQFGKGTRLSVI (SEQ ID NO:93)
>MAGE-A1 特异性 TCR 的 TRAV
RGEDVEQSLFSLVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTV
LLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAGSGGGTDKLIFGTGTRLQVFPN (SEQ ID NO: 41)
> MAGE-A1 特异性 TCR 的 TRAV
RGEDVEQSLFSLVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYTWPMDMKQDQRLT
VLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAGSGGGTDKLIFGTGTRLQVFPN (SEQ ID NO: 107)
> HPV E7 特异性 TCR 的 TRAV
RKEVEQDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQ
LNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCAVISAGTALIFGKGTTLSVSS (SEQ ID NO:49)
>KRAS G12V 特异性 TCR（KVA11-N01）的 TRAV
AQSVTQPDIIHITVSEGALELRNYSYGATPYLFWYVQSPGQGLQLLLKYFSGDTLVQGIKGFEA

- EFKRSQSSFNLRKPSVHWSDAAEYFCAVGVPGGYNKLIFGAGTRLAVHP (SEQ ID NO:57)
>KRAS G12V 特异性 TCR (KVA11-N02) 的 TRAV
AQSVAPQEDQVNVAEGNPLTVKCTYSVSGNPYLFWYVQYPNRGLQFLLKYITGDNLVKGSYGF
EAEFNKSQTSFHLKKPSALVSDSALYFCAVRDIEGAGNNRKLWGLGTSLAVNP (SEQ ID NO:65)
- 5 >KRAS G12V 特异性 TCR (KVA11-N04) 的 TRAV
GESVGLHPLTLGVQEGDNSIINCAYSNSASDYFIWYKQESGKGPQFIIDIRSNMDKRQGGQRVTVL
LNKTVKHLSLQIAATQPGDSAVYFCAENSDGTSYGKLTFGQGTLTVHP (SEQ ID NO:73)
>KRAS G12D 特异性 TCR (KDA11-N01) 的 TRAV
QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQL
- 10 NKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCVNLGAAGNKLTFGGGTRVLVKP (SEQ ID NO:81)
>KRAS G12D 特异性 TCR (KDA11-N02) 的 TRAV
RKEVEQDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGNGEDGRFTAQ
LNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVTNARLMFGDGTQLVVKP (SEQ ID NO:89)
- 15 **TRAC**
>TRAC 包含 T48C、N113K、FFSPRESS 缺失突变
NIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAV
AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT (SEQ ID NO: 8)
>TRAC 包含 T48C、N113K、PESS 缺失突变
- 20 NIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAV
AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT**FFPS** (SEQ ID NO: 9)
>TRAC 包含 T48C、N113K 突变
NIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAV
AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT**FFPSPESS** (SEQ ID NO: 10)
- 25 **TRBV**
>gp100 特异性 TCR 的 TRBV
DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWAQGDFQKGDIAE
GYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWGAPYEQYFGPGTRTLTVT (SEQ ID NO:92)
- 30 >gp100 特异性 TCR 的 TRBV, 包含 N84C 突变
DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWAQGDFQKGDIAE
GYSVSREKKESFPLTVTSAQKCPTAFYLCASSWGAPYEQYFGPGTRTLTVT (SEQ ID NO:94)
>MAGE-A1 特异性 TCR 的 TRBV
GAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSDYQTCVTYEQGVE
- 35 KDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSAREPGQGPFQYFGPGTRTLTVTE (SEQ ID NO: 42)
>MAGE-A1 特异性 TCR 的 TRBV
GAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNESKATYEQGVE
KDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSAREPGQPYEQYFGPGTRTLTVTE (SEQ ID NO: 108)
>HPV E7 特异性 TCR 的 TRBV
- 40 DAGVTQSPHLLIKTRGQQVTLRCSPKSGHDTVSWYQQALGQGPFQIFQYEEEEERQRGNFPDRF
SGHQFPNYSSELNVNALLGDSALYLCASSLGWRGGLYTEAFFGQGTTLTVV (SEQ ID NO:50)
>KRAS G12V 特异性 TCR (KVA11-N01) 的 TRBV
GAGVSQSPRYKVAKRQDVALRCDPISGHVSLFWYQQALGQGPFELTYFQNEAQLDKSGLPSD
RFFAERPEGSVSTLKIQRQQEDSAVYLCASSLDRGNTIYFGECSWLTVV (SEQ ID NO:58)
- 45 >KRAS G12V 特异性 TCR (KVA11-N02) 的 TRBV
DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNPIDDSGMPEDR
FSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSEGFYTEAFFGQGTTLTVV (SEQ ID NO:66)
>KRAS G12V 特异性 TCR (KVA11-N04) 的 TRBV
EAGVAQSPRYKIIKQRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNGVVDSDQLPKDR
- 50 FSAERLKGVDSTLKIQAILEDASVYLCASSLVGSPDYEQYFGPGTRTLTVT (SEQ ID NO:74)
>KRAS G12D 特异性 TCR (KDA11-N01) 的 TRBV
EAGVAQSPRYKIIKQRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNGVVDSDQLPKDR
FSAERLKGVDSTLKIQAILEDASVYLCASSFSDSYNSPLHFGNGTRTLTVT (SEQ ID NO:82)

>KRAS G12D 特异性 TCR (KDA11-N02) 的 TRBV
EAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPE
GYKVS RKEKRNFLILESPSPNQTSLYFCASTSIVSSGRGEQFFGPGTRLTVL (SEQ ID NO:90)

5 **TRBC**

>TRBC2, 包含 S57C、C187A、N210D 突变
EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLK
EQPALNDSRYALSSRLRVSAFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVQTIVSAEAWGRAD
(SEQ ID NO: 11)

10 >TRBC2, 包含 S57C、C187A、N210D、FG 环缺失突变
EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLK
EQPALNDSRYALSSRLRVSAFWQDPRNHFRCQVQFQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO: 12)

>TRBC1, 包含 S57C、C187A、N210D 突变
EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLK
15 EQPALNDSRYALSSRLRVSAFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVQTIVSAEAWGRAD
(SEQ ID NO: 13)

>TRBC1, 包含 S57C、C187A、N210D、FG 环缺失突变
EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLK
EQPALNDSRYALSSRLRVSAFWQDPRNHFRCQVQFQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO: 14)

20

VH

>VH1(抗 CD3 抗体 huUCHT1, 包含 G44C 突变)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYTMNWVRQAPGKCLEWVALINPYKGVSTYNQK
FKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWYFDVWGQGTLLTVSS (SEQ ID
25 NO: 95)

>VH1(抗 CD3 抗体 huUCHT1, 包含 G44C、E89C 突变)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYTMNWVRQAPGKCLEWVALINPYKGVSTYNQK
FKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRACDTAVYYCARSGYYGDSWYFDVWGQGTLLTVSS (SEQ ID
NO: 96)

30 >VH2(抗 CD28 抗体, 包含 C50Y 突变)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGYIYPGNVNTNYNEK
FKDRATLTVDTISISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:
97)

>VH2(抗 CD28 抗体, 包含 C50Y、D89C 突变)
35 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGYIYPGNVNTNYNEK
FKDRATLTVDTISISTAYMELSRLRSCDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:
98)

>VH-BB1(抗 4-1BB 抗体, 单价)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADS
40 VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD AQRNSMREFDYWGQGTLLTVTVSS (SEQ ID
NO: 99)

>VH-BB2(抗 4-1BB 抗体, 双价)
EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCTASGFS LNDYWMSWVRQAPGKGLEWVG YIDVGGS LYAAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGTLLTVTVSS (SEQ ID NO: 100)

45

VL

>VL1(抗 CD3 抗体 huUCHT1, 包含 E100C 突变)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGS
GSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQGNTLPWTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO: 101)

50 >VL1(抗 CD3 抗体 huUCHT1, 包含 E80C、E100C 突变)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGS
GSGTDYTLTISSLPQCFATYYCQQGNTLPWTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO: 102)

>VL2(抗 CD28 抗体)

- DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSG
SGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQGQTYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 103)
>VL2(抗 CD28 抗体, 包含 E80C 突变)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSG
5 SGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQGQTYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 104)
>VL-BB1(抗 4-1BB 抗体, 单价)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVDRFSGS
KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 105)
>VL- BB2(抗 4-1BB 抗体, 双价)
10 DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASEDISSYLAWYQQKPGKAPKRLIYGASDLASGVPSRFSAS
GSGTDYFTITSSLPEDIATYYCHYYATISGLGVAFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 106)
- Hinge-CH2-CH3**
Hinge-CH2-CH3 A1B1C2-2 (FC0)
15 >Hinge-CH2-CH3 Hole, KiH-dS PVA-AAS N297Q T366S-L368A-Y407V Y349C
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQ
VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 109)
20 >Hinge-CH2-CH3 Knob, KiH-dS PVA-AAS N297Q T366W S354C
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 110)
25 Hinge-CH2-CH3 A1B2C2-2 (FC1)
>Hinge-CH2-CH3 Hole, KiH-dS PVA-GSS N297Q T366S-L368A-Y407V Y349C
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
30 VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 111)
>Hinge-CH2-CH3 Knob, KiH-dS PVA-GSS N297Q T366W S354C
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
35 VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 112)
- Hinge-CH2-CH3 A1B2C1 (FC2)
>Hinge-CH2-CH3 Hole, KiH-dS PVA-GSS T366S-L368A-Y407V Y349C
40 EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 113)
>Hinge-CH2-CH3 Knob, KiH-dS PVA-GSS T366W S354C
45 EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 114)
50 Hinge-CH2-CH3 A3B2C1 (FC3)
>Hinge-CH2-CH3, KiH-dS PVA-GSS
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ

- VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 115)
>Hinge-CH2-CH3 , KiH-dS PVA-GSS
5 EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 116)
- 10 Hinge-CH2-CH3 A4-1B2C1 (FC4)
>Hinge-CH2-CH3 FcK/O, KiH-dS PVA-GSS D356K D399K
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 117)
- 15 >Hinge-CH2-CH3 FcK/O, KiH-dS PVA-GSS K392D K409D
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 118)
- 20 Hinge-CH2-CH3 A4-2B2C1 (FC5)
>Hinge-CH2-CH3 FcK/O, KiH-dS PVA-GSS PPV-KKK
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
25 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTKKKLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 119)
- >Hinge-CH2-CH3 FcK/O , KiH-dS PVA-GSS TPP-DDD
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
30 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTDDVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 120)
- CH3**
>CH3 Hole (包含 T366S、L368A 和 Y407V 白突变以及 Y349C 突变)
35 GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 6)
- >CH3 Knob(包含 T366W 杆突变和 S354C 突变)
GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
40 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 7)
- CL**
>CL
RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDS
TYSMSSTLTCLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO: 15)
- 45 >CL(包含 NEC 缺失突变)
RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDS
TYSMSSTLTCLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO: 16)
- CHI**
>CHI
50 AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL
SSVTVPSPPRSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC (SEQ ID NO: 17)
- >CHI (包含 VPRDC 缺失突变)

AKTTTPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS
SSVTVPPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKI (SEQ ID NO: 18)

Alb

5 DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHD
NEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT ECCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQ
RLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLV TDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAK
10 YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPAD LPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM
FLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF
QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCV
LHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV
ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLV AASQAALGL (SEQ ID NO: 2)

15 **接头**

S (SEQ ID NO: 19)

GS (LM3, SEQ ID NO: 20)

GGGGS (第三接头、第四接头、第五接头、第六接头、第八接头、第十接头、第十四接头,
SEQ ID NO: 22)

20 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 28)

GGGGSGGGGSGGGGS (第二接头、第七接头、第九接头、第十一接头、LM2, SEQ ID NO:
27)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 29)

GGGGSGGGGS (第一接头, SEQ ID NO: 26)

25 GSGSGGS (LM1, SEQ ID NO: 24)

GGSGSGGS (SEQ ID NO: 25)

GQPKAAP (SEQ ID NO: 30)

GGGSGGGG (十二接头、第十三接头, SEQ ID NO: 23)

RTSGPGDGGKGGPGKGPGE GTKGTGPGG (SEQ ID NO: 35)

30 GGEGGSGEGGS (SEQ ID NO: 121)

TVLRT (SEQ ID NO: 31)

TVSSAS (SEQ ID NO: 32)

GGEGG (SEQ ID NO: 33)

GSEGGGS (SEQ ID NO: 34)

35 GKGPGE GTKGTGPGG (SEQ ID NO: 36)

TVLSSAS (SEQ ID NO: 37)

EDL (SEQ ID NO: 122)

ANI (SEQ ID NO: 123)

40 **实施例 1 基于 TCR 的多特异性多肽分子的构建**

1.1 靶向 gp100 的多特异性多肽分子的构建

设计并构建了基于 gp100 TCR 的多特异性多肽分子 format, 这些 format 的结构如图 1-25 所示。
示例性的 format 包含:

第一多肽链: TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-铰链区-CH2-CH3 Knob, 和第二多肽

45 链: TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3 Hole (format 62); 或

第一多肽链: TRAV1-TRAC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-铰链区-CH2-CH3 Knob, 和第二多肽

链: TRBV1-TRBC-铰链区-CH2-CH3 Hole (format 62-LJH1); 或

第一多肽链: TRBV1-TRBC-第一接头-VH1-第二接头-VL1-铰链区-CH2-CH3 Knob, 和第二多肽

链: TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3 Hole (format 62-LJH2); 或

50 第一多肽链: TRAV1-TRAC-第一接头-VH1-第二接头-VL1-铰链区-CH2-CH3 Knob, 并且第二多

肽链: TRBV1-TRBC-接头-铰链区-CH2-CH3 Hole (format 62-LJH3)。

用于对比的 Format 包含:

第一多肽链：VL1-第二接头-VH1-第一接头-TRBV1-TRBC；和第二多肽链：TRAV1-TRAC；
(format 14, 也称为 KIMMTRAK)；

第一多肽链：VL1-第二接头-VH1-第一接头-TRBV1-TRBC-铰链区-CH2-CH3 Knob；和第二多肽链：TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3 Hole；(format 14-1)；

5 第一多肽链：VL1-第二接头-VH1-第一接头-TRBV1-TRBC；和第二多肽链：TRAV1-TRAC-第十四接头-Alb；(format 14-2)；

第一多肽链：TRAV1-第十二接头-VH1-铰链区-CH2-CH3 Knob；和第二多肽链：VL1-第十三接头-TRBV1-铰链区-CH2-CH3 Hole；(format 17)。

10 在这些 format 中，TRAV1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:91 所示，TRBV1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:92 所示，TRAC 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示，TRBC 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示，VH1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:95 所示，VL1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:101 所示，铰链区-CH2-CH3 Hole 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:109 所示，铰链区-CH2-CH3 Knob 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:110 所示，Alb 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

15 在这些 format 的每一条多肽链的 N 端添加信号肽序列 MGWSLILLFLVAVATRVHS (SEQ ID NO: 164)以增加多肽分子的分泌，并在 format 的任一条链的 C 端添加 His6 标签以用于纯化。本实施例中的 format 能够结合 gp100 抗原表位 YLEPGPVTA (SEQ ID NO: 165)或其突变形式 (YLEPGPVTV, SEQ ID NO: 166) 与 HLA-A*02 的复合物。

20 1.2 本发明的多特异性多肽分子对不同 TCR 的兼容性

1.2.1 靶向 MAGEA1 的多特异性多肽分子的构建

如实施例 1.1 所述构建靶向 MAGEA1 的多特异性多肽分子 format，其 format 的结构与实施例 1.1 的 format 的区别仅在于用 MAGEA1 特异性 TCR 的 TRAV1 和 TRBV1 替换实施例 1.1 中的 gp100 特异性 TCR 的 TRAV1 和 TRBV1。

25 MAGEA1 特异性 TCR 的 TRAV 和 TRBV 的氨基酸序列信息如下：

A1A2-WT：包含如 SEQ ID NO: 41 所示的 TRAV1 和如 SEQ ID NO: 42 所示的 TRBV1。

1.2.2 靶向 KRAS 的多特异性多肽分子的构建

30 如实施例 1.1 所述构建靶向 KRAS 的多特异性多肽分子 format，其 format 的结构与实施例 1.1 的 format 的区别仅在于用 KRAS 特异性 TCR 的 TRAV1 和 TRBV1 替换实施例 1.1 中的 gp100 特异性 TCR 的 TRAV1 和 TRBV1。

KRAS 特异性 TCR 的 TRAV 和 TRBV 的氨基酸序列信息如下：

KVA11-N01：包含如 SEQ ID NO: 57 所示的 TRAV1 和如 SEQ ID NO: 58 所示的 TRBV1；

KVA11-N02：包含如 SEQ ID NO: 65 所示的 TRAV1 和如 SEQ ID NO: 66 所示的 TRBV1；

KVA11-N04：包含如 SEQ ID NO: 73 所示的 TRAV1 和如 SEQ ID NO: 74 所示的 TRBV1；

35 KDA11-N01：包含如 SEQ ID NO: 81 所示的 TRAV1 和如 SEQ ID NO: 82 所示的 TRBV1；

KDA11-N02：包含如 SEQ ID NO: 89 所示的 TRAV1 和如 SEQ ID NO: 90 所示的 TRBV1。

1.2.3 靶向 HPV E7 的多特异性多肽分子的构建

40 如实施例 1.1 所述构建靶向 HPV E7 的多特异性多肽分子 format，其 format 的结构与实施例 1.1 的 format 的区别仅在于用 HPV E7 特异性 TCR (E7A2) 的 TRAV1 和 TRBV1 替换实施例 1.1 中的 gp100 特异性 TCR 的 TRAV1 和 TRBV1。

HPV E7 特异性 TCR 的 TRAV1 和 TRBV1 分别包含如 SEQ ID NO: 49 和 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列。

45 1.3 第一接头对本发明多特异性多肽分子的影响

如实施例 1.1 所述构建靶向 gp100 的多特异性多肽分子 format，其 format 的结构与实施例 1.1 的 format 62 相同，区别仅在于将第一接头分别替换为 LM1 (Format 62-LM1)、LM2 (Format 62-LM2)、LM3 (Format 62-LM3) 或去掉第一接头序列 (Format 59)：

50 Format 62-LM1：第一多肽链：TRBV1-TRBC- LM1-VL1-第二接头-VH1-铰链区-CH2-CH3 Knob，和第二多肽链：TRAV1- TRAC-铰链区-CH2-CH3 Hole；

Format 62-LM2：第一多肽链：TRBV1-TRBC- LM2-VL1-第二接头-VH1-铰链区-CH2-CH3 Knob，和第二多肽链：TRAV1- TRAC-铰链区-CH2-CH3 Hole；

Format 62-LM3:第一多肽链: TRBV1-TRBC- LM3-VL1-第二接头-VH1-铰链区-CH2-CH3 Knob, 和第二多肽链: TRAV1- TRAC-铰链区-CH2-CH3 Hole;

Format 59: 第一多肽链: TRBV1-TRBC, 第二多肽链: VL1-第二接头-VH1-铰链区-CH2-CH3 Knob, 和第三多肽链: TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3 Hole。

5

1.4 第二接头对本发明多特异性多肽分子的影响

如实施例 1.1 所述构建靶向 gp100 的多特异性多肽分子 format, 其 format 的结构与实施例 1.1 的 format 62 相同, 区别仅在于去掉第二接头以形成 Format 62-1:

10 第一多肽链: TRBV1-TRBC-第一接头-VL1, 第二多肽链: VH1-铰链区-CH2-CH3 Knob, 和第三多肽链: TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3 Hole。

1.5 铰链区对本发明多特异性多肽分子的影响

15 如实施例 1.1 所述构建靶向 gp100 的多特异性多肽分子 format, 其 format 的结构与实施例 1.1 的 format 62 相同, 区别仅在于将第一多肽链的铰链区替换为第三接头 (SEQ ID NO: 22), 第二多肽链的铰链区替换为第四接头 (SEQ ID NO: 22), 从而得到 format 62-3:

第一多肽链: TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-第三接头-CH2-CH3 Knob, 和第二多肽链: TRAV1- TRAC-第四接头-CH2-CH3 Hole。

1.6 功能结构域对本发明多特异性多肽分子的影响

20 如实施例 1.1 所述构建靶向 gp100 的多特异性多肽分子 format, 其 format 的结构与实施例 1.1 的 format 62 相同; 区别在于:

1) 第一多肽链和第二多肽链中的 CH2-CH3 结构域分别替换为 TRBC (SEQ ID NO: 11) 和 TRAC (SEQ ID NO: 8) 以形成 Format 62-5:

25 第一多肽链: TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-铰链区-TRBC, 和第二多肽链: TRAV1-TRAC-铰链区-TRAC;

2) 第一多肽链去掉 CH2-CH3 结构域, 第二多肽链将 CH2-CH3 结构域替换为 Alb 以形成 Format 62-6:

第一多肽链: TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-铰链区, 和第二多肽链: TRAV1- TRAC-铰链区-Alb;

30 3) 第一多肽链将铰链区-CH2-CH3 结构域替换为第五接头-Alb (第五接头的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示), 第二多肽链将铰链区-CH2-CH3 结构域去掉以形成 Format 62-7:

第一多肽链: TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-第五接头-Alb, 和第二多肽链: TRAV1- TRAC。

35

1.7 TRAC、TRBC 和铰链区对本发明多特异性多肽分子的影响

如实施例 1.1 所述构建靶向 gp100 的多特异性多肽分子 format, 其 format 的结构与实施例 1.1 的 format 62 相同, 区别在于: 将第一多肽链的铰链区替换为第三接头 (SEQ ID NO: 22); 将第二多肽链的铰链区替换为第四接头 (SEQ ID NO: 22); 并将 TRAC 和 TRBC 分别替换为 CH3 knob 和 CH3 Hole 以形成 format 62-8:

40 第一多肽链: TRBV1-CH3 Hole-第一接头-VL1-第二接头-VH1-第三接头-CH2-CH3 Knob, 和第二多肽链: TRAV1-CH3 Knob-第四接头-CH2-CH3 Hole。

1.8 不同 Hinge-CH2-CH3 对本发明多特异性多肽分子的影响

45 如实施例 1.2.1 所述构建靶向 MAGE-A1 的多特异性多肽分子 format, 其 format 的结构与实施例 1.2.1 的 format 62-LJH2 相同; 区别在于: 将 format 62-LJH2 中的 FC0 分别替换为 FC1、FC2、FC3、FC4、FC5。

1.9 TCR 在抗体上的连接方式对本发明多特异性多肽分子的影响

50 如实施例 1.1 所述构建靶向 gp100 的多特异性多肽分子 format, 不同的是本实施例的 format 抗体的 C 端连接在 TCR 的 N 端, 且 TCR 为 scTCR, 从而得到 Format 62-2:

第一多肽链: VH-第一接头-TRAV1-第十一接头-TRBV1-铰链区-CH2-CH3 Knob, 和第二多肽链: VL1-铰链区-CH2-CH3 Hole; 其中: 第十一接头为 SEQ ID NO: 27。

1.10 增加 TCR 价态对本发明多特异性多肽分子的影响

如实施例 1.1 所述构建靶向 gp100 的多特异性多肽分子 format，其 format 结构与实施例 1.1 的 format 62 的区别在于：在 format 62 的基础上增加了一对 TRAV 和 TRBV 的拷贝（称为 TRAV2 和 TRBV2），从而得到 format 58-2：

第一多肽链：TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第六接头-TRAV2-第七接头-TRBV-第八接头-VH1-铰链区-CH2-CH3 Knob，和第二多肽链：TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3 Hole；其中：

TRAV2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:91 所示，TRBV2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:92 所示；

第六接头为 SEQ ID NO: 22，第七接头为 SEQ ID NO: 27，第八接头为 SEQ ID NO: 22。

1.11 增加抗体价态对本发明多特异性多肽分子的影响

如实施例 1.1 所述构建靶向 gp100 的多特异性多肽分子 format，其 format 结构与实施例 1.1 的 format 62 的区别在于：在 format 62 的基础上增加了一对靶向 CD28 的 VH 和 VL（称为 VH2 和 VL2），从而得到 format 72：

第一多肽链：VL2-第九接头-VH2-第十接头-TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第二接头-VH1-铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3，其中：

VL2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 103 所示，VH2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 97 所示；

第九接头为 SEQ ID NO: 27，第十接头为 SEQ ID NO: 22。

1.12 增加 TCR 和抗体价态对本发明多特异性多肽分子的影响

如实施例 1.1 所述构建靶向 gp100 的多特异性多肽分子 format，其 format 结构与实施例 1.1 的 format 62 的区别在于：在 format 62 的基础上增加了一对 TRAV 和 TRBV 的拷贝（称为 TRAV2 和 TRBV2）和一对靶向 CD28 的 VH 和 VL（称为 VH2 和 VL2），从而得到 format 50-2：

第一多肽链：VL2-第九接头-VH2-第十接头-TRBV1-TRBC-第一接头-VL1-第六接头-TRAV2-第七接头-TRBV-第八接头-VH1-铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-TRAC-铰链区-CH2-CH3，其中：

TRAV2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:91 所示，TRBV2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:92 所示；

VL2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 103 所示，VH2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 97 所示；

第六接头为 SEQ ID NO: 22，第七接头为 SEQ ID NO: 27，第八接头为 SEQ ID NO: 22，第九接头为 SEQ ID NO: 27，第十接头为 SEQ ID NO: 22。

实施例 2 基于 TCR 的多特异性多肽分子的表达和纯化

1. 载体构建和质粒提取

将编码实施例 1 中的 format 的一条或多条多肽链的核苷酸序列直接克隆至表达载体 pTT5 中，获得的载体克隆经测序确认后扩增培养、质粒提取。

2. 转染

将 CHO 细胞密度调整为 1×10^6 个细胞/ml，每瓶细胞液体积为 40mL，然后旋紧瓶口放入摇床继续培养，在 36.5°C，175rpm，5%CO₂ 的条件下培养 2-4 小时后用质粒进行转染。配制转染液（1ml）：取约 800μL 的 150 mM 灭菌的 NaCl 溶液稀释 10μg DNA，混匀后在工作台放置 5min；向 DNA 稀释液中加入约 50μL 的转染试剂混匀，最终转染液的总体积为 1mL。在工作台放置 10min 后将转染液逐滴加入到细胞培养液中，摇匀后旋紧瓶口放回摇床（36.5°C，关闭 5%CO₂，175rpm）。转染 20-24h 后加入 SMS 293-I 加料液（0.7mL/瓶），以后隔天加料培养 6-10 天，然后收集培养上清液。

3. 纯化

用收集的培养上清液进行镍柱纯化。制备 1ml 压积镍柱，10ml 灭菌水冲洗，10ml 1XBind Buffer 进行平衡。将培养上清液在 3000rpm 下离心 5min，然后 450nm 氯气过滤，上样。上样完成后，用 10ml 1XBind Buffer 洗柱，10ml 1XBind Buffer 洗柱，10ml 1XWash Buffer 洗柱子（收集洗脱液 10 管，流速在 0.3-0.4ml/min 左右），1.2ml 1XElution Buffer 洗脱蛋白，收集洗脱液即为纯化蛋白，分装后-80 保存。

4. 蛋白染色和免疫印迹

将纯化的蛋白经变性（R）或未变性（NR）处理后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和考马斯亮蓝染色，以评估蛋白表达纯度及聚集程度。另一组平行样品经凝胶电泳后进行 western blot，用鼠抗 His6

作为一抗检测纯化蛋白的 His6 标签，以确认考马斯亮蓝染色的可靠性。结果表明，本发明提供的 format 可成功表达。

根据收获的目的蛋白产量预测目的蛋白的产量，根据 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色结果测定纯度。结果如下表 1-表 3 所示。

5 表 1. 用靶向不同抗原的 TCR 的 TRAV 和 TRBV 构建的 format 62 多肽分子的产量和纯度

		gp100	E7A2	A1A2-WT	KVA11-N01	KVA11-N02	KVA11-N04	KDA11-N01	KDA11-N02
产 量 (mg/L)	Format 62	23.5	60	36.5	--	--	--	214.5	--
	Format 14	105	3.45	3.2	--	--	--	4.05	--
纯 度 (%)	Format 62	83	68	78	65	56	73	71	68
	Format 14	77	17	46	--	13	27	17	6.6

表 1 的结果显示，本发明的 format 62 在装载不同的 TCR 可变区后，经一步亲和纯化即达到较高的纯度（均在 55%以上，最高达 83%），表明在不同批次间重复性良好；而对照 format 14 的纯度明显低于本发明的 format 62。另外，不同 TCR 可变区装载 format 62 后，正确组织的蛋白产量较高，个别 TCR 超水平表达，蛋白产量虽然存在批次间差异，但通过工艺优化的空间较大。这些结果表明，

10 本发明的 format 62 对不同 TCR 具有良好的兼容性。

表 2. 包含抗 gp100 TRAV1 和 TRBV1 的 Format 62 中通过链交换或第一接头的替换得到的不同 format 的产量和纯度

	Format 62-LJH1	Format 62-LJH2	Format 62-LJH3	Format 62-LM1	Format 62-LM2	Format 62-LM3
产量(mg/L)	66.3	80.8	82.8	91.8	92.3	95.8
纯度(%)	84	82	80	82	87	83

表 2 的结果显示，通过链交换或第一接头的替换得到的 format 的纯度均在 80%以上，特别是将第一接头替换为 LM2 的 Format 62-LM2 的纯度达到了 87%。这些结果表明 TRAV1-TRAC 和 TRBV1-TRBC 之间或 VH1 和 VL1 之间的链交换或连接 TRBC 和 VL1 的第一接头的改变不会对蛋白产量可纯度产生负面影响。

15

表 3. 包含抗 gp100 TRAV1 和 TRBV1 的 Format 62-1、62-3、62-6 和 62-8 的产量和纯度

	Format 62-1	Format 62-3	Format 62-6	Format 62-7	Format 62-8
产量(mg/L)	115	60	32.15	31.5	14.4
纯度(%)	80	76	65	42	47

表 3 的结果显示，这些在 format 62 基础上改造的 Format 62-1、62-3、62-6、62-7 和 62-8 在表达后均具有较高的产量和纯度。

20

实施例 3 ELISPOT 测定

用含 10%FBS 的 1640 完全培养基将本发明实施例 1 的 format 梯度稀释（ 10^{-7} 至 10^{-13} M）。将 gp100 多肽、KRAS 多肽、MAGE-A1 多肽、HPV E7 多肽分别加入 DMSO 中溶解，然后用水稀释至使用浓度 10^{-4} M。用 T2 细胞分别负载 10^{-6} M 的 gp100 多肽、KRAS 多肽、MAGE-A1 多肽、HPV E7 多肽。向 ELISPOT 板中加入含 10%FBS 的 1640 完全培养基，在室温下封闭 30min。弃去培养基，向板中加入 5×10^5 个细胞/mL 的 PBMC（100 μ L/孔）， 5×10^5 个细胞/mL 的负载多肽的 T2 细胞（100 μ L/孔），和不同浓度的 format（ 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} M）。阴性对照加入不负载多肽的 T2 细胞和 PBMC，候选多肽分子的浓度与实验组一致；阳性对照为 PBMC 加入 10 μ L 试剂盒自带的抗 CD3-2 的 mAb 作为阳性对照。加完所有样品后，盖好板盖，放在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 20-24 小时后通过 ELISPOT 检测来确定 IFN- γ 的分泌，以评估本发明的 format 通过靶抗原肽-MHC 复合物诱导的免疫细胞活化。

25

30

结果表明，本发明的 format 能够在有靶抗原的情况下激活免疫细胞。

以 gp100 作为靶肽时，本发明不同 format 的示例性结果如图 26A-26F 所示（附图标记“+”或“A1+”表示加入了 gp100 多肽的实验组，“-”或“A1-”表示没有加入 gp100 多肽的阴性对照组，“无关”或“Iso”表示加入了不相关多肽的对照组，“无靶”或“T-only”表示没有添加靶肽至含有 T 细胞的对照组）。

35

图 26A-26F 的结果显示，本发明的 format 在 10^{-7} - 10^{-11} M 浓度范围内能够实现对免疫细胞的有效激活，例如 format 62、62-LJH1、62-LJH2、62-LJH3、62-LM1、62-LM2 在 10^{-11} M 的低浓度下就能有效激活免疫细胞（图 26A），format 62-LM3、62-1、62-3、62-6、62-7、72、59 在 10^{-10} M 的低浓度下能够有效激活免疫细胞（图 26A、26B、26C、26D），format 62-5、62-8、72-1、72-2、72-3 在 10^{-9} M

的浓度下能够激活免疫细胞（图 26B、26C）；而对照 format 14 在 10^{-10} M 浓度下，对照 format 14-1 和 14-2 在 10^{-9} M 浓度下能够激活免疫细胞（图 26F），表明本发明的 format 对免疫细胞的激活效果与对照 format 相当或比对照 format 更好。

对于包含白蛋白作为功能结构域的本发明 format 62-6 和 62-7 而言，其有效激活免疫细胞的最低浓度为 10^{-10} M，而同样包含白蛋白的对照 format 14-2 有效激活免疫细胞的最低浓度为 10^{-9} M，这表明本发明的 format 骨架结构比对照 format 具有更优的活性。

实施例 4 理化性质

1. 热稳定性和胶体稳定性

为了评估本发明 format 的稳定性，将本发明的 format 样品纯化后置换于 PBS 缓冲液中，以 PBS 缓冲液作为对照。

利用差示扫描荧光法(Differential Scanning Fluorimetry, 简称 DSF), 测定本发明的基于 TCR 的多特异性多肽分子 Tm 值，升温速率通常设为 1°C/10s。通常 Tm 越高，结构热稳定性越好。

利用静态光散射（SLS）测定本发明的基于 TCR 的多特异性多肽分子的 Tagg 值，升温速率通常设为 1°C/10s。通常 Tagg 值反映蛋白胶体稳定性，通常 Tagg 越高，蛋白胶体热稳定性越好。

结果如表 4 所示。

表 4

样品	Tm值 (°C)	Tagg值 (°C)
gp100_B62	54.1	64.5
MAGE-A1_B62	56.3	76.5
KDA11-N01_B62	56.9	76.3
KVA11-N02_B62	48.6	64.6
E7A2_B62	55	76.2

2. 加速稳定性

为了评估评估本发明 format 的加速稳定性，使用尺寸排阻色谱（Size exclusion chromatography, SEC）来测量本发明基于 TCR 的多特异性多肽分子在 4°C、25°C 和 40°C 下保存 15 天后单体和聚体含量，从而计算样品纯度。

示例性结果如图 27 所示。结果显示，本发明的实施例 1.2.1 的靶向 MAGE-A1 的 format 62 在 4°C、25°C 和 40°C 下保存 15 天后纯度分别为 94.82%、94.98% 和 86.86%，表明本发明的 format 62 具有良好的加速稳定性。

实施例 5 半衰期测定

通过静脉推注向小鼠给药本发明的基于 TCR 的多特异性多肽分子，给药剂量为 0.1mg/kg 小鼠体重，并在给定时间段对血清样品进行采集。通过 ELISA 进行药物代谢动力学（PK）评估。具体地，将血清样品加入到连接有生物素化的 pHLA 复合物的链霉亲和素包被的板上，然后使用一抗（山羊抗 Fc）和二抗（HRP 缀合的抗山羊 IgG），最后通过在 450nm 处进行比色检测，进而确定本发明提供的 Format 的存在和结合活性。

实施例 6 体内抗肿瘤效力测定

利用靶细胞异种移植模型，在免疫缺陷小鼠中研究抗肿瘤效力。测定本发明的基于 TCR 的多特异性多肽分子对移植瘤的杀伤，以评估其体内抑瘤作用。本发明提供的基于 TCR 的多特异性多肽分子具有体内抗肿瘤效力。

本申请参考了各种发行的专利、公开的专利申请、期刊文章和其他出版物，将所有这些引入本申请作为参考。若任何引入的参考文献和本说明书有冲突，则以本说明书为准。此外，落入现有技术范围的本发明的任何具体实施方案可以明确地从任何一个或多个权利要求中排除。因为所述实施方案被认为是本领域技术人员已知的，它们可以被排除，即使所述排除没有在本申请中明确列出。本发明的任何具体实施方案可从任何权利要求中以任何理由排除，不管是否与现有技术存在有关。

虽然已经参考其特定实施方案描述本发明，本领域的技术人员应当理解可以进行各种改变且可以替换等同物而不脱离本发明的真正的精神和范围。另外，可作出许多修改以使特定的情况，材料，组合物，方法，方法步骤适于本发明的目的，精神和范围。所有这些修改都旨在权利要求的范围内。

权 利 要 求 书

1. 一种多特异性多肽分子，所述多特异性多肽分子包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区，
5 其中所述第一结合区包含来源于与所述第一抗原-MHC 复合物结合的 T 细胞受体(TCR)的 α 链可变区(TRA V1)和 β 链可变区(TRB V1)；
其中所述第二结合区包含来源于与所述第二抗原结合的抗体的重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1 或来源于与所述第二抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH1)；
10 其中所述第一抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原，且所述第二抗原为免疫细胞表面分子；
其中所述抗体的 N 端连接在所述 TCR 的 C 端；
其中所述多特异性多肽分子还包含以下至少一种功能结构域：
15 1) 源于抗体的铰链区；
2) 源于抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分；
3) 源于抗体的 CH3 结构域；
4) 白蛋白(Alb)或其结合部分；
5) 源于 TCR 的恒定区或其片段。
2. 根据权利要求 1 所述的多特异性多肽分子，其中 TRA V1 和 TRB V1 分布在不同的多肽链上；和
20 /或
所述 VH1 和 VL1 分布在一条多肽链上（例如形成 scFv1）；且所述 TRA V1 和 TRB V1 分布在不同多肽链上。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的多特异性多肽分子，其中所述多特异性多肽分子在两条多肽链上包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区；
25 优选的，TRA V1 和 TRB V1 分布在不同的多肽链上，所述 VHH1 或所述 VH1 和 VL1 分布在一条多肽链上（例如形成 scFv1）并连接在所述 TCR 的 C 端；或 TRA V1 和 TRB V1 分布在不同的多肽链上，所述 VH1 和 VL1 分布在不同的多肽链上，且所述 VH1 和 VL1 中的一个所在多肽链连接在所述 TRA V1 所在多肽链的 C 端，另一个所在多肽链连接在所述 TRB V1 所在多肽链的 C 端；
30 或者，
所述多特异性多肽分子在三条多肽链上包含结合第一抗原的第一结合区和结合第二抗原的第二结合区；
优选的，TRA V1 和 TRB V1 分布在不同的多肽链上，所述 VH1 和 VL1 分布在不同的多肽链上，VH1 或 VL1 所在多肽链连接在 TRB V1 或 TRA V1 所在多肽链的 C 端。
35
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述多特异性多肽分子的多肽链分别包含：
40 TRA V1-scFv1 和 TRA V1；或
TRA V1-scFv1 和 TRB V1；或
TRA V1-VHH1 和 TRA V1；或
TRA V1-VHH1 和 TRB V1；或
TRA V1-VL1 和 TRA V1-VH1；或
TRA V1-VL1 和 TRB V1-VH1；或
45 TRA V1-VL1-VH1 和 TRA V1；或
TRA V1-VH1-VL1 和 TRA V1；或
TRA V1-VH1-VL1 和 TRB V1；或
TRA V1-VL1，VH1，和 TRA V1；或
50 TRA V1-VH1，VL1，和 TRA V1；或
TRA V1-VL1，VH1，和 TRB V1；或
TRA V1-VH1，VL1，和 TRB V1。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述多特异性多肽分子还包含与第三抗原结合的第三结合区, 所述第三结合区包含来源于与所述第三抗原-MHC 复合物结合的 TCR 的 α 链可变区(TRA V2)和 β 链可变区(TRB V2); 其中所述第三抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、病毒抗原和自身抗原, 并且所述第三抗原与所述第一抗原相同或不同。
6. 根据权利要求 5 所述的多特异性多肽分子, 其中所述 TRA V2 与所述 TRA V1 相同, 和/或所述 TRB V2 与所述 TRB V1 相同。
7. 根据权利要求 5 或 6 所述的多特异性多肽分子, 其中所述 TRA V2 和所述 TRB V2 通过接头连接在同一条多肽链上, 并优选连接在 VH1 和 VL1 之间。
8. 根据权利要求 7 所述的多特异性多肽分子, 其中所述多特异性多肽分子包含两条多肽链, 所述两条多肽链分别包含:
- 15 TRA V1-VL1-TRA V2-TRB V2-VH1 和 TRA V1; 或
TRA V1-VL1-TRB V2-TRA V2-VH1 和 TRA V1; 或
TRA V1-VH1-TRB V2-TRA V2-VL1 和 TRA V1; 或
TRA V1-VH1-TRA V2-TRB V2-VL1 和 TRA V1; 或
TRA V1-VL1-TRB V2-TRA V2-VH1 和 TRB V1; 或
20 TRA V1-VL1-TRA V2-TRB V2-VH1 和 TRB V1; 或
TRA V1-VH1-TRA V2-TRB V2-VL1 和 TRB V1; 或
TRA V1-VH1-TRB V2-TRA V2-VL1 和 TRB V1。
9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述多特异性多肽分子还包含与第四抗原结合的第四结合区, 所述第四结合区包含来源于与所述第四抗原结合的抗体的重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2 或来源于与所述第四抗原结合的单域抗体或纳米抗体的单重链可变区(VHH2); 其中所述第四抗原为免疫细胞表面分子, 并且所述第四抗原与所述第二抗原相同或不同。
10. 根据权利要求 9 所述的多特异性多肽分子, 其中所述 VH2 与所述 VH1 相同, 和/或所述 VL2 与所述 VL1 相同, 和/或所述 VHH2 与所述 VHH1 相同。
11. 根据权利要求 9 或 10 所述的多特异性多肽分子, 其中所述 VHH2 或所述 VH2 和 VL2 串联在一条多肽链上(例如, 形成 scFv2 或 Fab2)连接在所述 TRA V1 或所述 TRB V1 的 N 端, 或者所述 VH2 和 VL2 中的一个连接在所述 TRA V1 的 N 端, 另一个连接在所述 TRB V1 的 N 端。
12. 根据权利要求 11 所述的多特异性多肽分子, 其中所述多特异性多肽分子包含两条多肽链, 所述两条多肽链分别包含:
- 35 scFv2-TRB V1-scFv1 和 TRA V1; 或
scFv2-TRA V1-scFv1 和 TRB V1; 或
scFv2-TRB V1-VHH1 和 TRA V1; 或
40 scFv2-TRA V1-VHH1 和 TRB V1; 或
scFv2-TRB V1-VL1 和 TRA V1-VH1; 或
scFv2-TRA V1-VL1 和 TRB V1-VH1; 或
TRB V1-scFv1 和 scFv2-TRA V1; 或
TRA V1-scFv1 和 scFv2-TRB V1; 或
45 TRB V1-VHH1 和 scFv2-TRA V1; 或
TRA V1-VHH1 和 scFv2-TRB V1; 或
TRB V1-VL1 和 scFv2-TRA V1-VH1; 或
TRA V1-VL1 和 scFv2-TRB V1-VH1; 或
VHH2-TRB V1-scFv1 和 TRA V1; 或
50 VHH2-TRA V1-scFv1 和 TRB V1; 或
VHH2-TRB V1-VHH1 和 TRA V1; 或
VHH2-TRA V1-VHH1 和 TRB V1; 或
VHH2-TRB V1-VL1 和 TRA V1-VH1; 或

VHH2-TRAV1-VL1 和 TRBV1-VH1; 或
TRBV1-scFv1 和 VHH2-TRAV1; 或
TRAV1-scFv1 和 VHH2-TRBV1; 或
5 TRBV1-VHH1 和 VHH2-TRAV1; 或
TRAV1-VHH1 和 VHH2-TRBV1; 或
TRBV1-VL1 和 VHH2-TRAV1-VH1; 或
TRAV1-VL1 和 VHH2-TRBV1-VH1; 或
VL2-TRBV1-scFv1 和 VH2-TRAV1; 或
10 VH2-TRBV1-scFv1 和 VL2-TRAV1; 或
VL2-TRAV1-scFv1 和 VH2-TRBV1; 或
VH2-TRAV1-scFv1 和 VL2-TRBV1; 或
VL2-TRBV1-VHH1 和 VH2-TRAV1; 或
VH2-TRBV1-VHH1 和 VL2-TRAV1; 或
15 VL2-TRAV1-VHH1 和 VH2-TRBV1; 或
VH2-TRAV1-VHH1 和 VL2-TRBV1; 或
VL2-TRBV1-VL1 和 VH2-TRAV1-VH1; 或
VH2-TRBV1-VL1 和 VL2-TRAV1-VH1; 或
VL2-TRAV1-VL1 和 VH2-TRBV1-VH1; 或
20 VH2-TRAV1-VL1 和 VL2-TRBV1-VH1。

13. 根据权利要求 11 所述的多特异性多肽分子, 其中所述多特异性多肽分子包含第一结合区、第二结合区、第三结合区和第四结合区, 并且所述多特异性多肽分子包含两条多肽链, 所述两条多肽链分别包含:

scFv2-TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 TRAV1; 或
25 scFv2-TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 TRAV1; 或
scFv2-TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 TRAV1; 或
scFv2-TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 TRAV1; 或
scFv2-TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 TRBV1; 或
30 scFv2-TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 TRBV1; 或
scFv2-TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 TRBV1; 或
scFv2-TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 TRBV1; 或
TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 scFv2-TRAV1; 或
TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 scFv2-TRAV1; 或
35 TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 scFv2-TRAV1; 或
TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 scFv2-TRAV1; 或
TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 scFv2-TRBV1; 或
TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 scFv2-TRBV1; 或
TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 scFv2-TRBV1; 或
40 VHH2-TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 TRAV1; 或
VHH2-TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 TRAV1; 或
VHH2-TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 TRAV1; 或
VHH2-TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 TRAV1; 或
VHH2-TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 TRBV1; 或
45 VHH2-TRAV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 TRBV1; 或
VHH2-TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 TRBV1; 或
VHH2-TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 TRBV1; 或
TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 VHH2-TRAV1; 或
50 TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 VHH2-TRAV1; 或
TRBV1-VH1-TRBV2- TRAV2-VL1 和 VHH2-TRAV1; 或
TRBV1-VH1-TRAV2- TRBV2-VL1 和 VHH2-TRAV1; 或
TRAV1-VL1-TRBV2- TRAV2-VH1 和 VHH2-TRBV1; 或
TRAV1-VL1-TRAV2- TRBV2-VH1 和 VHH2-TRBV1; 或

- TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 VHH2-TRBV1; 或
TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 VHH2-TRBV1; 或
VL2-TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 VH2-TRAV1; 或
VL2-TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 VH2-TRAV1; 或
VH2-TRBV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 VL2-TRAV1; 或
VH2-TRBV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 VL2-TRAV1; 或
VL2-TRBV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 VH2-TRAV1; 或
VL2-TRBV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 VH2-TRAV1; 或
VH2-TRBV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 VL2-TRAV1; 或
VH2-TRBV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 VL2-TRAV1; 或
VL2-TRAV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 VH2-TRBV1; 或
VL2-TRAV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 VH2-TRBV1; 或
VH2-TRAV1-VL1-TRBV2-TRAV2-VH1 和 VL2-TRBV1; 或
VH2-TRAV1-VL1-TRAV2-TRBV2-VH1 和 VL2-TRBV1; 或
VL2-TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 VH2-TRBV1; 或
VL2-TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 VH2-TRBV1; 或
VH2-TRAV1-VH1-TRAV2-TRBV2-VL1 和 VL2-TRBV1; 或
VH2-TRAV1-VH1-TRBV2-TRAV2-VL1 和 VL2-TRBV1。
- 14 根据权利要求 1-13 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述功能结构域来源于白蛋白或其结合部分和任选的抗体的铰链区; 并且所述功能结构域通过任选的接头连接在所述多特异性多肽分子的任一条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端。
15. 根据权利要求 14 所述的多特异性多肽分子, 其中所述白蛋白为血清白蛋白, 优选为人血清白蛋白; 和/或
所述抗体的铰链区为人源, 例如, 源自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的铰链结构域或其部分。
16. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述功能结构域来源于抗体的铰链区和/或抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分和/或抗体的 CH3 结构域; 并且所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接;
优选的, 所述功能结构域的两条链通过任选的接头分别连接在所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端, 优选 C 末端; 或
所述第一结合区和所述第二结合区通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。
17. 根据权利要求 16 所述的多特异性多肽分子, 其中所述抗体的铰链区为人源, 例如, 源自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的铰链结构域或其部分; 和/或
所述抗体的 Fc 结构域或其二聚化部分为人源, 例如, 源自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的 Fc 结构域或其部分。
18. 根据权利要求 16 或 17 所述的多特异性多肽分子, 其中所述抗体的铰链区包含至少一个能够降低或消除所述多特异性分子与 FcR 受体和/或 C1q 结合的氨基酸突变, 例如, 所述突变位点选自 233、234、235 和 236 的位置; 和/或
所述抗体的铰链区包含至少一个能够降低或消除铰链区和非铰链区之间形成二硫键的突变, 例如, 突变位点为 220; 和/或
所述 Fc 结构域中 CH2 结构域包含至少一个能够降低或消除所述多特异性分子与 FcR 受体和/或 C1q 结合的氨基酸突变; 例如, 所述突变位点选自 237、250、252、254、256、270、297、322、327、330 和 331 位置; 和/或
所述 Fc 结构域中 CH3 结构域包含至少一个能够降低或消除所述多特异性分子与 FcR 受体和/或 C1q 结合的氨基酸突变; 例如, 所述突变位点选自 428 和 434 位置;
所述 Fc 结构域中的 CH3 包含以下至少一种能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变:
a) 包含至少两个半胱氨酸残基突变以形成链间二硫键, 例如 354C 和 349C 或 242C 和 334C;
b) 包含能够使两个 CH3 形成杵臼结构的突变, 例如, 所述 CH3 各自独立地包含位于选自氨基酸

- 位置 366、368、405 和 407 的一个或更多个位置的突变，优选地，所述 CH3 中的一个包含 366W 突变且另一个包含 366S、368A 和 407V 突变；
- 5 c) 包含能够改变 CH3 区域相互作用界面的氨基酸的电荷性质以促进异源二聚体形成的突变，例如，两条 CH3 链的突变位点各自独立的选自 Y391、K392、T393、T394、P395、P396、V397、L398、D399、S400、Q347、V348、Y349、T350、S354、R355、E356、E357、F405、Y407 和 K409 中的至少一个。
- 10 19. 根据权利要求 16 或 17 所述的多特异性多肽分子，其中所述抗体的 CH3 结构域为人源，例如，源自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的 CH3 结构域；和/或
所述 CH3 结构域包含以下至少一种能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变：
a) 包含至少两个半胱氨酸残基突变以形成链间二硫键，例如 354C 和 349C 或 242C 和 334C；
b) 包含能够使两个 CH3 形成杵臼结构的突变，例如，所述 CH3 各自独立地包含位于选自氨基酸位置 366、368、405 和 407 的一个或更多个位置的突变，优选地，所述 CH3 中的一个包含 366W 突变且另一个包含 366S、368A 和 407V 突变；
15 c) 包含能够改变 CH3 区域相互作用界面的氨基酸的电荷性质以促进异源二聚体形成的突变，例如，两条 CH3 链的突变位点各自独立的选自 Y391、K392、T393、T394、P395、P396、V397、L398、D399、S400、Q347、V348、Y349、T350、S354、R355、D356、E357、K370、F405、Y407、K409 和 K439 中的至少一个。
- 20 20. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述功能结构域来源于 TCR 的恒定区或其片段和任选的抗体的铰链区；并且所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接；
优选的，所述功能结构域的两条链通过任选的接头分别连接在所述多特异性多肽分子的任意两条多肽链的 C 末端或 N 末端，优选 C 末端；或
25 所述第一结合区和所述第二结合区通过所述功能结构域两条链之间的共价结合或非共价结合而连接。
- 30 21. 根据权利要求 20 所述的多特异性多肽分子，其中所述抗体的铰链区为人源，例如，源自人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的铰链结构域或其部分；和/或
所述 TCR 的恒定区或其片段是人源或鼠源的，并且选自 TCR α 链恒定区(TRAC)和 TCR β 链恒定区(TRBC)；优选地，所述 TRAC 和/或 TRBC 包含相对于野生型序列的至少一个半胱氨酸突变，以在 TRAC 和 TRBC 之间形成二硫键，更优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：野生型 TCR α 链恒定区第 48 位和野生型 TCR β 链恒定区第 57 位。
- 35 22. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述多特异性多肽分子还包含通过任选的接头连接至 TRAV1 和/或 TRBV1 的 C 端的选自以下的恒定结构域：
(1) TCR 恒定区或其片段，所述 TCR 恒定区例如包含 TCR α 链恒定区(TRAC)和/或 β 链恒定区(TRBC)；
优选地，所述 TRAC 和/或 TRBC 包含相对于野生型序列的至少一个半胱氨酸突变，以在 TRAC 和 TRBC 之间形成二硫键，更优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：野生型 TCR α 链恒定区第 48 位和野生型 TCR β 链恒定区第 57 位；
40 (2) CH3，所述 CH3 来源于抗体的 Fc 结构域，优选任何一条多肽链或两条多肽链中的 CH3 包含至少一个能够促进所述多肽分子形成异二聚体的突变；
优选地，所述 CH3 各自独立地包含位于选自氨基酸位置 366、368、405 和 407 的一个或更多个位置的突变且两个 CH3 不包含相同的突变，更优选地，所述 CH3 中的一个包含 T366W 突变且另一个包含 T366S、L368A 和 Y407V 突变；
45 (3) CL 和 CH1，所述 CL 来源于抗体轻链 CL 结构域，并且所述 CH1 来源于抗体重链 CH1 结构域。
- 50 23. 根据权利要求 22 所述的多特异性多肽分子，其中所述多特异性多肽分子包含通过任选的接头分别连接至 TRAV1 和 TRBV1 的 C 端的 TRAC 和 TRBC。
24. 根据权利要求 1-23 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述多特异性多肽分子还包含分

别连接至所述 VH1 和 VL1 的来源于抗体的 CH1 和 CL，其中所述 VH1、VL1、CH1 和 CL 形成单链 Fab 并通过接头连接在所述 TRAV1 或所述 TRBV1 的 C 端。

25. 根据权利要求 1-4 和 14-24 中任一项的多特异性多肽分子，其中所述多肽分子的多肽链从 N 端到 C 端分别包含：
- 5 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；或
- 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；或
- 10 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；或
- 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；或
- 15 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-接头-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-CH2-CH3；或
- 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH3，和第二多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH3；或
- 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-TRBC，和第二多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-TRAC；或
- 20 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区，和第二多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-Alb；或
- 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-接头-Alb，和第二多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC；或
- 25 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-CH3-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRBV1-任选的接头-CH3-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或
- 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-CH1-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRBV1-任选的接头-CL-任选的接头-任选的铰链区-CH2-CH3；或
- 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VHH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；
- 30 所述抗体是抗体 Fab，并且其中第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-CL-接头-VH1-CH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第二多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；
- 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1，第二多肽链：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；
- 35 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1，第二多肽链：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；
- 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1，第二多肽链：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。
- 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1，第二多肽链：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；
- 40 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，第二多肽链：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC；
- 第一多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，第二多肽链：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC；
- 45 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，第二多肽链：VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC；
- 第一多肽链：TRAV1-任选的接头-TRAC-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，第二多肽链：VL1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，和第三多肽链：TRBV1-任选的接头-TRBC。
26. 根据权利要求 5-8 和 14-24 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链；其中：
- 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-

任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

27. 根据权利要求 9-12 和 14-24 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链；其中：

5 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL2-接头-VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；或

10 所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL2-接头-TRBV1-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH2-接头-TRAV1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3；或

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VH2-接头-TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

15 28. 根据权利要求 13-24 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述多肽分子包含第一多肽链和第二多肽链；其中：

所述第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VL2-接头-VH2-接头-TRBV1-任选的接头-TRBC-接头-VL1-接头-TRAV2-接头-TRBV2-接头-VH1-任选的接头-铰链区-CH2-CH3，并且所述第二多肽链从 N 端到 C 端包含：TRAV1-任选的接头-TRAC-任选的接头-铰链区-CH2-CH3。

20 29. 根据权利要求 1-28 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中

所述 VH1 和 VL1 包含至少一个半胱氨酸突变以在 VH1 和 VL1 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：VH1 的第 44 位和 VL1 的第 100 位；和/或

25 所述 VH2 和 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 VH2 和 VL2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：VH2 的第 44 位和 VL2 的第 100 位；和/或

所述 TRAV1 和 VL1 或 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRAV1 和 VL1 或 VL2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：TRAV1 的第 104 位和 VL1 或 VL2 的第 80 位；和/或

30 所述 TRAV2 和 VL1 或 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRAV2 和 VL1 或 VL2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：TRAV2 的第 104 位和 VL1 或 VL2 的第 80 位；和/或

所述 TRBV1 和 VL1 或 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRBV1 和 VL1 或 VL2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：TRBV1 的第 84 位和 VL1 或 VL2 的第 80 位；和/或

35 所述 TRBV2 和 VL1 或 VL2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRBV2 和 VL1 或 VL2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：TRBV2 的第 84 位和 VL1 或 VL2 的第 80 位；和/或

所述 TRAV1 和 VH1 或 VH2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRAV1 和 VH1 或 VH2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：TRAV1 的第 104 位和 VH1 或 VH2 的第 89 位；和/或

40 所述 TRAV2 和 VH1 或 VH2 包含至少一个半胱氨酸突变以在 TRAV2 和 VH1 或 VH2 之间形成二硫键，优选地，所述半胱氨酸突变在以下位置处：TRAV2 的第 104 位和 VH1 或 VH2 的第 89 位。

30. 根据权利要求 1-29 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述多肽分子还包含能够增强其亲和力和生物学活性、增强其稳定性、延长其半衰期、降低其免疫原性或减少其翻译后修饰的一个或多个氨基酸突变、插入或缺失；例如，所述氨基酸突变包括能够增强对 FcRn 的结合的突变和/或效应子功能沉默突变。

45

31. 根据权利要求 1-30 中任一项所述的多特异性多肽分子，其中所述多肽分子中的接头各自独立地选自自由 1-35 个氨基酸组成的接头；

50 优选地，所述接头各自独立地选自 S、GS、GGGS、GGGGS、GGGSGGGG、GGSGGS、GGSGSGGS、GGGSGGGGS、GGGSGGGSGGGGS、GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS、GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS、GQPKAAP、TVLRT、TVSSAS、GGEGG、GSEGGGS、RTSGPGDGGKGGPGKGPGEKGTGTPGG、GKGPGGEGTKGTGTPGG、TVLSSAS、EDLKN 或其变体、EDLNK 或其变体和 ANIQK 或其变体，或其任意组合；

优选地, EDLKN 的变体为 EDLKN 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列; 和/或 EDLNK 的变体为 EDLNK 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列; 和/或 ANIQK 的变体为 ANIQK 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列。

- 5 32. 根据权利要求 1-31 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述多肽分子中的接头各自独立地选自自由不超过 15 个氨基酸组成的接头;

优选地, 所述接头各自独立地选自 S、GS、GGGS、GGGGS、GGGSGGGG、GGSGGS、GGSGGSGGS、GGGGSGGGGS、GGGGSGGGSGGGGS、EDLKN 或其变体、EDLNK 或其变体和 ANIQK 或其变体;

- 10 优选地, EDLKN 的变体为 EDLKN 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列; 和/或 EDLNK 的变体为 EDLNK 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列; 和/或 ANIQK 的变体为 ANIQK 经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸所形成的氨基酸序列。

- 15 33. 根据权利要求 1-32 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述多肽分子在一条或多条多肽链的 N 端还包含信号肽序列, 优选在每一条链的 N 端包含信号肽序列, 例如衍生自白蛋白或免疫球蛋白的信号肽序列, 优选 MGWSLILLFLVAVATRVHS。

- 20 34. 根据权利要求 1-33 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的 TAA: 黑色素瘤相关抗原 (例如 gp100、MAGEA1、MAGEA3、MAGEA6、MAGEA4、MAGEA2、MAGEA12、MAGEA2B、MAGEA9B、MAGEA10、MAGEA11、MAGEB2、MAGEC1、MAGEC2)、IGF2BP1、GNGT1、PI4K2B、CCR8、NPSR1、COX7B2、ONECUT3、SMC1B、FOXI3、GAGE2A、FBXO43、BRDT、PAGE2、GAGE13、POU5F1B、CTAG1A 和内源性逆转录酶抗原; 或者

- 25 其中所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的 TSA: KRAS 抗原 (例如, KRAS G12 突变抗原)、TP53、PIK3CA、CTNNB1、EGFR、BRAF 和 GNAS; 或者

其中所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的病毒抗原: HPV 抗原 (例如 HPV E6 或 E7 抗原)、CMV 抗原、HBV 抗原、EBV 抗原、疱疹病毒抗原、人类免疫缺陷病毒 (HIV) 抗原、流感病毒抗原和冠状病毒抗原; 或者

- 30 所述所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地为选自以下的自身抗原: AFP、CEA、CD19、CD20、BCMA、CD22、CD30、SLAM、CLDN18.2、GD2、间皮素、CD38、Her2、GPC3、MUC1、Ro52、Ro60、La、Jo-1、SRP、IFIH1、CENPA、CENPB、SNRPA1、SNRNP70、SNR-PD3、RNAP3、TOPO1、Insulin、GAD65、IA2、Znt8、PL7、TARS、ARS、MI2、拓扑异构酶 1、EXOSC9、EXOSC107、POLR3A、POLR3K、PTRN、GAD2、SLC30A8、AChR、MUSK、LRP4、PLA2R、THSD7A、TSHR、IFN- γ 、CHRNA1、MUSK、LRP4、AQP4、MOG、GRIN1、COL4A3、PLA2R、GM-SCF、PR3 和 MPO。

- 35 35. 根据权利要求 1-34 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述第二抗原和所述第四抗原各自独立地选自 CD3 (例如 CD3 γ 、CD3 δ 和 CD3 ϵ 链)、CD4、CD8、CD10、CD11b、CD11c、CD14、CD16、CD18、CD25、CD32a、CD32b、CD41、CD41b、CD42a、CD42b、CD44、CD45RA、CD49、CD61、CD64、CD68、CD94、CD90、CD117、Nkp46、NKG2D、Fc ϵ RI、TCR α/β 、TCR γ/δ 、HLA-DR、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、ICOS(CD278)、2B4 (CD244)、HVEM、LAG3、DAP10、DAP12、CD27、CD40、GITR、LFA-1、MyD88、CD2、CD7、LIGHT、B7-H3、CTLA-4、PD-1、PD-L1、CD80、BTLA、TIM3、TIGIT 和 LAG-3。

- 45 36. 根据权利要求 1-35 中任一项所述的多特异性多肽分子, 其中所述第一抗原和所述第三抗原各自独立地选自黑色素瘤相关抗原 (例如 gp100、MAGEA1)、KRAS 抗原 (例如, KRAS G12 突变抗原) 和 HPV 抗原 (例如 HPV E7 抗原), 和/或所述第二抗原和所述第四抗原各自独立地选自 CD3、CD28、4-1BB(CD137)、PD-1 和 PD-L1。

- 50 37. 核酸, 其包含编码权利要求 1-36 中任一项所述的多特异性多肽分子的每一条链的核苷酸序列。

38. 载体, 其包含权利要求 37 所述的核酸。

39. 载体系统，其在一个或多个载体上包含编码权利要求 1-36 中任一项所述的多特异性多肽分子的每一条链的核苷酸序列。
- 5 40. 宿主细胞，其包含权利要求 37 所述的核酸、权利要求 38 所述的载体或权利要求 39 所述的载体系统。
- 10 41. 缀合物，其包含权利要求 1-36 中任一项所述的多特异性多肽分子，以及与所述多特异性多肽分子缀合的化学部分。
- 15 42. 根据权利要求 41 所述的缀合物，其中所述化学部分选自治疗剂、免疫刺激分子和可检测标记；
 优选地，所述治疗剂选自免疫调节剂、激动剂、放射性化合物、酶、化学治疗剂和毒素。
 优选地，所述免疫刺激分子选自细胞因子、趋化因子、血小板因子和补体启动剂；
 优选地，所述可检测标记选自生物素、链霉抗生物素蛋白、酶或其催化活性片段、放射性核素、
 纳米颗粒、顺磁性金属离子、核酸探针、造影剂、和荧光、磷光或化学发光分子。
- 20 43. 药物组合物，其包含权利要求 1-36 中任一项所述的多特异性多肽分子、权利要求 37 所述的核酸、权利要求 38 所述的载体、权利要求 39 所述的载体系统、权利要求 40 所述的宿主细胞、权利要求 41 或 42 所述的缀合物，以及药学上可接受的赋形剂。
- 25 44. 根据权利要求 43 所述的药物组合物，其中所述药物组合物还包含第二治疗剂，优选地，所述第二治疗剂选自抗体、化疗剂和小分子药物。
- 30 45. 预防或治疗受试者的疾病的方法，其包括向所述受试者施用有效量的权利要求 1-36 中任一项所述的多特异性多肽分子、权利要求 37 所述的核酸、权利要求 38 所述的载体、权利要求 39 所述的载体系统、权利要求 40 所述的宿主细胞、权利要求 41 或 42 所述的缀合物、或权利要求 43 或 44 所述的药物组合物，其中所述疾病选自癌症、感染性疾病、自身免疫病和炎症性疾病。
46. 根据权利要求 45 所述的方法，其还包括向所述受试者施用第二治疗剂，优选地，所述第二治疗剂选自抗体、化疗剂和小分子药物。