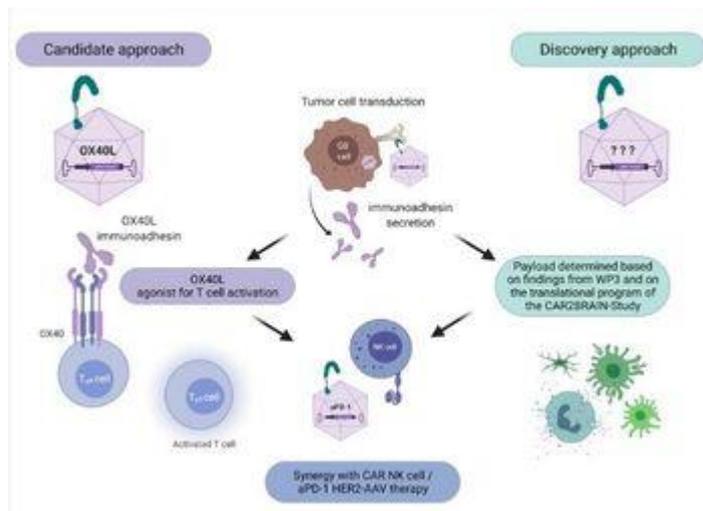


## **Targeted local combination therapy with checkpoint inhibitors and CAR-NK cells in glioblastoma using DARPIn-linked AAV vectors**

Die Applikation von HER2-AAVs zur lokalen intratumoralen Produktion eines PD-1-spezifischen Immunadhäsins hat das Ziel der Modulation des immunsuppressiven Tumormikromilieus im Glioblastom. Die Kombination aus HER2-AAVs mit CAR-NK-Zellen beruht auf komplementären Wirkmechanismen und kann so synergistische Effekte erzielen. Die CAR-NK-Zellen lysieren Tumorzellen, dadurch kommt es zu einer verstärkten Freisetzung tumorspezifischer Antigene und damit lokal zu einer gegen den Tumor gerichteten Immunreaktion. Durch die von den HER2-AAVs induzierte intratumorale Sezernierung von aPD-1 wiederum wird diese Immunantwort entblockiert und so verstärkt.

In den geplanten Experimenten soll die Wirkung der HER2-AAVs alleine und in Kombination mit CAR-NK-Zellen im orthotopen intrakraniellen GL261-HER2-Modell untersucht und molekular charakterisiert werden. Der Einfluss auf Tumorwachstum und symptomfreies Überleben der Versuchstiere wird mittels Magnetresonanztomographie und Kaplan-Meier-Kurven quantifiziert werden. Mittels FACS-Analysen, multispektraler Fluoreszenzmikroskopie und RNA-Sequenzierung werden die dem synergistischen Effekt zugrundeliegenden Mechanismen der Immunreaktion detailliert charakterisiert werden. Die einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen sowie deren Aktivität werden durch Transkriptomanalysen und Multipanel-FACS-Analyse bestimmt werden. Zum besseren Verständnis der ausgelösten Immunantwort und zur Erkennung neuer Ansatzpunkte für die HER2-AAV-vermittelte Immunmodulation wird eine Transkriptomanalyse mit dem NanoString-System durchgeführt werden. Zusätzlich wird eine mögliche T-Zell-Aktivierung auf molekularer Ebene charakterisiert werden, indem T-Zell-Rezeptoren (TCR) mit der bereits etablierten BrainTuNE-Plattform in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Platten am DKFZ in Heidelberg sequenziert werden. Tumorreaktive T-Zell-Signaturen werden durch kombinierte scVDJ/RNA-Sequenzierung aus tumor-infiltrierenden Lymphozyten bestimmt werden. So kann die Klonalität der T-Zellen zwischen den Behandlungsgruppen verglichen werden. Als mechanistische Kontrolle der Untersuchungen auf die Therapieeffizienz sind zudem CD8+ T-Zell-Depletionsexperimente geplant.



Da das immunsuppressive Tumormikromilieu durch die Wechselwirkungen mehrerer molekularer Mechanismen bedingt ist, soll eine zielgerichtete Modulation an verschiedenen Ansatzpunkten durch eine Kombinationstherapie mit mehreren HER2-AAVs untersucht werden. Aufgrund von immunvermittelten Nebenwirkungen wäre eine kombinierte Immuncheckpoint-Therapie mit mehr als zwei molekularen Zielen bei systemischer Wirkstoffverabreichung praktisch nicht möglich, über eine spezifisch intratumorale Therapie durch HER2-AAVs könnte dies erreichbar werden. Dafür sollen zusätzlich zwei weitere HER2-AAVs untersucht werden: Zum einen sollen HER2-AAVs mit einem von OX40L abgeleiteten Immunadhäsion eingesetzt werden („Candidate Approach“). Zum anderen sollen HER2-AAVs mit einem weiteren Zielmolekül untersucht werden. Das Zielmolekül dieser HER2-AAVs soll basierend auf den Ergebnissen der oben erläuterten Untersuchungen ausgewählt werden („Discovery Approach“). Das Ziel dieser Experimente ist die Etablierung einer multimodalen HER2-AAV Kombinationstherapie in murinen in vivo Glioblastommodellen.