

## Summary

Human T lymphocytes can be redirected with defined specificity by expression of a Chimeric Antigen Receptor (CAR) for the use in adoptive T cell therapy of cancer. The CAR consists of an extracellular antigen binding domain, a single chain variable fragment (scFv) linked to intracellular signaling domains. Upon CAR engagement of antigen the T cell becomes activated resulting in T cell amplification, cytokine secretion and specific cytolysis of antigen-positive target cells.

The treatment of B cell malignancies by CAR modified T cells with specificity for CD19 or CD20 induced complete remission in a remarkable portion of patients providing a realistic opportunity to cure the disease. However, early phase trials still show a substantial risk of relapse due to the escape of residual leukemic cells which lost the targeted epitope. Therefore, to address this limitation we designed a novel bispecific CAR which has both an anti-CD20 and anti-CD19 scFv binding domain in tandem; each individually being capable for recognizing their cognate antigen. The CD20-CD19 CAR was constructed as a second generation CAR with combined CD28-CD3 $\zeta$  signaling domains.

The bispecific anti-CD20-CD19 format allowed correct folding of the respective scFv domains which was proven by the specific and simultaneous binding to their cognate antigens. Engagement of either antigen was sufficient to drive full T cell activation with the release of pro-inflammatory cytokines and killing of the respective target cells. Furthermore bispecific CAR T cells eliminated cells of acute and chronic lymphocytic leukemia including those cells lacking one antigen. Notably, in mice with transplanted pediatric acute lymphocytic leukemia of mixed CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup> phenotype, bispecific CAR T cells efficiently cleared the blood and bone marrow from patient's leukemic cells. Anti-tumor activity was attended by bispecific CAR T cell *in vivo* persistence; importantly a subset of T cells displayed a central memory phenotype. This study shows that CD20-CD19 bispecific CAR T cells hold great potential for dual targeting of malignant B cells.

The strategy of simultaneous targeting of two antigens by a bispecific CAR likely minimizes the selection of single antigen loss variants which are invisible to monospecific CAR T cells. Subsequently, the risk of relapse is minimized and the success of adoptive T cell therapy of B cell malignancies is improved in the long-term.

## Zusammenfassung

Humane T-Zellen können für die adoptive T-Zell-Therapie von Krebs mit einem chimären Antigen-Rezeptor (CAR) ausgestattet werden, der ihnen die Spezifität für ein Antigen auf Tumorzellen verleiht. Der CAR besteht aus einer extrazellulären Antigen-Bindedomäne, dem variablen Antikörperfragment (scFv, single chain variable fragment), die mit intrazellulären Signaldomänen verbunden ist. Die Bindung an das Zielantigen bewirkt die Aktivierung der T-Zellen, was zur T-Zell-Amplifizierung, Zytokin-Sekretion und der spezifischen Zytolyse der Antigen-positiven Zielzellen führt.

Die Therapie von malignen B-Zellerkrankungen mit CAR-modifizierten T-Zellen mit der Spezifität für CD19 oder CD20 hat komplette Remissionen bei einem bemerkenswert großen Anteil von Patienten bewirkt und bietet daher eine vielversprechende Möglichkeit diese Erkrankung zu heilen. Allerdings haben klinische Studien gezeigt, dass ein beachtliches Risiko von Rezidiven durch resistente verbleibende leukämische Zellen besteht, die das Zielepitop verloren haben. Um dieser Einschränkung entgegenzuwirken haben wir einen neuen bispezifischen CAR generiert, der die zwei verknüpften Bindedomänen anti-CD20 scFv und anti-CD19 scFv enthält; jede für sich besitzt die Fähigkeit, das entsprechende Zielantigen zu erkennen. Der CD20-CD19 CAR wurde als CAR der zweiten Generation mit einer kombinierten CD28-CD3 $\zeta$  Signaldomäne konstruiert.

Das bispezifische anti-CD20-CD19 Format ermöglichte die korrekte Faltung der jeweiligen scFv Domäne, was durch die spezifische und simultane Bindung an die Zielantigene gezeigt wurde. Die Bindung an nur eines der beiden Antigene reichte aus, um die volle Aktivierung von T-Zellen zu induzieren, was mit der Sekretion von Zytokinen und der Lyse der Zielzellen einherging. Darüber hinaus eliminierten bispezifische CAR T-Zellen akute und chronische lymphatische Leukämie (ALL, CLL) Zellen, einschließlich derer, die eines der Zielantigene verloren haben. Insbesondere vermittelten die bispezifischen CAR T-Zellen eine effiziente Eliminierung von transplantierten pädiatrischen ALL Zellen mit einem gemischten CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup> Phänotyp im Blut und Knochenmark von Mäusen. Diese anti-Tumor-Aktivität ging mit der *in vivo* Persistenz der bispezifischen CAR T-Zellen einher. Hierbei wies ein Teil der T-Zellen einen zentralen Gedächtnis Phänotyp auf. Diese Studie zeigt, dass CD20-CD19 bispezifische CAR T-Zellen über ein großes Potential zum dualen Targeting von malignen B-Zellen verfügen.

Die Strategie des simultanen Targetings von zwei Antigenen durch bispezifische CARs reduziert die Selektion von einzelnen Antigen-Verlustvarianten, welche unsichtbar für monospezifische CAR T-Zellen sind. Dadurch wird das Risiko von Rezidiven minimiert und der Erfolg der adoptiven CAR T-Zell-Therapie langfristig verbessert.